

CONJUGADOS PEPTÍDICOS DE INHIBIDORES DE TUBULINA PEPTÍDICA COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a conjugados peptídicos de inhibidores peptídicos de tubulina, tales como monometil auristatinas, que son útiles para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se envió electrónicamente como un archivo XML denominado "43236-0020WO1_SL_ST26.XML". El archivo XML, creado el 15 de noviembre de 2022, tiene un tamaño de 436.177 bytes. El material en el archivo XML se incorpora en la presente en su totalidad mediante esta referencia.

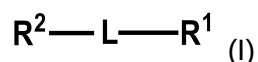
ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

El tratamiento del cáncer en humanos mediante la administración sistémica de agentes farmacéuticos a menudo funciona ralentizando o interrumpiendo la replicación no controlada que es una característica de las células cancerosas. Los inhibidores peptídicos de tubulina, como las dolastatinas, las auristatinas derivadas de la dolastatina, las monometil auristatinas (por ejemplo, monometil auristatina E y monometil auristatina F) y las tubulisinas son una clase de agentes antimitóticos que inhiben la polimerización de tubulina y pueden mostrar una alta potencia en una amplia gama de células de cáncer. Debido a su citotoxicidad a menudo alta, los inhibidores peptídicos de tubulina, como las monometil auristatinas, se han conjugado con agentes dirigidos a tumores, como anticuerpos, para reducir los efectos no deseados. Aun así, los conjugados de anticuerpos y fármacos de inhibidores peptídicos de tubulina (por ejemplo, monometil auristatinas) pueden presentar varios efectos secundarios graves, como neutropenia, neuropatía, trombocitopenia y toxicidades oculares. Por lo tanto, existe la necesidad de una administración más selectiva de compuestos inhibidores de tubulina peptídicos al tejido enfermo.

COMPENDIO

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



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

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

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

La presente descripción también proporciona el uso de un compuesto descrito en la presente en la elaboración de un medicamento para uso en terapia. La presente descripción también proporciona los compuestos descritos en la presente para uso en terapia.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1A muestra un gráfico del retraso del crecimiento de células colorrectales HCT116 *in vitro* después de cuatro días de incubación con las concentraciones indicadas de Compuesto 2 o MMAE no conjugada.

La FIG. 1B muestra un gráfico del retraso del crecimiento de células de próstata PC3 *in vitro* después de cuatro días de incubación con las concentraciones indicadas de Compuesto 2 o MMAE no conjugada.

La FIG. 1C muestra una gráfica del retraso del crecimiento de células de NSCLC NCI-H1975 *in vitro* después de cuatro días de incubación con las concentraciones indicadas de Compuesto 2 o MMAE no conjugada.

La FIG. 1D muestra una gráfica del retraso del crecimiento de células de NSCLC NCI-H292 *in vitro* después de cuatro días de incubación con las concentraciones indicadas de Compuesto 2 o MMAE no conjugada.

La FIG. 2A muestra un análisis del ciclo celular de células colorrectales HCT116 *in vitro* después de 24 h de incubación con las dosis indicadas de MMAE no conjugada.

La FIG. 2B muestra un análisis del ciclo celular de células colorrectales HCT116 *in vitro* después de 24 h de incubación con las dosis indicadas de Compuesto 2.

La FIG. 3 muestra un diagrama de la concentración en plasma del Compuesto 2 y MMAE liberada después de una dosis IV única de 10 mg/kg del Compuesto 2 en la rata (los datos se expresan como media $\pm$ SD).

La FIG. 4A muestra una gráfica de los niveles de MMAE no conjugada en tumores de ratón determinados por LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de MMAE o 3 mg/kg del Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116.

La FIG. 4B muestra una gráfica de los niveles de MMAE no conjugada en el músculo de ratón determinados por LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de MMAE o 3 mg/kg del Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116.

La FIG. 4C muestra una gráfica de los niveles de MMAE no conjugada en la médula ósea de ratón determinados por LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de MMAE o 3 mg/kg del Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116.

La FIG. 5A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 0,25 mg/kg de MMAE o 40 mg/kg del Compuesto 1 (equivalente a 7 mg/kg de MMAE) en ratones lampiños que portaban tumores de flanco colorrectal negativos para HER2 HCT116. Los animales recibieron una dosis una vez al día por vía intraperitoneal durante un total de dos días.

La FIG. 5B muestra una gráfica del cambio porcentual en el peso corporal de ratones lampiños que portaban tumores colorrectales negativos para HER2 HCT116, a los que se les administraron 0,25 mg/kg de MMAE o 40 mg/kg del Compuesto 1 (equivalente a 7 mg/kg de MMAE).

La FIG. 6A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 20 mg/kg del Compuesto 2 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de adenocarcinoma de próstata PC3. Los animales recibieron una dosis una vez al día dos veces por semana por vía intraperitoneal durante tres semanas.

La FIG. 6B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en el estudio del Ejemplo F. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM.

La FIG. 7A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 10 o 20 mg/kg del Compuesto 2 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de cáncer de pulmón no microcítico NCI-H1975. Los animales recibieron una dosis una vez al día dos

veces por semana por vía intraperitoneal durante tres semanas.

La FIG. 7B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en el estudio del Ejemplo G. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM.

La FIG. 8 muestra una gráfica de los pesos corporales de ratones lampiños a los que se les administraron 10 mg/kg de Compuesto 1 y Compuesto 2 una vez al día durante cuatro días consecutivos.

La FIG. 9A muestra una gráfica de las concentraciones de péptidos en el tumor después de una única dosis IP de 10 mg/kg del Compuesto 7 o del Compuesto 13 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como medias $\pm$ SD).

La FIG. 9B muestra una gráfica de las concentraciones de MMAE en el tumor después de una única dosis IP de 10 mg/kg del Compuesto 7 o del Compuesto 13 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como medias $\pm$ SD).

La FIG. 10A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 5 mg/kg del Compuesto 13 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de cáncer colorrectal HT-29. Los animales recibieron una dosis una vez al día por vía intraperitoneal los días 0-3, 5 y 16-19.

La FIG. 10B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en el estudio del Ejemplo J. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM.

La FIG. 11A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 40 y 80 mg/kg del Compuesto 7 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de cáncer colorrectal HT-29. Los animales recibieron una dosis una vez al día por vía intraparenteral durante cuatro días consecutivos a la semana durante dos semanas.

La FIG. 11B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en el estudio del Ejemplo K. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM.

La FIG. 12A muestra una gráfica de las concentraciones de péptidos en el tumor después de una única dosis intraperitoneal de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 1 o Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como medias $\pm$ SD).

La FIG. 12B muestra una gráfica de las concentraciones de MMAE en el tumor después de una única dosis intraperitoneal de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 1 o Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como medias $\pm$ SD).

La FIG. 13A muestra una gráfica de los niveles de péptidos en tumor de ratón determinados mediante ELISA y LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 7, Compuesto 5 o Compuesto 6 en ratones hembra lampiños

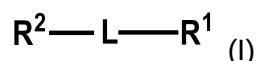
portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como media $\pm$ SD).

La FIG. 13B muestra una gráfica de los niveles de MMAE no conjugada en tumor de ratón determinados mediante ELISA y LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 7, Compuesto 5 o Compuesto 6 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como media $\pm$ SD). La FIG. 14A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 1, 5 y 10 mg/kg del Compuesto 5 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de cáncer colorrectal HCT116. Los animales recibieron una dosis una vez al día por vía intraparenteral durante cuatro días consecutivos.

La FIG. 14B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en el estudio del Ejemplo N. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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



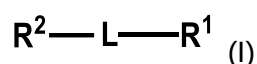
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

R¹ es un péptido;

R² es un radical de un inhibidor peptídico de tubulina; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente al resto R¹ y R².

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



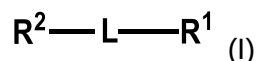
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

R¹ es un péptido que tiene de 5 a 50 aminoácidos;

R² es un radical de un inhibidor peptídico de tubulina; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente al resto R¹ y R².

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



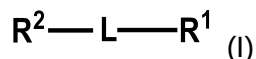
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

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

R² es un radical de un inhibidor peptídico de tubulina; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente al resto R¹ y R².

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



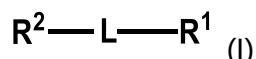
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

R¹ es un péptido;

R² es un radical de un compuesto de auristatina; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente al resto R¹ y R².

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



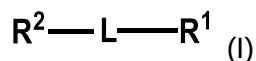
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

R¹ es un péptido que tiene de 5 a 50 aminoácidos;

R² es un radical de un compuesto de auristatina; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente al resto R¹ y R².

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



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

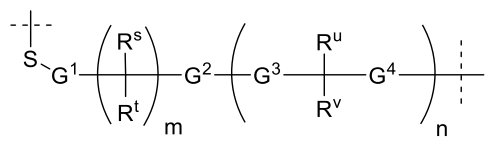
R¹ es un péptido capaz de suministrar selectivamente R²L- a través de una membrana celular con un manto ácido o hipóxico;

R² es un radical de un compuesto de auristatina; y

L es un enlazador, que se enlaza covalentemente al resto R¹ y R².

En algunas modalidades, el compuesto de auristatina es un compuesto de monometil auristatina.

En algunas modalidades, L es un enlazador que tiene la siguiente estructura:



donde el átomo S del enlazador está unido con un residuo de cisteína del péptido para formar un enlace disulfuro; y donde:

G¹ se selecciona de un enlace, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₁₄, heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros, donde dicho arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₁₄, heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros de G¹ está cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, haloalquilo C₁₋₆, CN, NO₂, OR^a, SR^a, C(O)R^b, C(O)NR^cR^d, C(O)OR^a, OC(O)R^b, OC(O)NR^cR^d, C(=NR^e)NR^cR^d, NR^cC(=NR^e)NR^cR^d, NR^cR^d, NR^cC(O)R^b, NR^cC(O)OR^a, NR^cC(O)NR^cR^d, NR^cS(O)R^b, NR^cS(O)₂R^b, NR^cS(O)₂NR^cR^d,

$S(O)R^b$, $S(O)NR^cR^d$, $S(O)_2R^b$ y $S(O)_2NR^cR^d$, donde dicho sustituyente de alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de G^1 se sustituye opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de CN , NO_2 , OR^a , SR^a , $C(O)R^b$, $C(O)NR^cR^d$, $C(O)OR^a$, $OC(O)R^b$, $OC(O)NR^cR^d$, $C(=NR^e)NR^cR^d$, $NR^cC(=NR^e)NR^cR^d$, NR^cR^d , $NR^cC(O)R^b$, $NR^cC(O)OR^a$, $NR^cC(O)NR^cR^d$, $NR^cS(O)R^b$, $NR^cS(O)_2R^b$, $NR^cS(O)_2NR^cR^d$, $S(O)R^b$, $S(O)NR^cR^d$, $S(O)_2R^b$ y $S(O)_2NR^cR^d$;

cada R^s y R^t se selecciona independientemente de H , halo, alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} ;

G^2 se selecciona de $-NR^G C(O)-$, $-NR^G-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NR^G C(O)-$, $-OC(O)NR^G-$ y $-S(O_2)-$;

G^3 se selecciona de un enlace, arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros, donde dicho arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros de G^3 está cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , CN , NO_2 , OR^{a1} , SR^{a1} , $C(O)R^{b1}$, $C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(O)OR^{a1}$, $OC(O)R^{b1}$, $OC(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(O)R^{b1}$, $NR^{c1}C(O)OR^{a1}$, $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}S(O)R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)R^{b1}$, $S(O)NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)_2R^{b1}$ y $S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, donde dicho sustituyente de alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de G^3 se sustituye opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de CN , NO_2 , OR^{a1} , SR^{a1} , $C(O)R^{b1}$, $C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(O)OR^{a1}$, $OC(O)R^{b1}$, $OC(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(O)R^{b1}$, $NR^{c1}C(O)OR^{a1}$, $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}S(O)R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)R^{b1}$, $S(O)NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)_2R^{b1}$ y $S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$;

R^u y R^v se seleccionan independientemente de H , halo, alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} ;

G^4 se selecciona de $-C(O)-$, $-NR^G C(O)-$, $-NR^G-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NR^G C(O)-$ y $-S(O_2)-$;

cada R^G se selecciona independientemente de H y alquilo C_{1-4} ;

cada R^a , R^b , R^c , R^d , R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} y R^{d1} se selecciona independientemente de H , alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , donde dicho alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de R^a , R^b , R^c , R^d , R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} y R^{d1} se sustituye opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , CN , OR^{a2} , SR^{a2} , $C(O)R^{b2}$, $C(O)NR^{c2}R^{d2}$, $C(O)OR^{a2}$, $OC(O)R^{b2}$, $OC(O)NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(O)R^{b2}$, $NR^{c2}C(O)NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(O)OR^{a2}$, $C(=NR^{e2})NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(=NR^{e2})NR^{c2}R^{d2}$, $S(O)R^{b2}$, $S(O)NR^{c2}R^{d2}$, $S(O)_2R^{b2}$, $NR^{c2}S(O)_2R^{b2}$, $NR^{c2}S(O)_2NR^{c2}R^{d2}$ y $S(O)_2NR^{c2}R^{d2}$;

cada R^{a2} , R^{b2} , R^{c2} y R^{d2} se selecciona independientemente de H , alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} ,

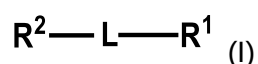
alquenilo C₂₋₆ y alquinilo C₂₋₆, donde dicho alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆ y alquinilo C₂₋₆ de R^{a2}, R^{b2}, R^{c2} y R^{d2} están cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de OH, CN, amino, halo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆;

cada R^e, R^{e1} y R^{e2} se selecciona independientemente de H y alquilo C₁₋₄;

m es 0, 1, 2, 3 o 4; y

n es 0 o 1.

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



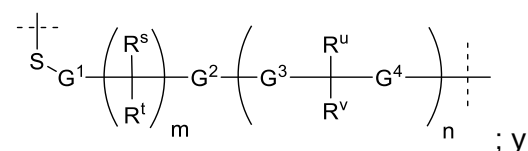
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

R¹ es un péptido;

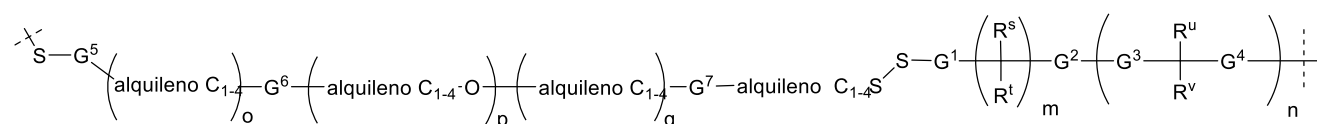
R² es un radical de un compuesto de auristatina; y

L es un enlazador que tiene una estructura seleccionada de:

i)



ii)



donde el átomo S terminal del enlazador está unido con un residuo de cisteína del péptido para formar un enlace disulfuro; y donde:

G¹ se selecciona de un enlace, arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₁₄, heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros, donde dicho arilo C₆₋₁₀, cicloalquilo C₃₋₁₄, heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros de G¹ está cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, haloalquilo C₁₋₆, CN, NO₂, OR^a, SR^a, C(O)R^b, C(O)NR^cR^d, C(O)OR^a, OC(O)R^b, OC(O)NR^cR^d, C(=NR^e)NR^cR^d, NR^cC(=NR^e)NR^cR^d, NR^cR^d, NR^cC(O)R^b, NR^cC(O)OR^a, NR^cC(O)NR^cR^d, NR^cS(O)R^b, NR^cS(O)₂R^b, NR^cS(O)₂NR^cR^d, S(O)R^b, S(O)NR^cR^d, S(O)₂R^b y S(O)₂NR^cR^d, donde dicho sustituyente de alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆ y alquinilo C₂₋₆ de G¹ se sustituye opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de CN, NO₂, OR^a, SR^a, C(O)R^b, C(O)NR^cR^d, C(O)OR^a, OC(O)R^b, OC(O)NR^cR^d, C(=NR^e)NR^cR^d, NR^cC(=NR^e)NR^cR^d, NR^cR^d, NR^cC(O)R^b, NR^cC(O)OR^a, NR^cC(O)NR^cR^d, NR^cS(O)R^b, NR^cS(O)₂R^b, NR^cS(O)₂NR^cR^d, S(O)R^b, S(O)NR^cR^d, S(O)₂R^b y

$S(O)_2NR^cR^d$;

G^2 se selecciona de $-NR^G C(O)-$, $-NR^G-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NR^G C(O)-$, $-OC(O)NR^G-$ y $-S(O_2)-$;

G^3 se selecciona de un enlace, arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros, donde dicho arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros de G^3 está cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , CN, NO_2 , OR^{a1} , SR^{a1} , $C(O)R^{b1}$, $C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(O)OR^{a1}$, $OC(O)R^{b1}$, $OC(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(O)R^{b1}$, $NR^{c1}C(O)OR^{a1}$, $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}S(O)R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)R^{b1}$, $S(O)NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)_2R^{b1}$ y $S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, donde dicho sustituyente de alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de G^3 se sustituye opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de CN, NO_2 , OR^{a1} , SR^{a1} , $C(O)R^{b1}$, $C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(O)OR^{a1}$, $OC(O)R^{b1}$, $OC(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(O)R^{b1}$, $NR^{c1}C(O)OR^{a1}$, $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}S(O)R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)R^{b1}$, $S(O)NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)_2R^{b1}$ y $S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$;

G^4 se selecciona de $-C(O)-$, $-NR^G C(O)-$, $-NR^G-$, $-O-$, $-S-$, $-OC(O)-$, $-NR^G C(O)-$ y $-S(O_2)-$;

G^5 se selecciona de un enlace, arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros, donde dicho arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros de G^5 está cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , CN, NO_2 , OR^a , SR^a , $C(O)R^b$, $C(O)NR^cR^d$, $C(O)OR^a$, $OC(O)R^b$, $OC(O)NR^cR^d$, $C(=NR^e)NR^cR^d$, $NR^cC(=NR^e)NR^cR^d$, NR^cR^d , $NR^cC(O)R^b$, $NR^cC(O)OR^a$, $NR^cC(O)NR^cR^d$, $NR^cS(O)R^b$, $NR^cS(O)_2R^b$, $NR^cS(O)_2NR^cR^d$, $S(O)R^b$, $S(O)NR^cR^d$, $S(O)_2R^b$ y $S(O)_2NR^cR^d$, donde dicho sustituyente de alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de G^5 se sustituye opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de CN, NO_2 , OR^a , SR^a , $C(O)R^b$, $C(O)NR^cR^d$, $C(O)OR^a$, $OC(O)R^b$, $OC(O)NR^cR^d$, $C(=NR^e)NR^cR^d$, $NR^cC(=NR^e)NR^cR^d$, NR^cR^d , $NR^cC(O)R^b$, $NR^cC(O)OR^a$, $NR^cC(O)NR^cR^d$, $NR^cS(O)R^b$, $NR^cS(O)_2R^b$, $NR^cS(O)_2NR^cR^d$, $S(O)R^b$, $S(O)NR^cR^d$, $S(O)_2R^b$ y $S(O)_2NR^cR^d$;

G^6 se selecciona de $-NR^G C(O)-$, $-NR^G-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NR^G C(O)-$, $-OC(O)NR^G-$ y $-S(O_2)-$;

G^7 se selecciona de $-NR^G C(O)-$, $-NR^G-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NR^G C(O)-$, $-OC(O)NR^G-$ y $-S(O_2)-$;

cada R^s y R^t se selecciona independientemente de H, halo, alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} ; o cada R^s y R^t , junto con el átomo de C con el cual están unidos forman un anillo cicloalquilo C_{3-6} ;

R^u y R^v se seleccionan independientemente de H, halo, alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} ;

cada R^G se selecciona independientemente de H y alquilo C_{1-4} ;

cada R^a , R^b , R^c , R^d , R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} y R^{d1} se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , donde dicho alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de R^a , R^b , R^c , R^d , R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} y R^{d1} se sustituye opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , CN, OR^{a2} , SR^{a2} , $C(O)R^{b2}$, $C(O)NR^{c2}R^{d2}$, $C(O)OR^{a2}$, $OC(O)R^{b2}$, $OC(O)NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(O)R^{b2}$, $NR^{c2}C(O)NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(O)OR^{a2}$, $C(=NR^{e2})NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(=NR^{e2})NR^{c2}R^{d2}$, $S(O)R^{b2}$, $S(O)NR^{c2}R^{d2}$, $S(O)_2R^{b2}$, $NR^{c2}S(O)_2R^{b2}$, $NR^{c2}S(O)_2NR^{c2}R^{d2}$ y $S(O)_2NR^{c2}R^{d2}$;

cada R^{a2} , R^{b2} , R^{c2} y R^{d2} se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , donde dicho alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de R^{a2} , R^{b2} , R^{c2} y R^{d2} están cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de OH, CN, amino, halo, alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} y haloalcoxi C_{1-6} ;

cada R^e , R^{e1} y R^{e2} se selecciona independientemente de H y alquilo C_{1-4} ;

m es 0, 1, 2, 3 o 4;

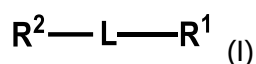
n es 0 o 1;

o es 0 o 1;

p es 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y

q es 0 o 1.

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

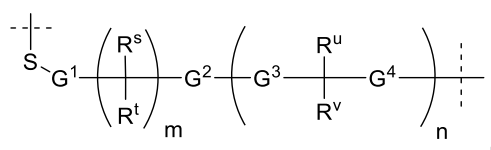


o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

R^1 es un péptido;

R^2 es un radical de un compuesto de auristatina; y

L es un enlazador que tiene la siguiente estructura:



donde el átomo S del enlazador está unido con un residuo de cisteína del péptido para formar un enlace disulfuro; y donde:

G^1 se selecciona de un enlace, arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros, donde dicho arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros de G^1 está cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , CN, NO_2 , OR^a , SR^a , $C(O)R^b$, $C(O)NR^cR^d$, $C(O)OR^a$, $OC(O)R^b$, $OC(O)NR^cR^d$, $C(=NR^e)NR^cR^d$, $NR^cC(=NR^e)NR^cR^d$, NR^cR^d , $NR^cC(O)R^b$, $NR^cC(O)OR^a$, $NR^cC(O)NR^cR^d$, $NR^cS(O)R^b$, $NR^cS(O)_2R^b$, $NR^cS(O)_2NR^cR^d$, $S(O)R^b$, $S(O)NR^cR^d$, $S(O)_2R^b$ y $S(O)_2NR^cR^d$, donde dicho sustituyente de alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de G^1 se sustituye opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de CN, NO_2 , OR^a , SR^a , $C(O)R^b$, $C(O)NR^cR^d$, $C(O)OR^a$, $OC(O)R^b$, $OC(O)NR^cR^d$, $C(=NR^e)NR^cR^d$, $NR^cC(=NR^e)NR^cR^d$, NR^cR^d , $NR^cC(O)R^b$, $NR^cC(O)OR^a$, $NR^cC(O)NR^cR^d$, $NR^cS(O)R^b$, $NR^cS(O)_2R^b$, $NR^cS(O)_2NR^cR^d$, $S(O)R^b$, $S(O)NR^cR^d$, $S(O)_2R^b$ y $S(O)_2NR^cR^d$;

cada R^s y R^t se selecciona independientemente de H, halo, alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} ;

G^2 se selecciona de $-NR^G C(O)-$, $-NR^G-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NR^G C(O)-$, $-OC(O)NR^G-$ y $-S(O)_2-$;

G^3 se selecciona de un enlace, arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros, donde dicho arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros de G^3 está cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , CN, NO_2 , OR^{a1} , SR^{a1} , $C(O)R^{b1}$, $C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(O)OR^{a1}$, $OC(O)R^{b1}$, $OC(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(O)R^{b1}$, $NR^{c1}C(O)OR^{a1}$, $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}S(O)R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)R^{b1}$, $S(O)NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)_2R^{b1}$ y $S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, donde dicho sustituyente de alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de G^3 se sustituye opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de CN, NO_2 , OR^{a1} , SR^{a1} , $C(O)R^{b1}$, $C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(O)OR^{a1}$, $OC(O)R^{b1}$, $OC(O)NR^{c1}R^{d1}$, $C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(=NR^{e1})NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}C(O)R^{b1}$, $NR^{c1}C(O)OR^{a1}$, $NR^{c1}C(O)NR^{c1}R^{d1}$, $NR^{c1}S(O)R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2R^{b1}$, $NR^{c1}S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)R^{b1}$, $S(O)NR^{c1}R^{d1}$, $S(O)_2R^{b1}$ y $S(O)_2NR^{c1}R^{d1}$;

R^u y R^v se seleccionan independientemente de H, halo, alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} ;

G^4 se selecciona de $-C(O)-$, $-NR^G C(O)-$, $-NR^G-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NR^G C(O)-$ y $-S(O)_2-$;

cada R^G se selecciona independientemente de H y alquilo C_{1-4} ;

cada R^a , R^b , R^c , R^d , R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} y R^{d1} se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , donde dicho alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de R^a , R^b , R^c , R^d , R^{a1} , R^{b1} , R^{c1} y R^{d1} se sustituye opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , CN, OR^{a2} , SR^{a2} , $C(O)R^{b2}$, $C(O)NR^{c2}R^{d2}$, $C(O)OR^{a2}$, $OC(O)R^{b2}$, $OC(O)NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(O)R^{b2}$, $NR^{c2}C(O)NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(O)OR^{a2}$, $C(=NR^{e2})NR^{c2}R^{d2}$, $NR^{c2}C(=NR^{e2})NR^{c2}R^{d2}$, $S(O)R^{b2}$, $S(O)NR^{c2}R^{d2}$, $S(O)_2R^{b2}$, $NR^{c2}S(O)_2R^{b2}$, $NR^{c2}S(O)_2NR^{c2}R^{d2}$ y $S(O)_2NR^{c2}R^{d2}$;

cada R^{a2} , R^{b2} , R^{c2} y R^{d2} se selecciona independientemente de H, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , donde dicho alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de R^{a2} , R^{b2} , R^{c2} y R^{d2} están cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de OH, CN, amino, halo, alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} y haloalcoxi C_{1-6} ;

cada R^e , R^{e1} y R^{e2} se selecciona independientemente de H y alquilo C_{1-4} ;

m es 0, 1, 2, 3 o 4; y

n es 0 o 1.

En algunas modalidades, el lado izquierdo de L se une a R^1 y el lado derecho de L se une a R^2 .

Como se usa en la presente, "péptido" se refiere a un resto de direccionamiento que comprende una secuencia de 10-50 aminoácidos, integrada por residuos aminoácidos de origen natural y opcionalmente uno o más aminoácidos no naturales. En algunas modalidades, el péptido de R^1 es un péptido de 20 a 40, 20 a 30 aminoácidos, o 30 a 40 residuos. Los péptidos adecuados para uso en los compuestos de la invención son aquellos que pueden insertarse a través de una membrana celular a través de un cambio conformacional o un cambio en una estructura secundaria en respuesta a los cambios de pH ambientales. De esta manera, el péptido puede dirigirse al tejido ácido y translocar selectivamente moléculas polares impermeables a las células a través de las membranas celulares en respuesta a un pH extracelular bajo. En algunas modalidades, el péptido es capaz de administrar selectivamente un resto conjugado (por ejemplo, R^2L^-) a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH inferior a alrededor de 6,0. En algunas modalidades, el péptido es capaz de suministrar selectivamente un resto conjugado (por ejemplo, R^2L^-) a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH menor de alrededor de 6,5. En algunas modalidades, el péptido es capaz de suministrar selectivamente un resto conjugado (por ejemplo, R^2L^-) a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH menor de alrededor

de 5,5. En algunas modalidades, el péptido es capaz de suministrar selectivamente un resto conjugado (por ejemplo, R²L-) a través de una membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que tiene un pH entre alrededor de 5,0 y alrededor de 6,0.

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

Los péptidos adecuados, que pueden cambiar de manera conformacional con base en el pH e insertar a través de una membrana celular, se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 8,076,451, 9,289,508, 10,933,069 y las publicaciones de solicitud de estadounidense n.º 2021/0009536 y 2021/0009719 (cada una de las cuales se incorpora en la presente en su totalidad). Otros péptidos adecuados se describen, por ejemplo, en Weerakkody, et ál., PNAS 110 (15), 5834-5839 (abril 9, 2013), que también se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.

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

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),
 AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2), y
 ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3);
 Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4);
 AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC (SEQ ID No. 5; Pv5); y
 AAEQNPIYWWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID No. 6; Pv6);
 donde R¹ se une a Q mediante un residuo de cisteína de R¹.

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

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO. 1; Pv1),
 AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2), y
 ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3); y
 AAEQNPIYWWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID No. 6; Pv6);
 donde R¹ se une a Q mediante un residuo de cisteína de R¹.

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

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

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que comprende la secuencia ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que comprende la secuencia Ac-AAEQNPPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4).

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que comprende la secuencia AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5)

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que comprende la secuencia AAEQNPIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID NO. 6; Pv6).

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

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que consiste en la secuencia AEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADECG (SEQ ID NO. 2; Pv2).

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que consiste en la secuencia ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO. 3; Pv3).

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que consiste en la secuencia Ac-AAEQNPPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGKCG (SEQ ID NO. 4; Pv4).

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que consiste en la secuencia AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTC (SEQ ID NO. 5; Pv5)

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que consiste en la secuencia AAEQNPIYWWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG (SEQ ID NO. 6; Pv6).

En algunas modalidades, R^1 es un péptido que comprende al menos una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 7 a la SEQ ID NO: 311 como se muestra en la Tabla 1.

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

Tabla 1. Secuencias de R^1 adicionales

SEQ ID NO.	Secuencia
7	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGT
8	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGT
9	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGT
10	AAEQNPPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG
11	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTCG
12	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADEGTG

13	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
14	AKEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
15	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTKCG
16	AKEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECT
17	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLNLALLVDADEGTG
18	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLLKLALLVDADEGTG
19	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVNANQGT
20	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLALALLVDADEGT
21	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
22	AAEQNPIYWARYADWLFTTALLLLDLALLVDADEGT
23	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLELALLVDADEGT
24	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
25	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLDLLALLVDADEGT
26	GEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGCG
27	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTGCG
28	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTGCG
29	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGCG
30	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLDLALLVDADEGTGCG
31	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
32	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLHGALLVDADECT
33	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVDADEGCT
34	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNADECT
35	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLHGALLVNANECT
36	AEQNPIYWARYADFLFTTPLLLLDLALLVDADET
37	AEQNPIYFARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
38	AEQNPIYFARYADFLFTTPLLLLDLALLWDADET
39	AKEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDG
40	ACEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDG
41	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDCG
42	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLELALLVECG
43	AKEDQNPYWRAYADLFTPLTLLDLLALWDG
44	ACEDQNPYWRAYADLFTPLTLLDLLALWDG
45	ACDDQNPWRAYLDLLFPTDLLLLDLLW
46	TEDADVLLALDLLLLPTTFLWD

47	AEQNPIYWARYADWLFTTPL
48	AEQNPIYWARYADWLFTTPCL
49	ACEQNPIYWARYADWLFTTPL
50	AEQNPIYFARYADWLFTTPL
51	KEDQNPWARYADLLFPTTLAW
52	ACEDQNPWARYADLLFPTTLAW
53	ACEDQNPWARYADWLFTTPLLLLD
54	ACEEQNPWARYAELLFPTTLAW
55	ACEEQNPWARYAEWLFTTPLLLLE
56	ACEEQNPWARYLEWLFTPTETLLLEL
57	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
58	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV
59	WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT CG
60	WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
61	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT CG
62	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
63	AKEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
64	AKEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADECT
65	AAEQNPIY WARYADWLFTTALLLLDLALLV DADEGT
66	ACAEQNPIY WARYADWLFTTGLLLLDLALLV DADEGT
67	AEQNPIY WARYADFLFTTALLLLDLALLV DADE_T
68	AEQNPIY FARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
69	AEQNPIY FARYADFLFTTPLLLLDLALLW DADE_T
70	AKEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG_____
71	ACEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG_____
72	AEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG_____
73	AEDQNP_Y WARYADWLFTTPLLLLELALLV ECG_____
74	AKEDQNP_Y WRAYAD_LFT_PLTLLDLLALW DG_____
75	ACEDQNP_Y WRAYAD_LFT_PLTLLDLLALW DG_____
76	AKEDQNDP_Y WARYADWLFTTPLLLLDLALLV G_____
77	TEDADVLLALDLLLLPTTFLWDAYRAWYPNQECA
78	GGEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
79	AEQNPIY WARYADWLFTTPL
80	AEQNPIY WARYADWLFTTPCL

81	ACEQNPIY WARYADWLFTTPL
82	ACEQNPIY FARYADWLFTTPL
83	ACDDQNP WRAYLDLLFPTDTLLLDLLW
84	ACEEQNP WRAYLELLFPTETLLLELLW
85	ACDDQNP WARYLDWLFPTDTLLLDL
86	CDNNNP WRAYLDLLFPTDTLLLDW
87	ACEEQNP WARYLEWLFPTETLLLEL
88	ACEDQNP WARYADWLFPTTLLLLD
89	ACEEQNP WARYAEWLFPTTLLLLE
90	ACEDQNP WARYADLLFPTTLAW
91	ACEDQNP WARYAELLFPTTLW
92	KEDQNP WARYADLLFPTTLW
93	DDDEDNP IWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
94	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
95	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
96	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
97	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
98	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGIG
99	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADECT
100	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT
101	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLDLLALLVDADEGTCTG
102	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCTG
103	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
104	AAEQNPIYWARYAEWLFPTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
105	AAEQNPIYWARYAEWLFPTPLLLELALLVDADEGTCTG
106	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
107	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
108	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
109	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCTG
110	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLLNLALLVDADEGTG
111	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
112	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
113	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT
114	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVDADECT

115	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLLDGALLVDADECT
116	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVNANQGT
117	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTCG
118	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTCG
119	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVDADEGTKCG
120	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
121	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
122	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
123	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVNANQGT
124	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLLHGALLVNADECT
125	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLLHGALLVNANECT
126	ACEQNPIYWARYAKWLFTTPLLLLLKLALLVDADEGTG
127	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
128	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
129	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
130	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
131	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLLDLALLVDADEGT
132	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDALLVDADEGTCG
133	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
134	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT
135	AEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
136	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
137	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLLDLALLDADEGTCG
138	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
139	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLALALLVDADEGTCG
140	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTKCG EGTK(rodamina)C(faloidina)G
141	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLDADEGTKCG
142	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
143	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTC(faloidina)G
144	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTCG
145	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADET
146	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTG
147	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGT

148	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVNANQGT
149	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNADECT
150	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNANECT
151	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
152	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC(faloidina)G
153	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCG
154	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
155	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLBGALLVDADECT
156	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLDGALLVDADECT
157	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLBGALLVNADECT
158	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLBGALLVNANECT
159	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLIBGALLVDADECT
160	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLHLGALLVDADECT
161	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLDGALLVDADECT
162	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVDADECT
163	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNADECT
164	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNANECT
165	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNANECT
166	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNADECT
167	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLHLGALLVDADECT
168	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVDADECT
169	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLDGALLVDADECT
170	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVNANQGT
171	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNADECT
172	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLHLGALLVDADECT
173	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVDADECT
174	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLDGALLVDADECT
175	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNANECT
176	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLDGALLVDADECT
177	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLHLGALLVDADECT
178	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVDADECT
179	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNADECT
180	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLHLGALLVNANECT
181	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLLDLALLVDADEGT

182	GGEQNPIYWARYAWDLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
183	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
184	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
185	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
186	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
187	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
188	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
189	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
190	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
191	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
192	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
193	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
194	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
195	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
196	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
197	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
198	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
199	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
200	GGEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
201	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
202	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCTG
203	EGTK(ridamina)C(faloidina)G
204	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
205	ACEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTG
206	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCT(faloidina)G
207	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
208	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCTG
209	AAEQNPIYWARYADWLFTDLPLLLLDLALLVDADEGT
210	AAEQNPIYWARYAAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
211	GGEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
212	GGEQNPIYWAQDYAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
213	GGEQNPIYWARYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
214	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCTG
215	AAEQNPIYWARYAEWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCTG

216	AAEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLVDADEGTGCG
217	AAEQNPYIYARYADWLFTTPLLLELALLVDADEGTGCG
218	AAEQNPYIYARYAEWLFTTPLLLELALLVDADEGTGCG
219	AAEQNPYIYARYADWLFTTPLLLELALLVDADEGTCG
220	ACEQNPYIYARYAKWLFTTPLLKLALLVDADEGTG
221	ACEQNPYIYARYANWLFTTPLLNLALLVDADEGTG
222	AAEQNPYIYARYADWLFTTALLLLDLALLVDADEGT
223	AEQNPYIYARYADLLFPTTLAW
224	AEQNPYIYARYADLLFPTTLAF
225	AEQNPYIYARYADLLFPTTLAW
226	ACEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDADET
227	GGEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDADEGT
228	AAEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDADEGTGCG
229	AAEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDADEGTCG
230	AKEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDADECT
231	CCTCTTACCTCAGTTACA
232	D-Arg8 D-Arg8-CCTCTTACCTCAGTTACA
233	D-Lys4 D-Lys4-CCTCTTACCTCAGTTACA
234	S-S-CCTCTTACCTCAGTTACA
235	S-S-CCTCTGACCTCATTACA
236	D-Arg8-Deca D-Arg8-Deca-CCTCTTACCTCAGTTACA
237	D-Arg8-Deca-malapareamiento D-Arg8-Deca-CCTCTGACCTCATTACA
238	S-S-CCTCTTACCTCAGTTACA
239	AAEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDADEGTGCG
240	AEDQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDCG
241	AEDQNPYIYARYADWLFTTPLLLELALLVECG
242	AEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDADEGCT
243	ACEQNPYIYARYADWLFTTPLLALLDLALLVDADET
244	AE-QN-PI YWARYADWLFTTPLLALLDLALLV DADEGT-COOH
245	AEDQN-P- YWARYADWLFTTPLLALLDLALLV D---G--COOH
246	AEDQN-DP-YWARYADWLFTTPLLALLDLALLV----G--COOH
247	AEQNPYI YWARYADFLFTTPLLALLDLALLV DADET-COOH
248	AEQNPYI YFARYADWLFTTPLLALLDLALLV DADET-COOH
249	AEQNPYI YFARYADFLFTTPLLALLDLALLW DADET-COOH

250	AE-QN-PI YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGCT-COOH
251	AEDQN-PI YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DC--G-T-COOH
252	AEDQNDPI YWARYADWLFTTPLLLLELALLV EC--G-T-COOH
253	Chelate-ACEEQNPWARYLEWLFPTETLLEL
254	AEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT-COOH
255	AKEDQNPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG-COOH
256	AKEDQNDPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV G-COOH
257	AEQNPI YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGC-Biotina-T-COO H
258	AEDQNP YWARYADWLFTTPLLLLDLALLV DC-Biotina-G-COOH
259	AEDQNP YWARYADWLFTTPLLLLELALLV EC-Biotina-G-COOH
260	ACEQNPIY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DADEGT
261	ACEDQNPY WARYADWLFTTPLLLLDLALLV DG
262	ACEDQNPY WRAYADLFTPLTLLDLLALW DG
263	ACDDQNP WRAYLDLLFPTDTLLLDLLW
264	WRAYLELLFPTETLLELLW
265	WARYLDWLFPTDTLLLDL
266	WRAYLDLLFPTDTLLLDW
267	WARYLEWLFPTETLLEL
268	WAQYLELLFPTETLLEW
269	WRAYLELLFPTETLLEW
270	WARYADWLFPTTLLLD
271	WARYAEWLFPTTLLLE
272	ACEDQNP WARYADLLFPTTLAW
273	ACEEQNP WARYAELLFPTTLAW
274	Ac-TEDAD VLLALDLLLLPTTFLWDAYRAW YPNQECA-Am
275	CDDDDDNPNY WARYANWLFTTPLLLLNALLV EAEET
276	CDDDDDNPNY WARYAPWLFTTPLLLLPALLV EAEET
277	Ac-AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGCT
278	Ac-AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTG
279	ACEQNPIYWARYANWLFTTPLLLLNALLVDADEGT
280	Ac-AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGKCG
281	DDDEDNPIYWARYADWLFTTPLLLLHGALLVDADET
282	CDDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLHGALLVDADET
283	DDDEDNPIYWARYAHLFTTPLLLLHGALLVDADEGT

284	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNADEGT
285	DDDEDNPIYWARYAHWLFTTPLLLLLHGALLVNANEGT
286	AKEDQNDPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVG
287	AEDQNPYWARYADWLFTTPLLLLLLELALLVCG
288	AKDDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWC
289	ACEEQNPWRAYLELLFPTETLLLELLW
290	ACDDQNPWARYLDWLFTPTDTLLLDL
291	CDNNNPWRAYLDLLFPTDTLLLDW
292	CEEQQPWAQYLELLFPTETLLLEW
293	EEQQPWRAYLELLFPTETLLLEW
294	CDDDDDNPNYWARYANWLFTTPLLLLLNGALLVEAEET
295	CDDDDDNPNYWARYAPWLFTTPLLLLLPGALLVEAEE
296	AEQNPIYFARYADLLFPTTLAW
297	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAF
298	AEQNPIYWARYADLLFPTTLAW
299	KEDQNPWARYADLLFPTTLW
300	ACEEQNPQAEYAEWLFTPTLLLLLE
301	AAEEQNPWARYLEWLFTPTETLLLEL
302	AKEEQNPWARYLEWLFTPTETLLLEL
303	AAEQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGG
304	XXEXNPIYWAXXXXXLFTXXLLLXXXALLVXAXXXTXG
305	DAAEQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLLALLVDADEGTKGG
306	GGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGG
307	XXEXNPIYWAXXXXXLFTXXLLLXXXALLVXAXXXTGG
308	DGGEQNDPIYWARYADWLFTTPLLLLLDLLALLVDADEGCTXGG
309	AAEQNPYWARYADWLFTTPLLLLLDLALLVDADEGTGG
310	AEDQNPYWARYDWLFTTPLLLLLDLALLVDCG
311	GLAGLAGLLGLEGLLGLPLGLLEGLWLGLELEGN

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

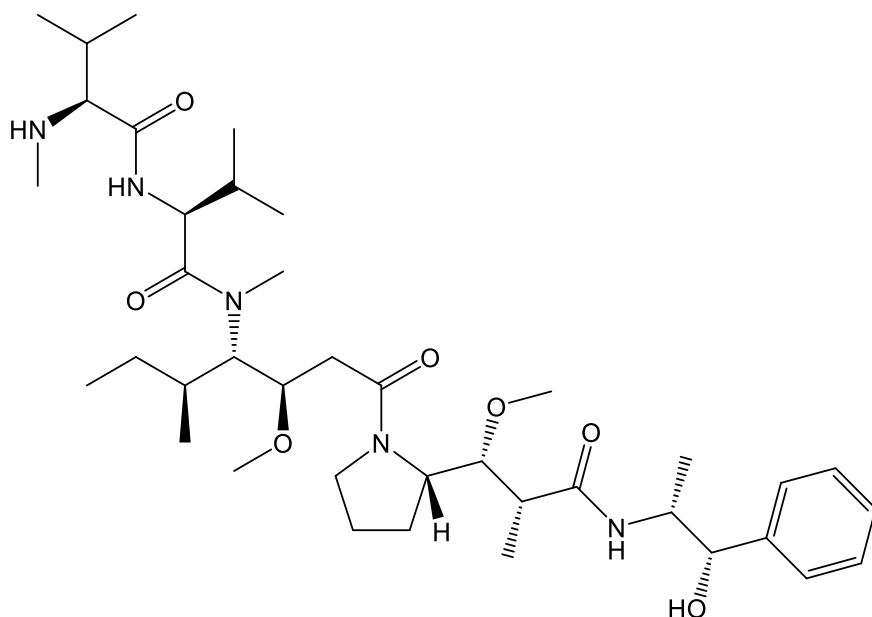
En algunas modalidades, el péptido de R¹ es un péptido conformacionalmente restringido. Un péptido conformacionalmente restringido puede incluir, por ejemplo, péptidos macrocíclicos y

péptidos grapado. Un péptido grapado es un péptido restringido por un enlace covalente entre dos cadenas laterales de aminoácidos, formando un péptido macrociclo. Los péptidos conformacionalmente restringidos se describen, por ejemplo, en Guerlavais et ál., *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 2014, 49, 331-345; Chang et ál., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States de America* (2013), 110(36), E3445-E3454; Tesauro et ál., *Molecules* 2019, 24, 351-377; Dougherty et ál., *Journal of Medicinal Chemistry* (2019), 62(22), 10098-10107; y Dougherty et ál., *Chemical Reviews* (2019), 119(17), 10241-10287, cada una de las cuales se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene de 10 a 50 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene de 20 a 40 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene de 20 a 40 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene de 10 a 20 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene de 20 a 30 aminoácidos. En algunas modalidades, R^1 es un péptido que tiene de 30 a 40 aminoácidos.

La frase “inhibidores peptídicos de tubulina” (por ejemplo, R^2) se refiere a compuestos que comprenden al menos dos aminoácidos y son inhibidores de la polimerización de tubulina. En algunas modalidades, el inhibidor peptídico de tubulina es un inhibidor peptídico de tubulina de molécula pequeña. En algunas modalidades, el inhibidor peptídico de tubulina tiene menos de 1500 Da. En algunas modalidades, el inhibidor peptídico de tubulina es un compuesto de auristatina, dolastatina o tubulisina, o derivados de estas.

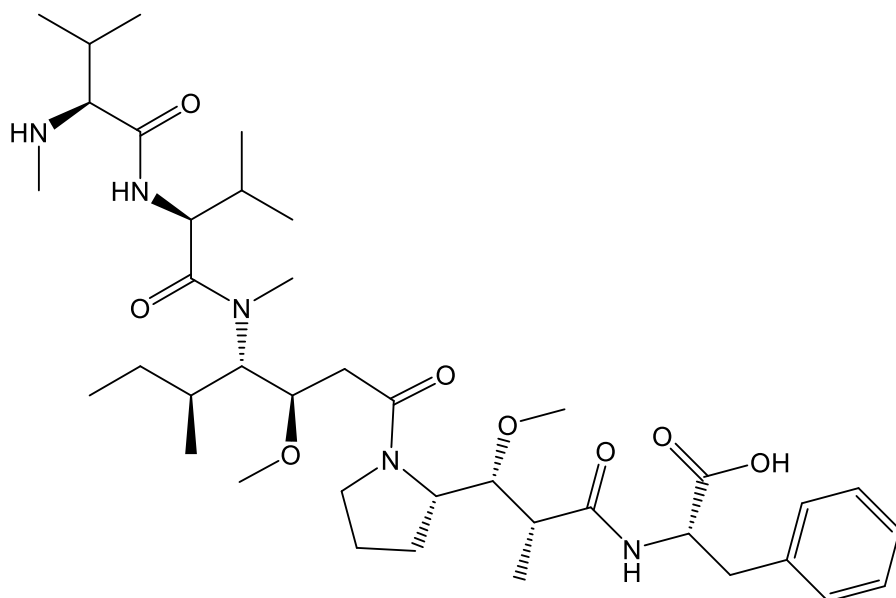
Los compuestos de auristatina adecuados (por ejemplo, R^2) incluyen derivados de auristatina que presentan actividad antitubulina (por ejemplo, la inhibición de la polimerización de tubulina). Los compuestos de auristatina son conocidos en la técnica y se han utilizado como parte de conjugados de anticuerpo y fármaco. Véase, por ejemplo, S.O. Doronina and P.D. Senter in *Cytotoxic Payloads for Antibody-Drug Conjugates* (Royal Society for Chemistry, 2019), Chapter 4: Auristatin Payloads for Antibody-Drug Conjugates, p73-99; N. Joubert, A. Beck, C. Dumontet, C. Denevault-Sabourin, *Pharmaceuticals*, 2020, 13, 245; J.D. Bargh, A. Isidrio-Llobet, J.S. Parker, D.R. Spring, *Chem. Soc. Rev.*, 2019, 48, 4361-4374; y Kostova, V., Désos, P., Starck, J.-B., Kotschy, A, *The Chemistry Behind ADCs*, *Pharmaceuticals* 2021, 14, 442; Mckertish et ál., *Biomedicines*, 2021, 9(8):872, pp. 1-25, cada uno de los cuales se incorpora mediante referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, la auristatina es una monometil auristatina. Hay dos clases principales de auristatinas: moléculas de monometil auristatina tipo E y compuestos de monometil auristatina F. La estructura de la monometil auristatina E se muestra a continuación:



La monometil auristatina E también puede denominarse “MMAE”.

La estructura de la monometil auristatina F se muestra a continuación:



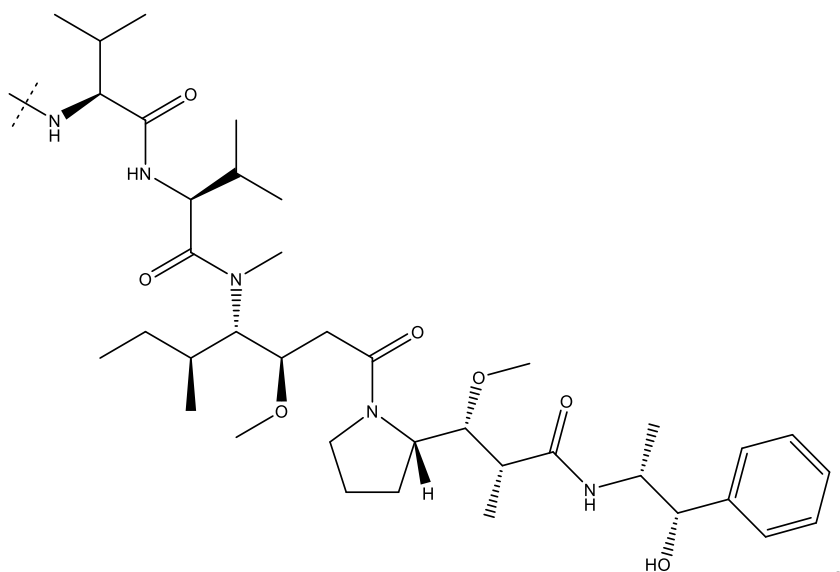
La monometil auristatina F también puede denominarse “MMAF”.

En algunas modalidades, R^2 es un radical de un compuesto de monometil auristatina.

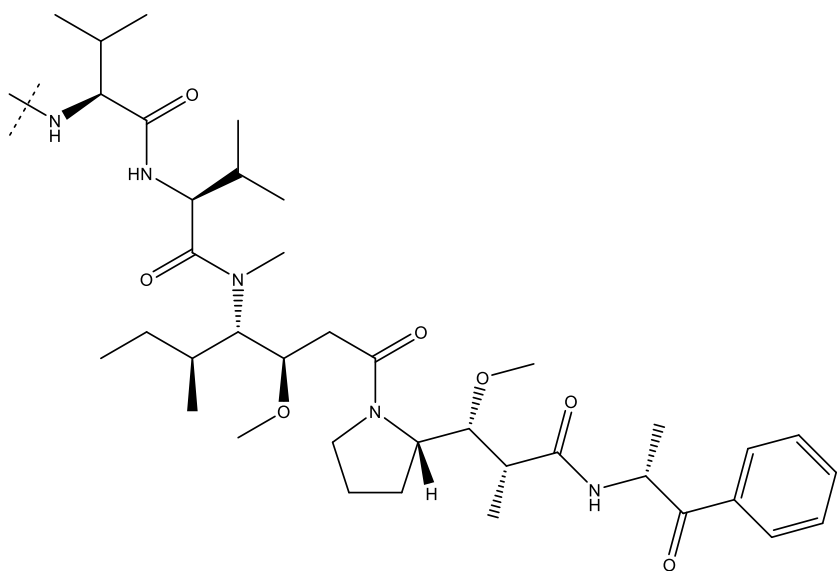
En algunas modalidades, R^2 es un radical de monometil auristatina E.

En algunas modalidades, R^2 es un radical de monometil auristatina F.

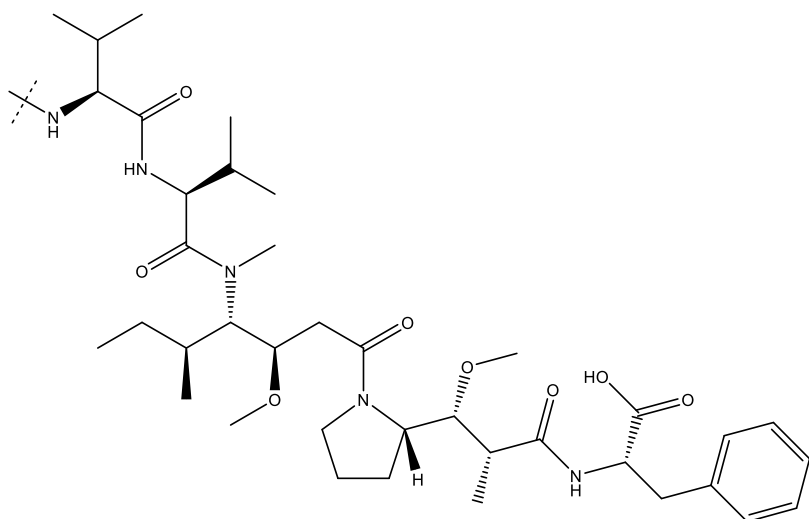
En algunas modalidades, R^2 tiene la siguiente estructura:



En algunas modalidades, R^2 tiene la siguiente estructura:

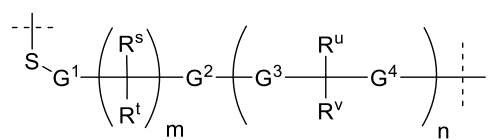


En algunas modalidades, R^2 tiene la siguiente estructura:

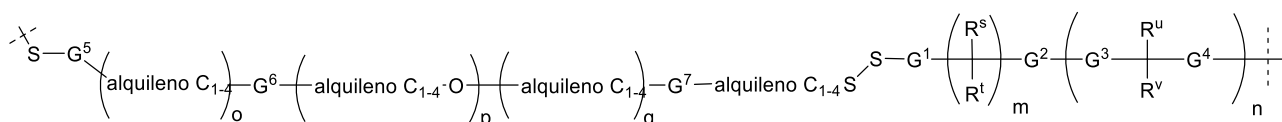


En algunas modalidades, L es un resto de unión que conecta covalentemente R^1 y R^2 , y funciona para liberar un resto que contiene R^2 en las proximidades de tejido ácido o hipóxico, tal como dentro de una célula de tejido enfermo.

En algunas modalidades, L es un enlazador que tiene la siguiente estructura:



En algunas modalidades, L es un enlazador que tiene la siguiente estructura:



En algunas modalidades, G^1 se selecciona de un enlace, arilo C_{6-10} , cicloalquilo C_{3-14} , heteroarilo de 5-14 miembros y heterocicloalquilo de 4-14 miembros. En algunas modalidades, G^1 se selecciona de un enlace, arilo C_{6-10} y cicloalquilo C_{3-14} . En algunas modalidades, G^1 se selecciona de arilo C_{6-10} y cicloalquilo C_{3-14} .

En algunas modalidades, G^1 se selecciona de cicloalquilo C_{3-14} .

En algunas modalidades, Z^1 es un enlace.

En algunas modalidades, G^1 se selecciona de un enlace, fenilo y cicloalquilo C_{4-6} . En algunas modalidades, G^1 se selecciona de fenilo y cicloalquilo C_{4-6} .

En algunas modalidades, G^1 es cicloalquilo C_{3-14} .

En algunas modalidades, G^1 es ciclopentilo o ciclohexilo, donde dichos ciclopentilo y ciclohexilo están cada uno opcionalmente fusionados con un grupo fenilo.

En algunas modalidades, G^1 es fenilo.

En algunas modalidades, G^1 es ciclopentilo, ciclohexilo o fenilo, donde dichos ciclopentilo y ciclohexilo están cada uno opcionalmente fusionados con un grupo fenilo.

En algunas modalidades, cada R^s y R^t se selecciona independientemente de H y alquilo C_{1-6} .

En algunas modalidades, cada R^s y R^t se selecciona independientemente de H e isopropilo.

En algunas modalidades, cada R^s y R^t se selecciona independientemente de H, metilo e isopropilo.

En algunas modalidades, R^s y R^t junto con el átomo de C al cual se unen forman un grupo cicloalquilo C_{4-6} .

En algunas modalidades, R^s y R^t junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo de ciclobutilo.

En algunas modalidades, m es 0, 1 o 2. En algunas modalidades, m es 0. En algunas modalidades, m es 1. En algunas modalidades, m es 2.

En algunas modalidades, G^2 se selecciona de $-OC(O)-$ y $-OC(O)NR^G-$.

En algunas modalidades, G^2 es $-OC(O)-$.

En algunas modalidades, G^3 se selecciona de arilo C_{6-10} y heteroarilo de 5-14 miembros.

En algunas modalidades, G^3 es arilo C_{6-10} .

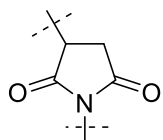
En algunas modalidades, G^3 es fenilo.

En algunas modalidades, R^u y R^v son cada uno H.

En algunas modalidades, G^4 es $-OC(O)-$.

En algunas modalidades, G^5 es heterocicloalquilo de 4-14 miembros, donde dicho heterocicloalquilo de 4-14 miembros de G^5 se sustituye opcionalmente con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , CN, NO_2 , OR^a , SR^a , $C(O)R^b$, $C(O)NR^cR^d$, $C(O)OR^a$, $OC(O)R^b$, $OC(O)NR^cR^d$, $C(=NR^e)NR^cR^d$, $NR^cC(=NR^e)NR^cR^d$, NR^cR^d , $NR^cC(O)R^b$, $NR^cC(O)OR^a$, $NR^cC(O)NR^cR^d$, $NR^cS(O)R^b$, $NR^cS(O)_2R^b$, $NR^cS(O)_2NR^cR^d$, $S(O)R^b$, $S(O)NR^cR^d$, $S(O)_2R^b$ y $S(O)_2NR^cR^d$, donde dicho sustituyente de alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} de G^5 se sustituye opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de CN, NO_2 , OR^a , SR^a , $C(O)R^b$, $C(O)NR^cR^d$, $C(O)OR^a$, $OC(O)R^b$, $OC(O)NR^cR^d$, $C(=NR^e)NR^cR^d$, $NR^cC(=NR^e)NR^cR^d$, NR^cR^d , $NR^cC(O)R^b$, $NR^cC(O)OR^a$, $NR^cC(O)NR^cR^d$, $NR^cS(O)R^b$, $NR^cS(O)_2R^b$, $NR^cS(O)_2NR^cR^d$, $S(O)R^b$, $S(O)NR^cR^d$, $S(O)_2R^b$ y $S(O)_2NR^cR^d$.

En algunas modalidades, G^5 es el siguiente grupo:



En algunas modalidades, G^6 es $-NR^G C(O)-$.

En algunas modalidades, G^7 es $-NR^G C(O)-$.

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

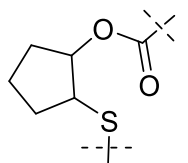
En algunas modalidades, o es 0. En algunas modalidades, o es 1.

En algunas modalidades, p es 2, 3, 4 o 5. En algunas modalidades, p es 3, 4 o 5. En algunas modalidades, p es 3. En algunas modalidades, p es 4. En algunas modalidades, p es 5.

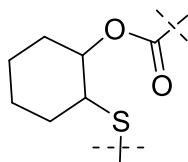
En algunas modalidades, q es 0. En algunas modalidades, q es 1.

En algunas modalidades, cada R^G se selecciona independientemente de H y metilo. En algunas modalidades, cada R^G es H. En algunas modalidades, cada R^G es metilo.

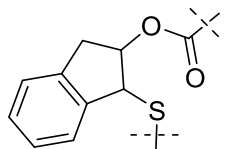
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



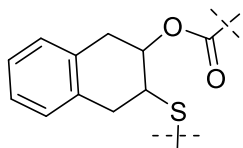
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



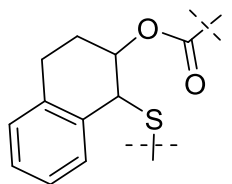
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



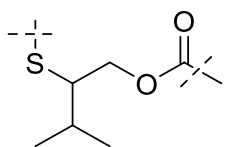
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



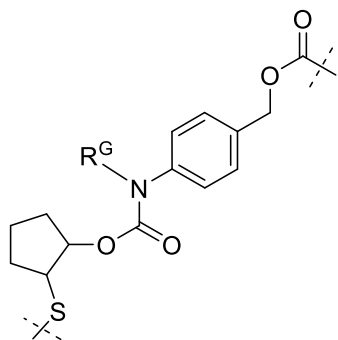
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



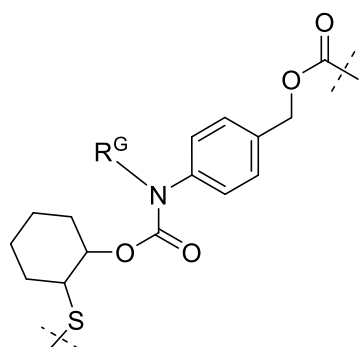
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



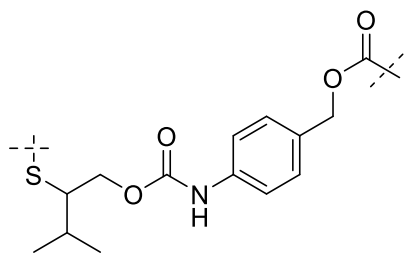
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



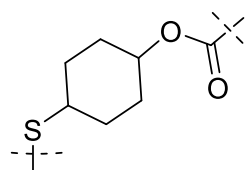
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



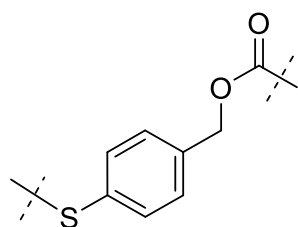
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



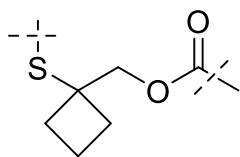
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



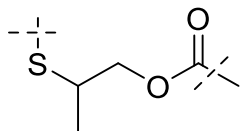
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



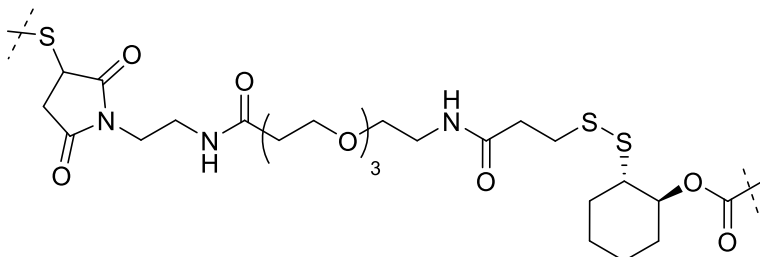
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



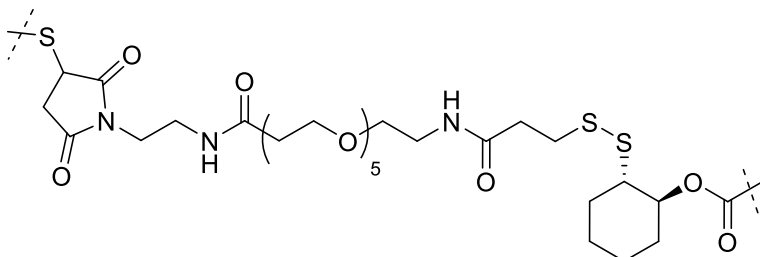
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



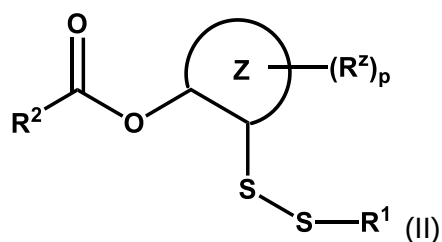
En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



En algunas modalidades, L tiene la siguiente estructura:



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



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

R^1 es un péptido;

R^2 es un radical de un inhibidor peptídico de tubulina;

El Anillo Z es un anillo cicloalquilo C_{5-7} monocíclico o un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico;

cada R^2 se selecciona independientemente de halo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , CN, NO_2 , OR^a , SR^a , $C(O)R^b$, $C(O)NR^cR^d$, $C(O)OR^a$, $OC(O)R^b$, $OC(O)NR^cR^d$,

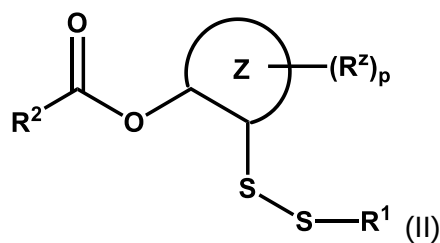
NR^cR^d , $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ y $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$;

o dos R^z adyacentes junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo cicloalquilo C_{5-7} monocíclico fusionado, un anillo heterocicloalquilo monocíclico fusionado de 5-7 miembros, un anillo arilo C_{6-10} fusionado o un anillo heteroarilo fusionado de 6-10 miembros, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo C_{1-6} , CN , NO_2 , OR^a , SR^a , $\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, $\text{OC}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$, NR^cR^d , $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, and $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$;

R^a , R^b , R^c y R^d se selecciona cada uno independientemente de H, alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{2-4} , alquinilo C_{2-4} , cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, OH, CN y NO_2 ; y

p es 0, 1, 2 o 3.

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



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

R^1 es un péptido;

R^2 es un radical de un compuesto de auristatina;

El Anillo Z es un anillo cicloalquilo C_{5-7} monocíclico o un anillo heterocicloalquilo de 5-7 miembros monocíclico;

cada R^z se selecciona independientemente de halo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , haloalquilo C_{1-6} , CN , NO_2 , OR^a , SR^a , $\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, $\text{OC}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$, NR^cR^d , $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ y $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$;

o dos R^z adyacentes junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo cicloalquilo C_{5-7} monocíclico fusionado, un anillo heterocicloalquilo monocíclico fusionado de 5-7 miembros, un anillo arilo C_{6-10} fusionado o un anillo heteroarilo fusionado de 6-10 miembros, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo C_{1-6} , CN , NO_2 , OR^a , SR^a , $\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, $\text{OC}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$, NR^cR^d , $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{R}^b$, $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, and $\text{NR}^c\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^d$;

R^a , R^b , R^c y R^d se selecciona cada uno independientemente de H, alquilo C_{1-4} , alquenilo C_{2-4} , alquinilo C_{2-4} , cada uno sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, OH, CN y NO_2 ; y

p es 0, 1, 2 o 3.

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

En algunas modalidades de compuestos de Fórmula (II), R^1 es Pv1, Pv2 o Pv3.

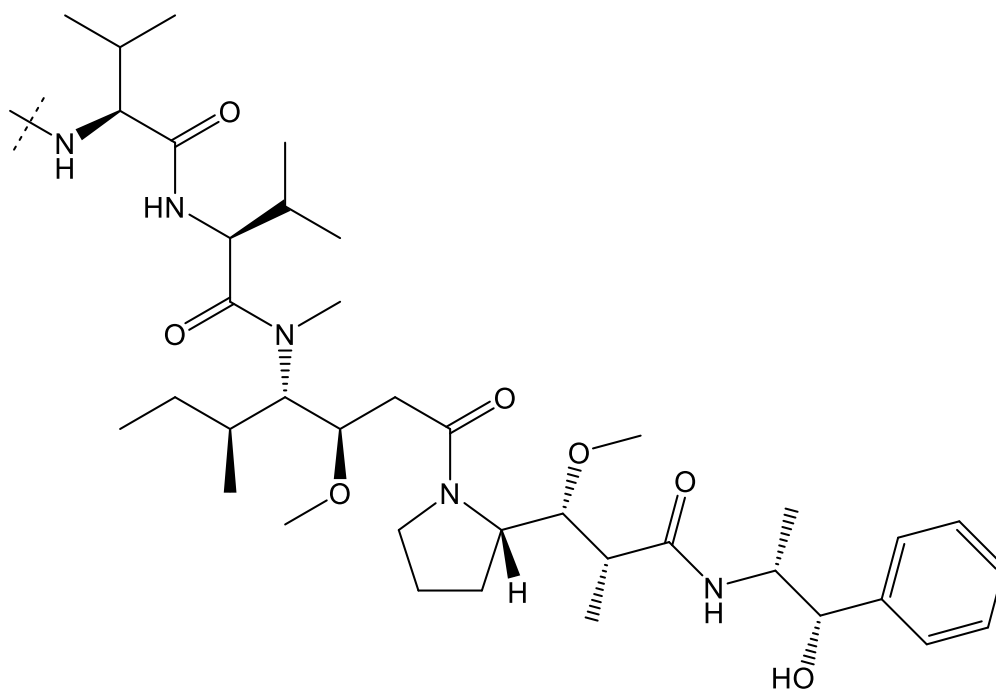
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^1 se une al núcleo a través de un residuo de cisteína de R^1 donde uno de los átomos de azufre del resto de disulfuro en la Fórmula II se deriva del residuo de cisteína.

En algunas modalidades de compuestos de Fórmula (II), R^2 es un radical de un compuesto de monometil auristatina.

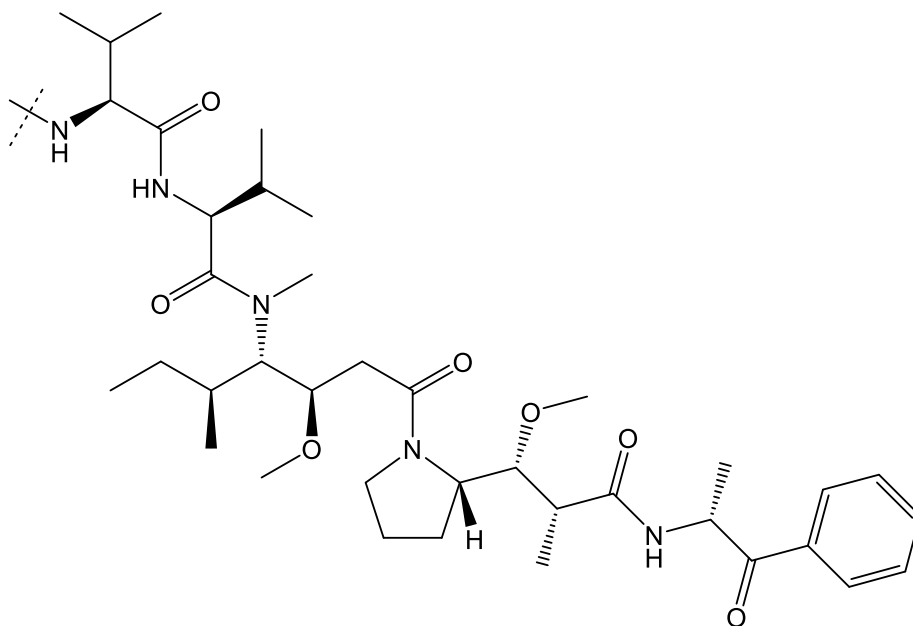
En algunas modalidades de compuestos de Fórmula (II), R^2 es un radical de monometil auristatina E.

En algunas modalidades de compuestos de Fórmula (II), R^2 es un radical de monometil auristatina E.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^2 tiene la siguiente estructura:



En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), R^2 tiene la siguiente estructura:



En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), el Anillo Z es un anillo cicloalquilo C₅₋₇ monocíclico.

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

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

En algunas modalidades de compuestos de Fórmula (II), dos R^Z adyacentes junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo cicloalquilo C₅₋₇ monocíclico fusionado, un anillo heterocicloalquilo monocíclico fusionado de 5-7 miembros, un anillo arilo C₆₋₁₀ fusionado o un anillo heteroarilo fusionado de 6-10 miembros, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo C₁₋₄, CN, NO₂, OR^a, SR^a, C(O)R^b, C(O)NR^cR^d, C(O)OR^a, OC(O)R^b, OC(O)NR^cR^d, NR^cR^d, NR^cC(O)R^b, NR^cC(O)OR^a, and NR^cC(O)NR^cR^d.

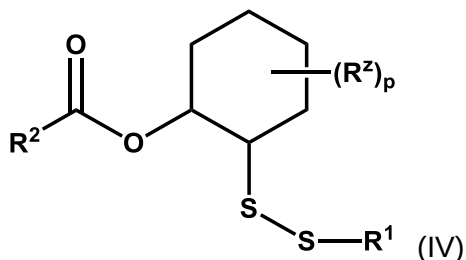
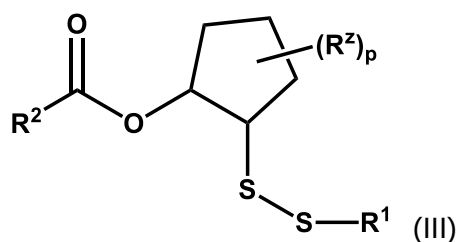
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmula (II), p es 0.

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

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

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

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



o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, donde R^1 , R^2 , R^Z y p son como se definen en la presente.

En algunas modalidades de los compuestos de Fórmulas (III) y (IV), R^1 es un péptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

En algunas modalidades de compuestos de Fórmulas (III) y (IV), R^1 es Pv1, Pv2 o Pv3.

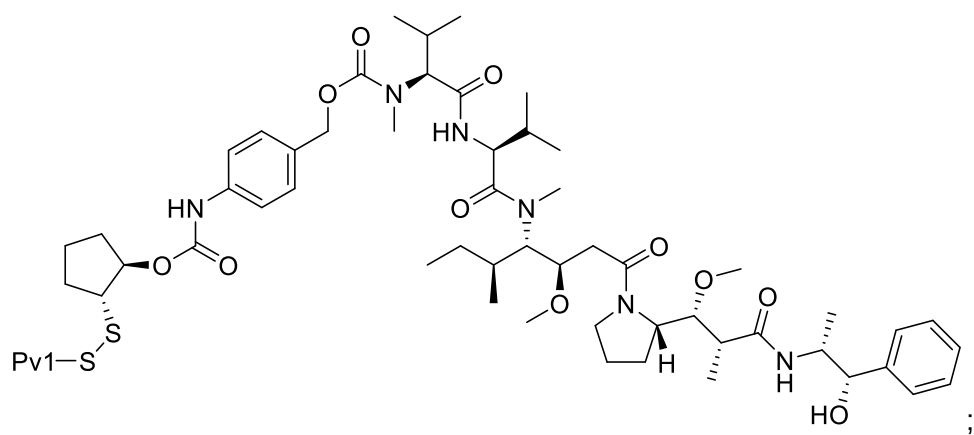
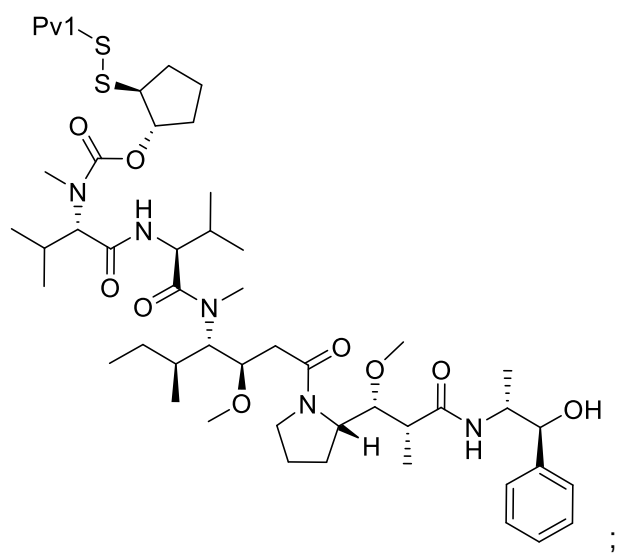
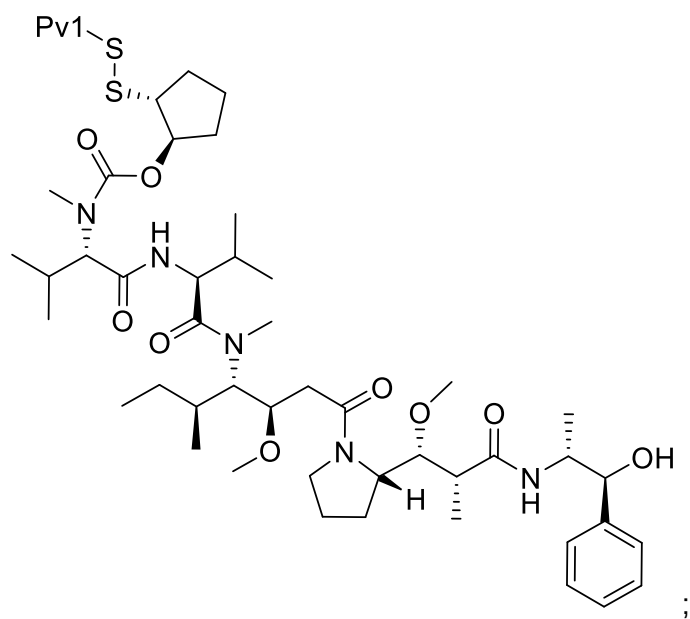
En algunas modalidades de los compuestos de Fórmulas (III) y (IV), R^1 se une al núcleo a través de un residuo de cisteína de R^1 donde uno de los átomos de azufre del resto de disulfuro en la Fórmulas (III) y (IV) se deriva del residuo de cisteína.

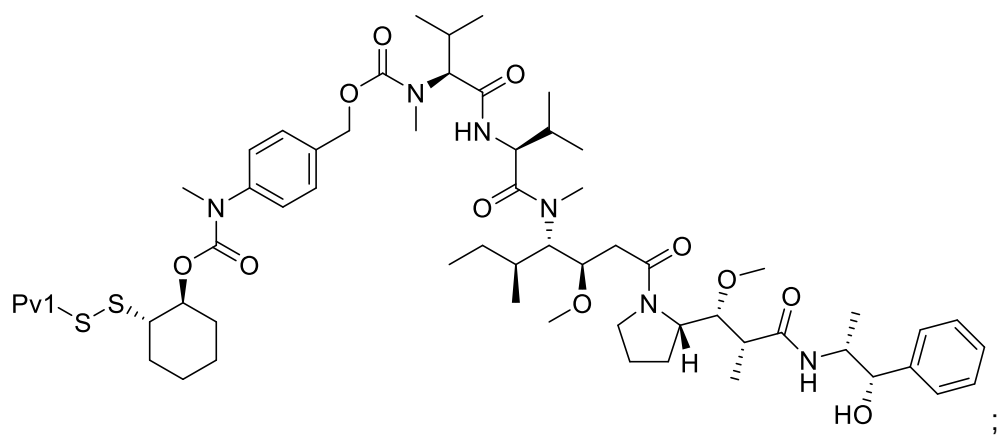
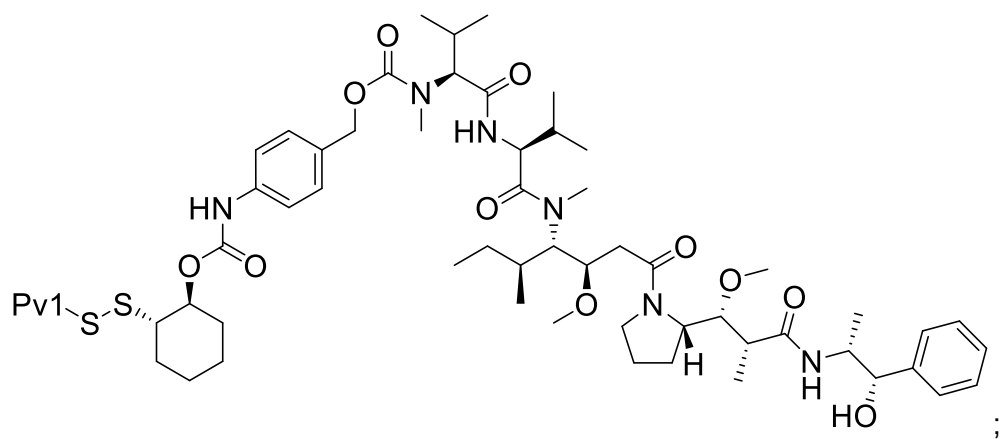
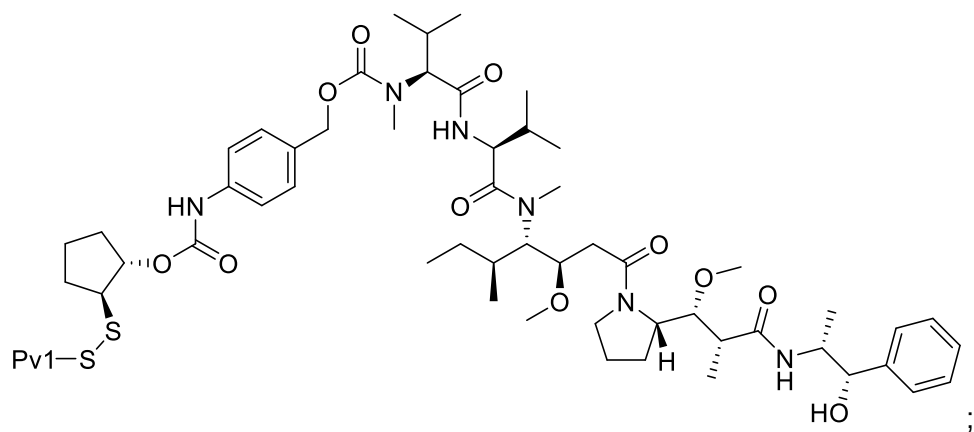
En algunas modalidades de compuestos de Fórmulas (III) y (IV), R^2 es un radical de un compuesto de monometil auristatina.

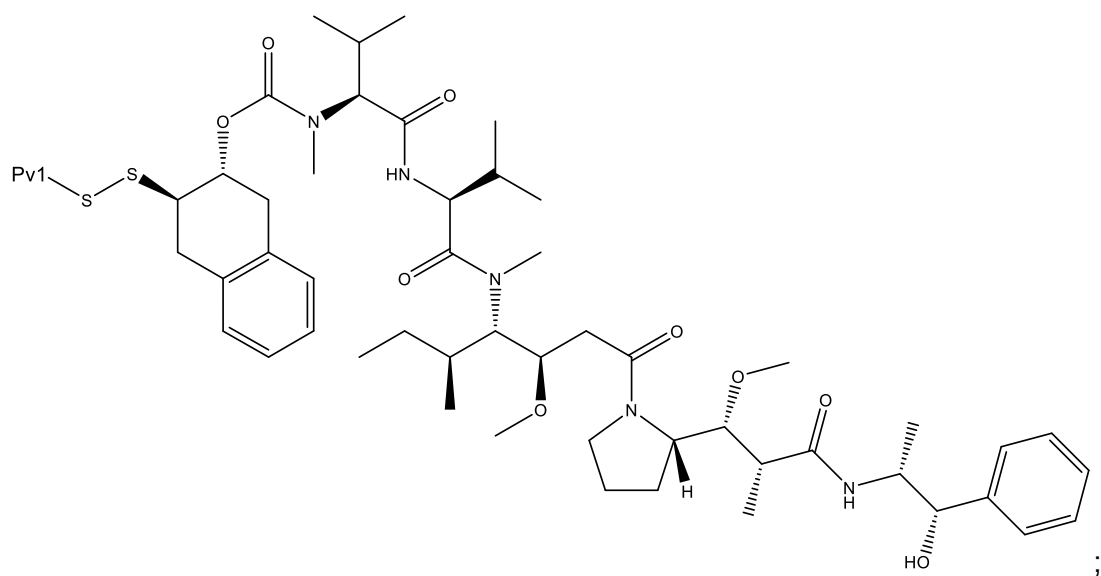
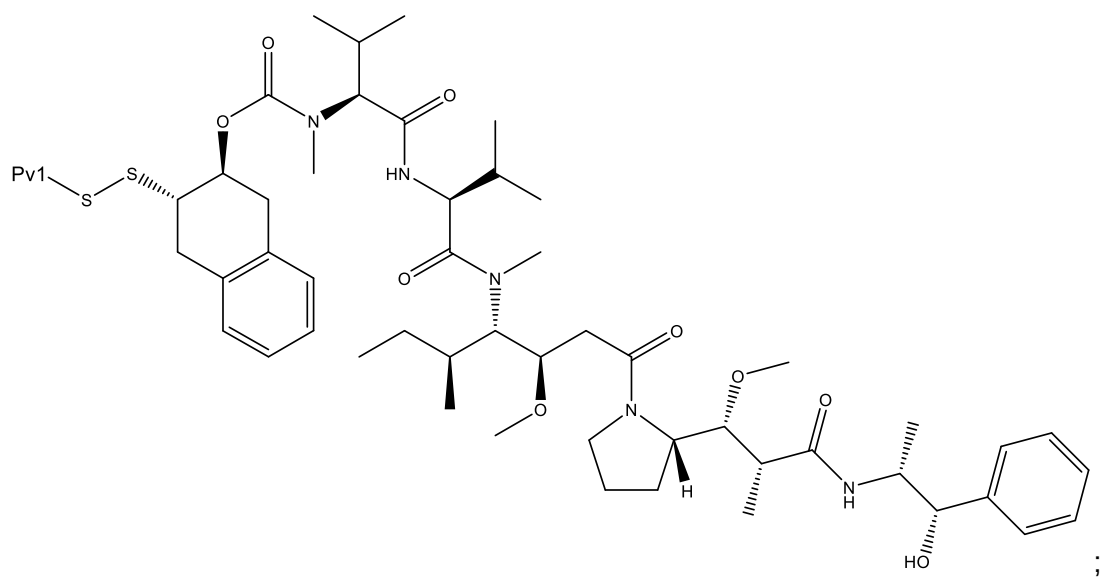
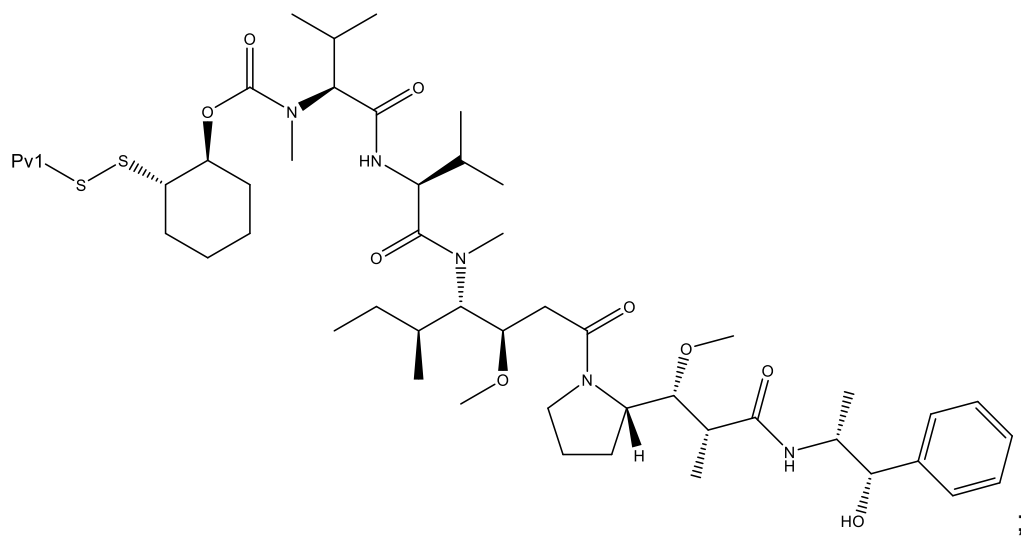
En algunas modalidades de compuestos de Fórmulas (III) y (IV), R^2 es un radical de monometil auristatina E.

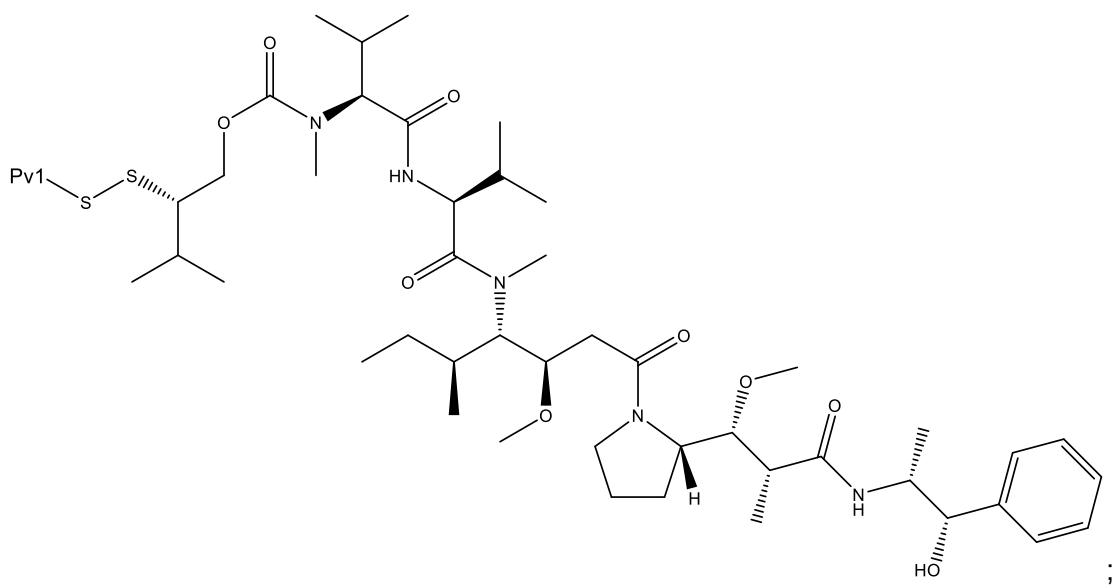
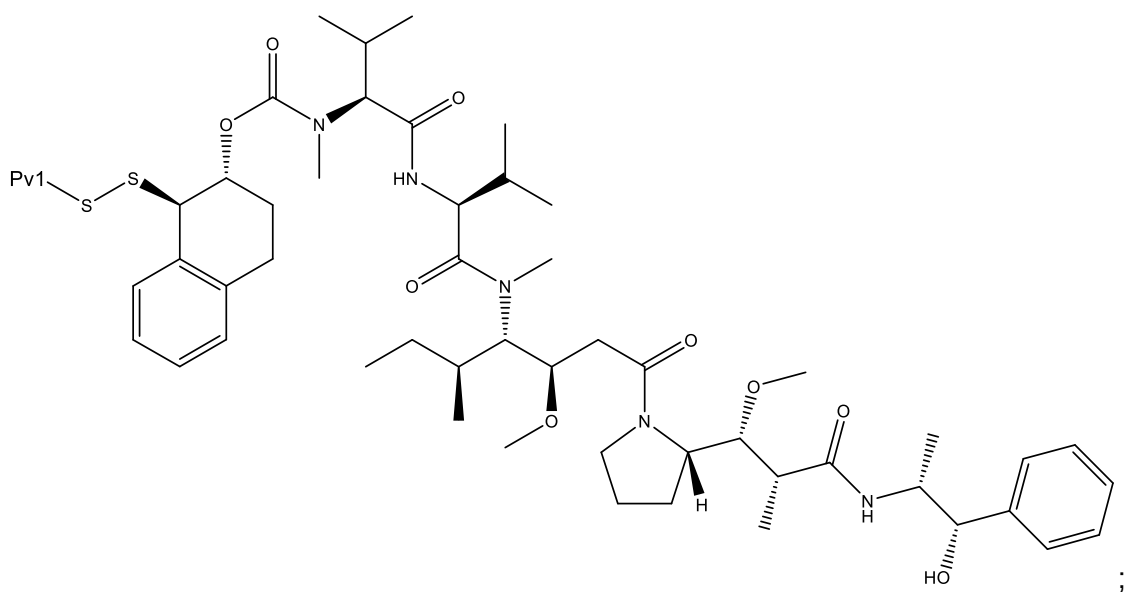
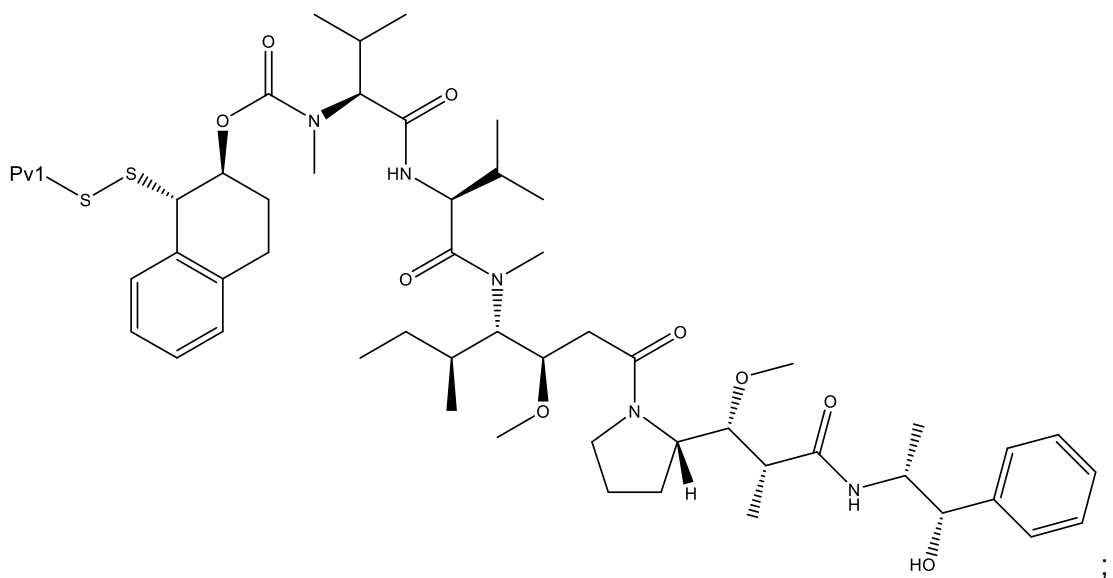
En algunas modalidades de compuestos de Fórmulas (III) y (IV), R^2 es un radical de monometil auristatina F.

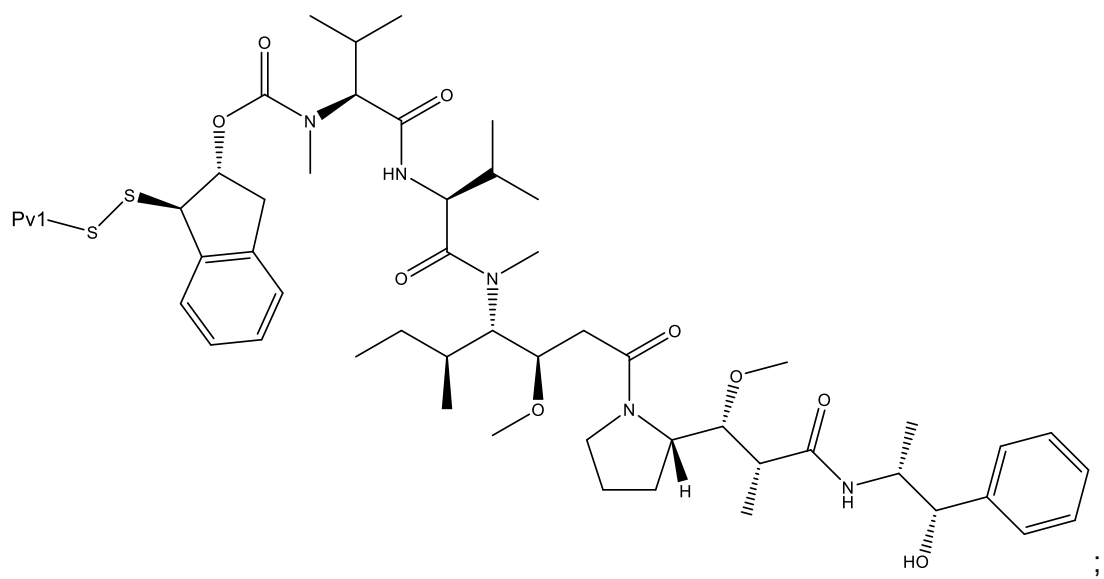
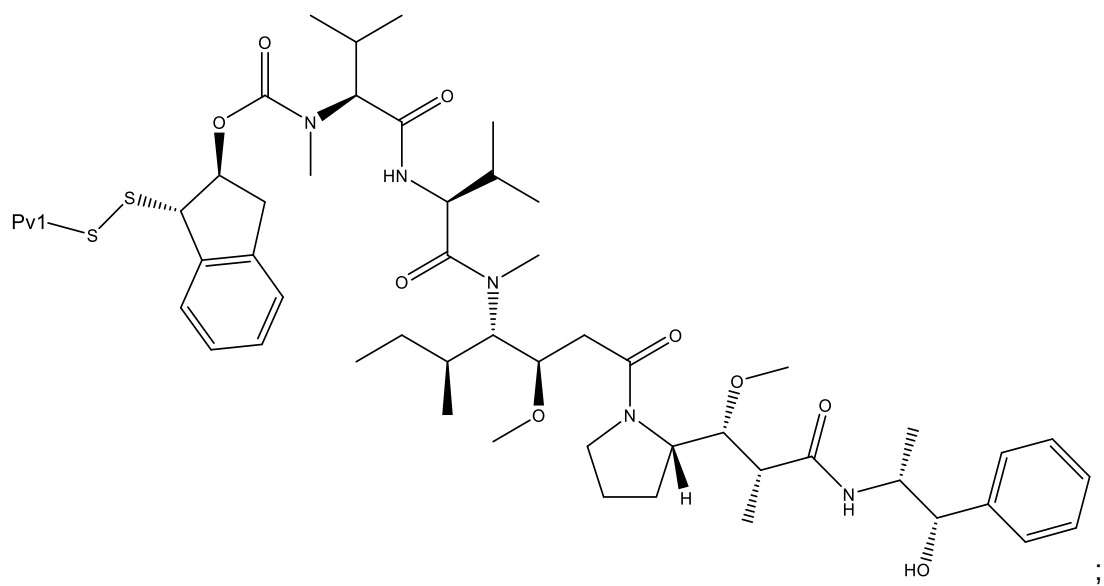
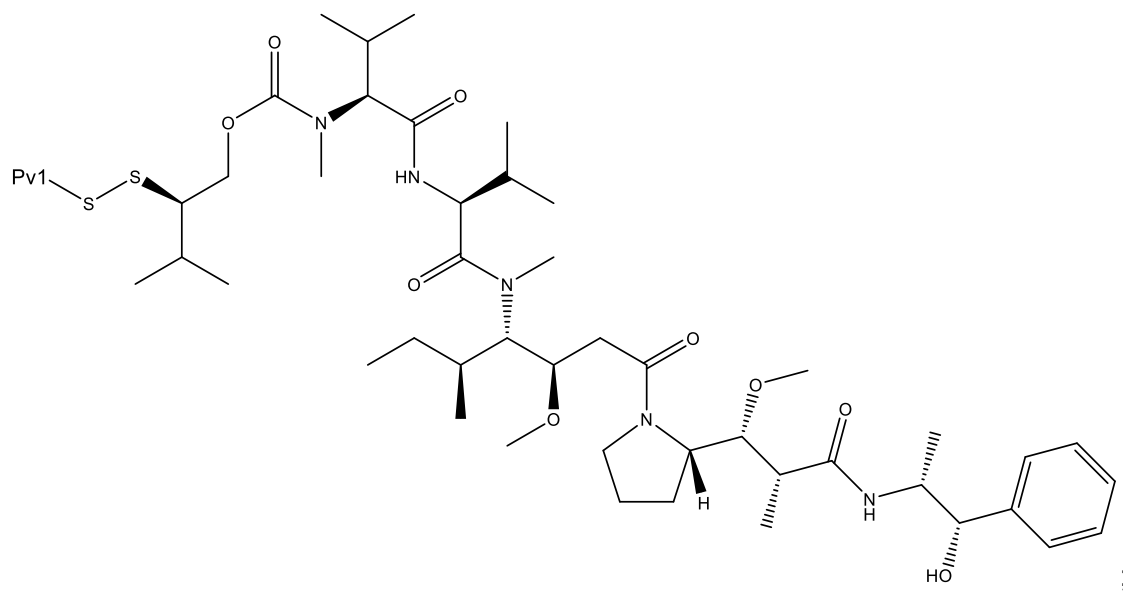
En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona de:



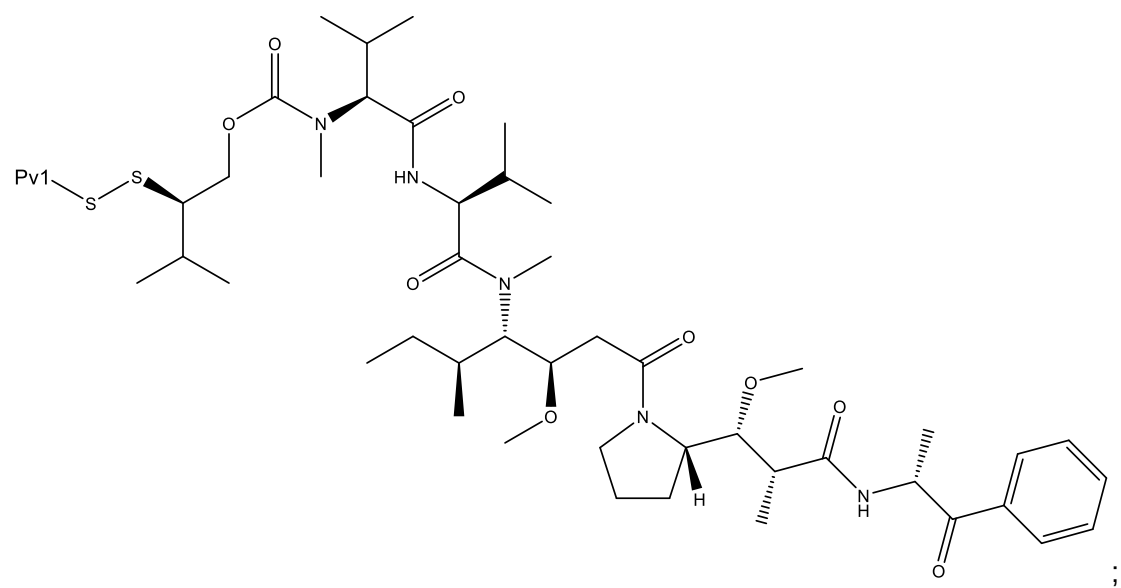
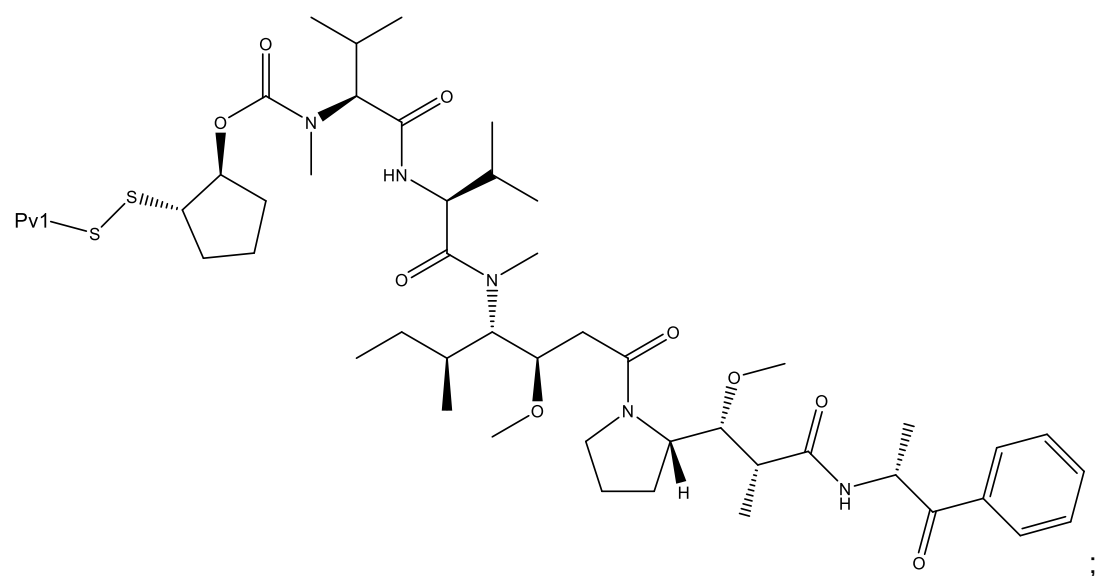
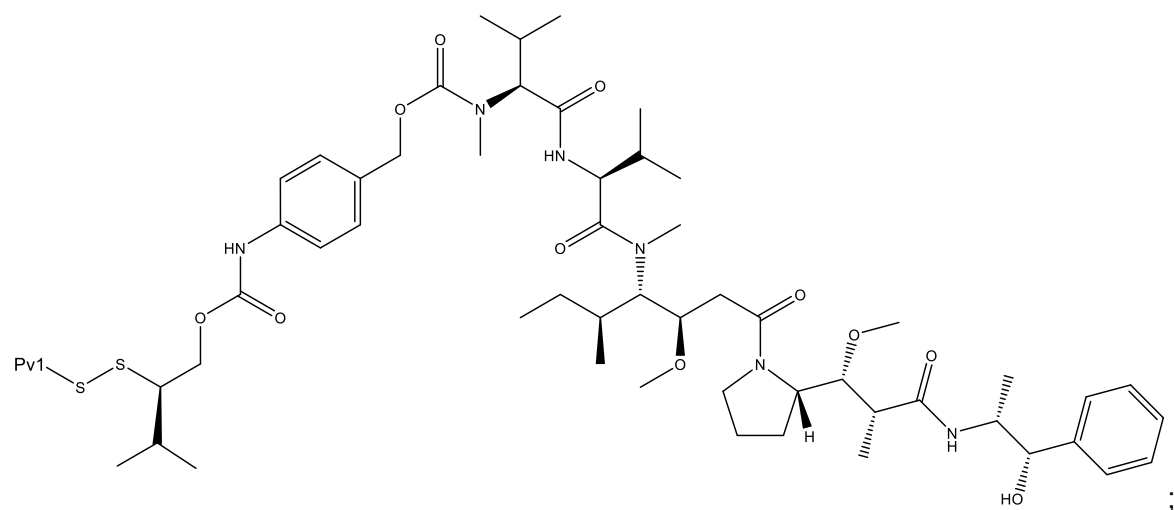


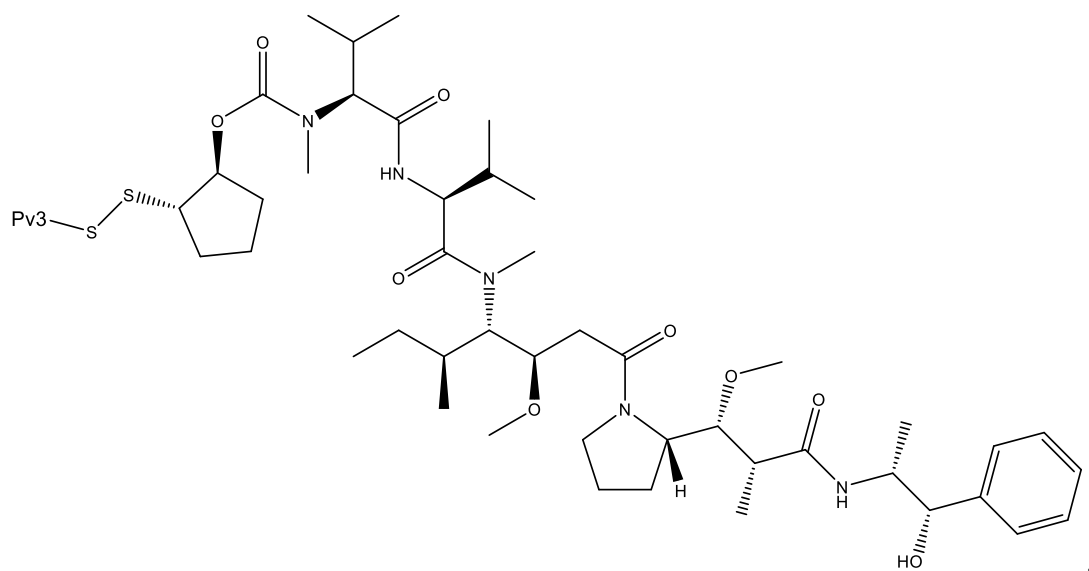
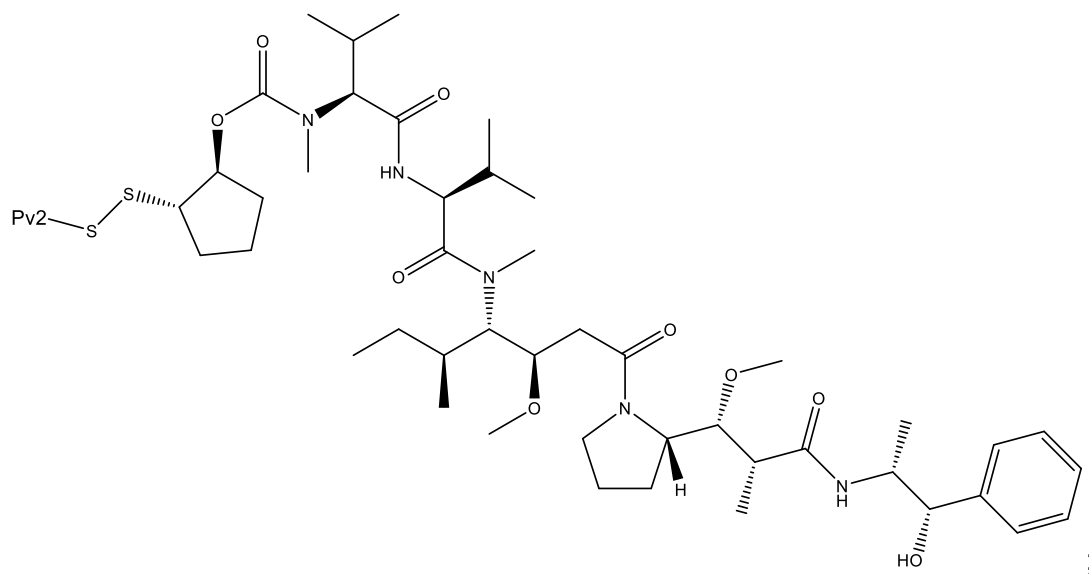






41





o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente, donde:

Pv1 es un péptido que comprende la siguiente secuencia:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO: 1);

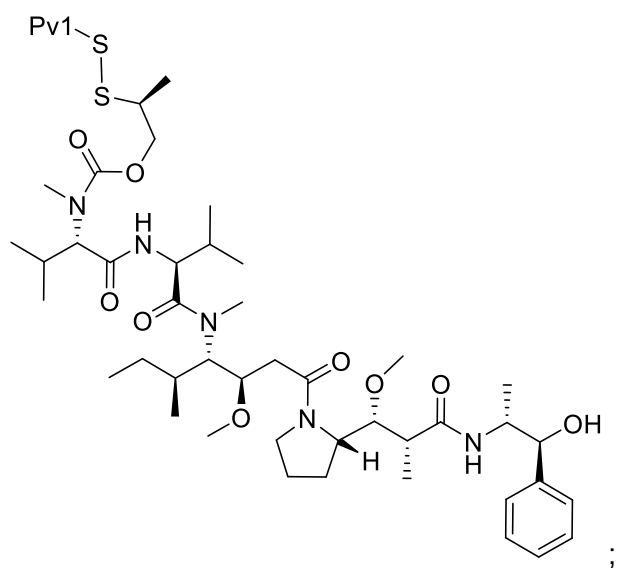
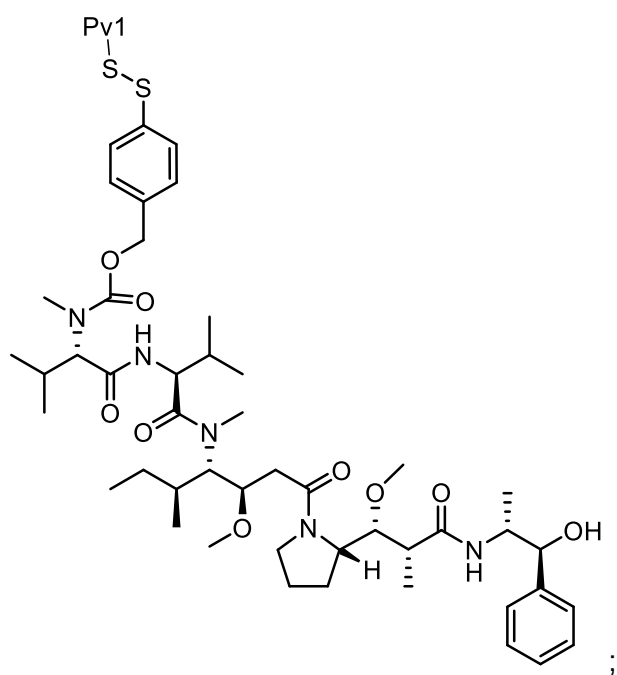
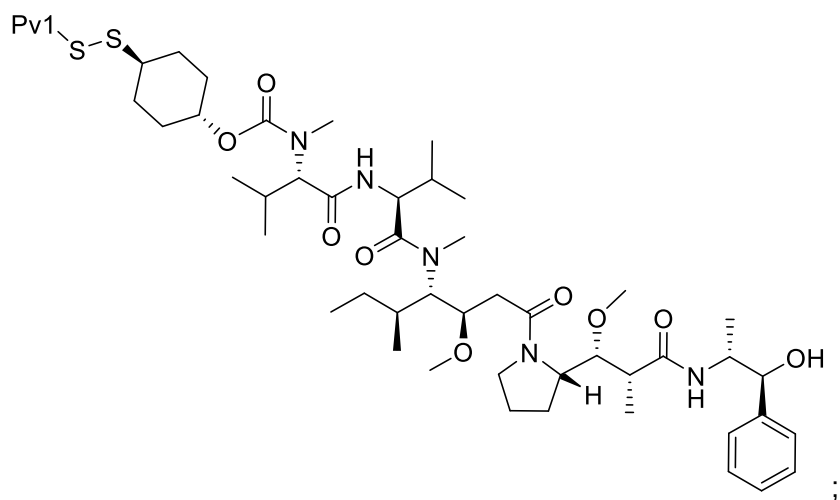
Pv2 es un péptido que comprende la siguiente secuencia:

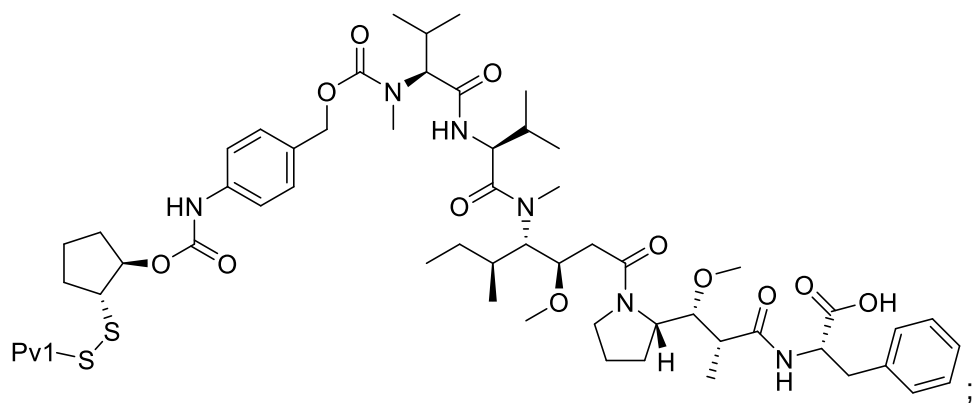
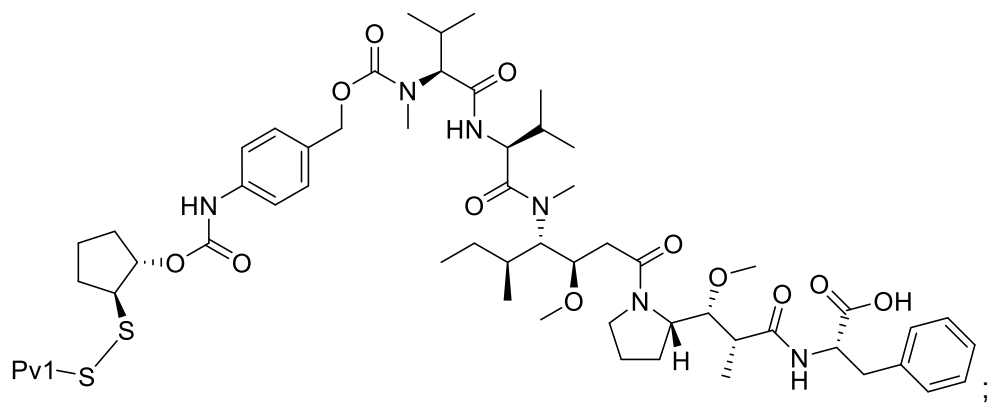
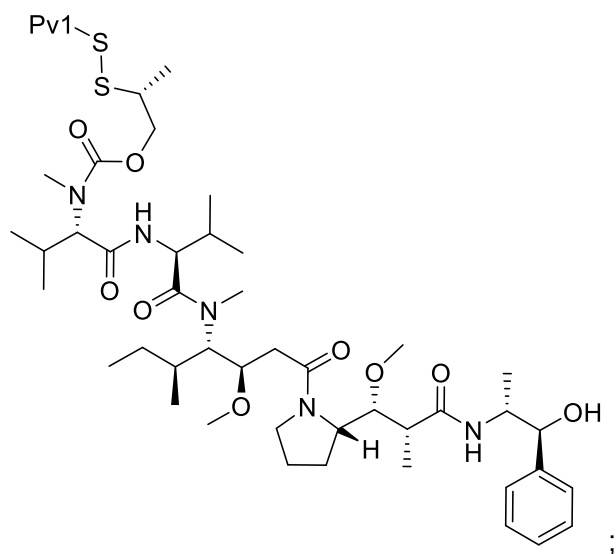
AEQNPIYWARYADWLFTTPLLILLDLALLVDADECG (SEQ ID NO: 2); y

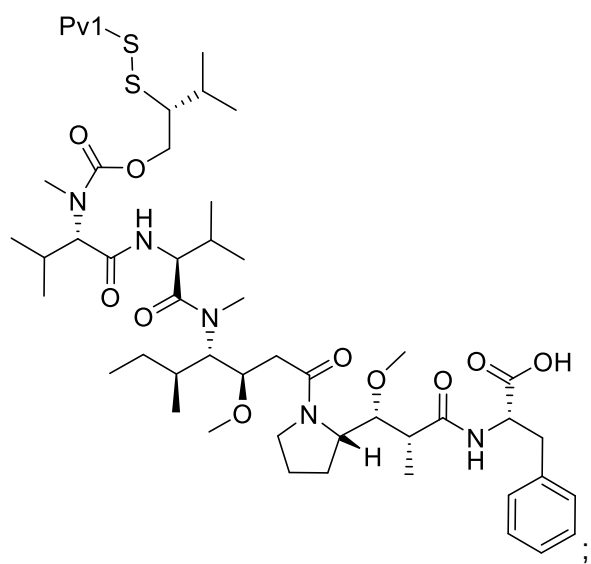
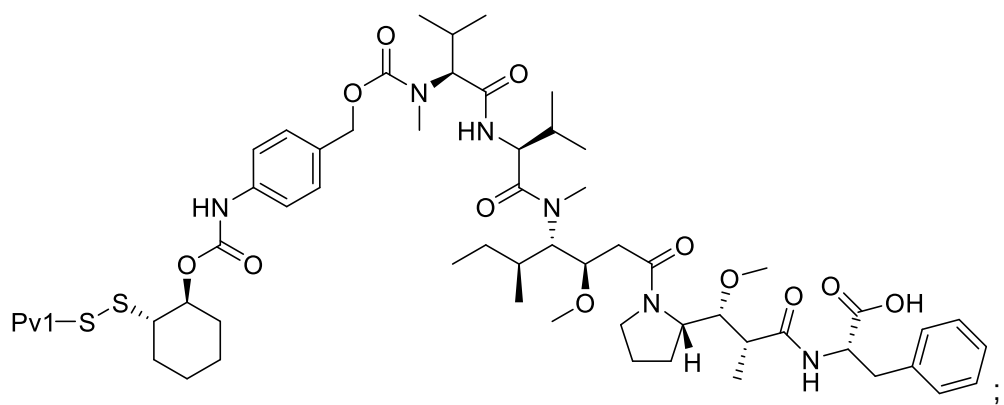
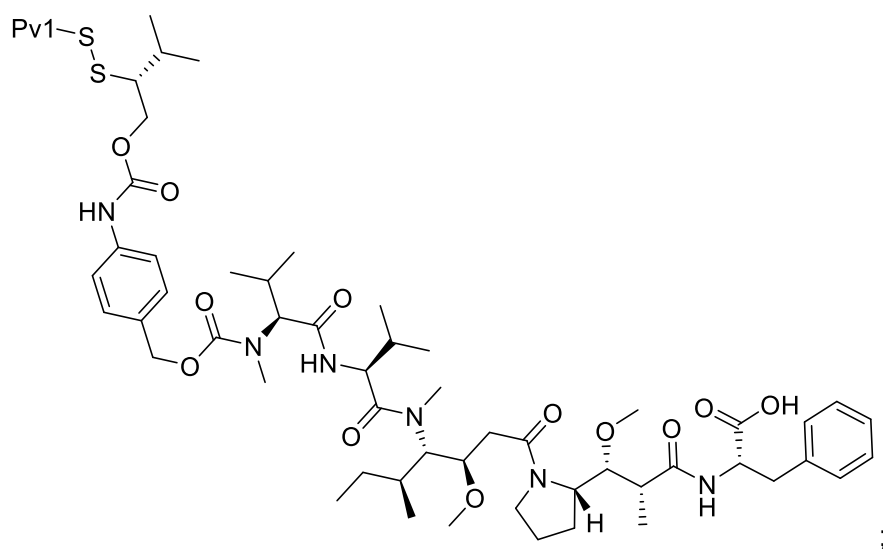
Pv3 es un péptido que comprende la siguiente secuencia:

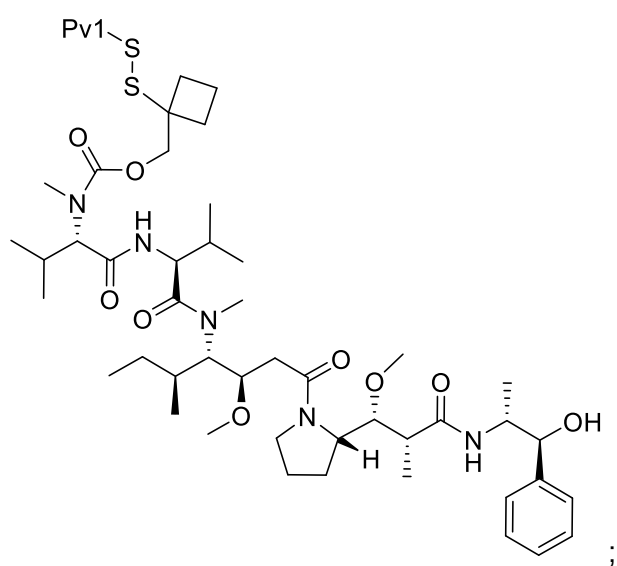
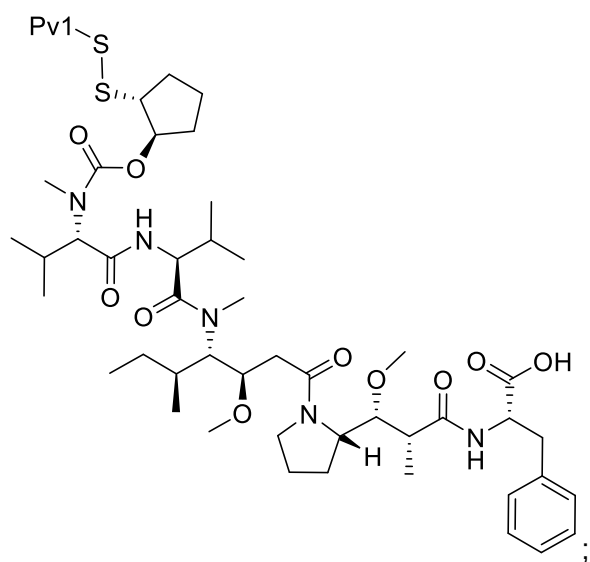
ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO: 3).

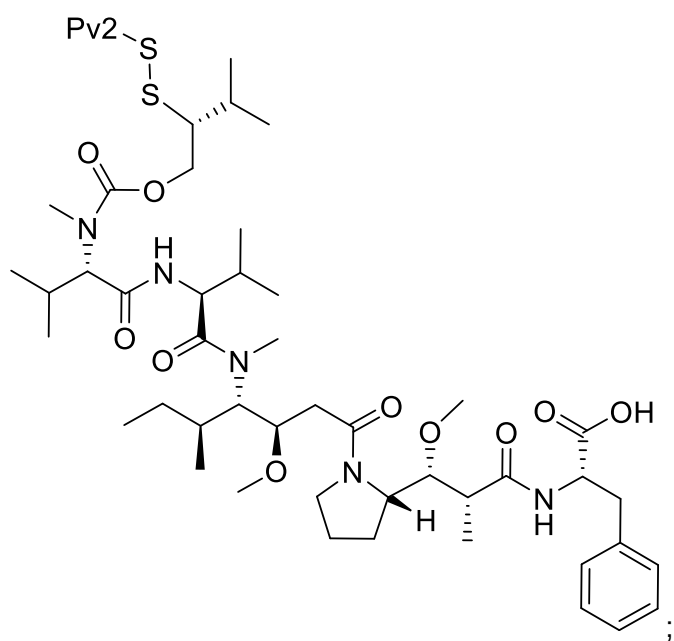
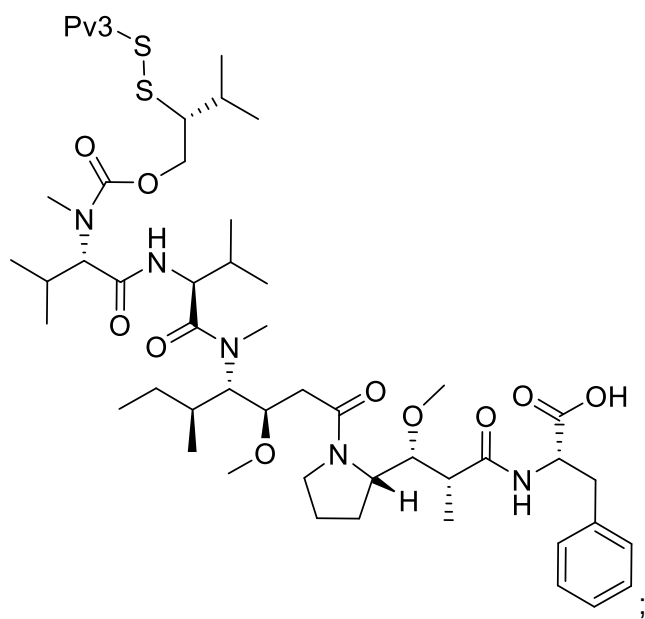
En algunas modalidades, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona de:

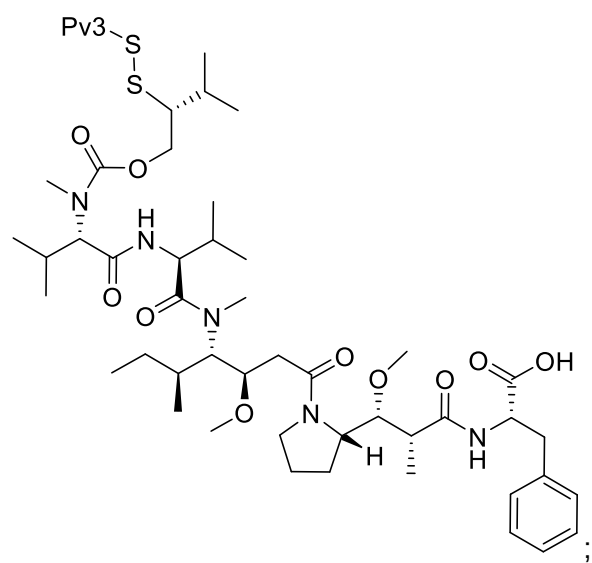
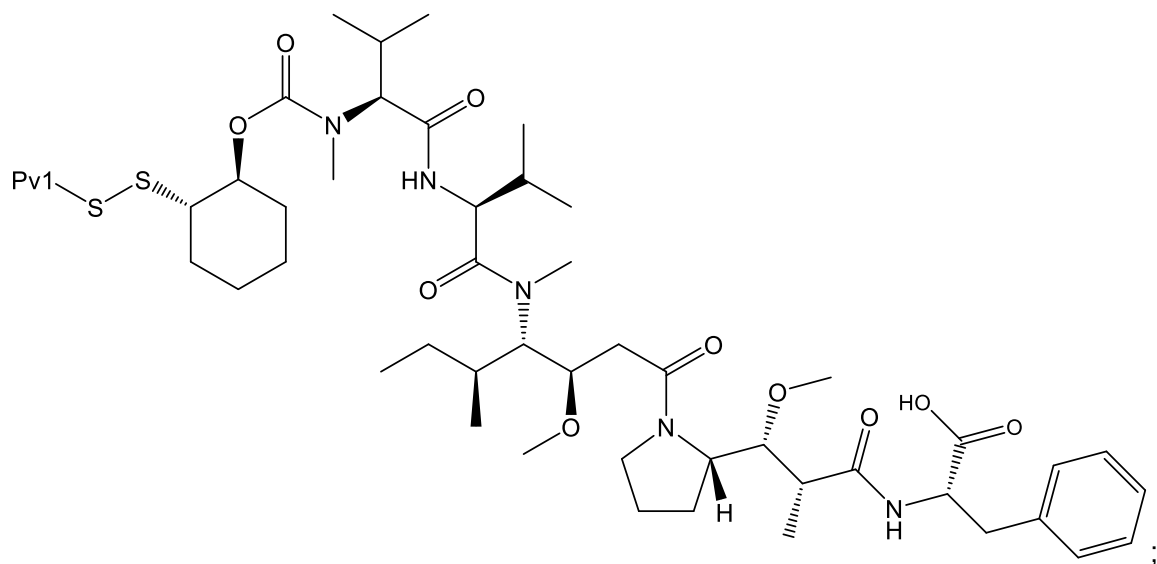
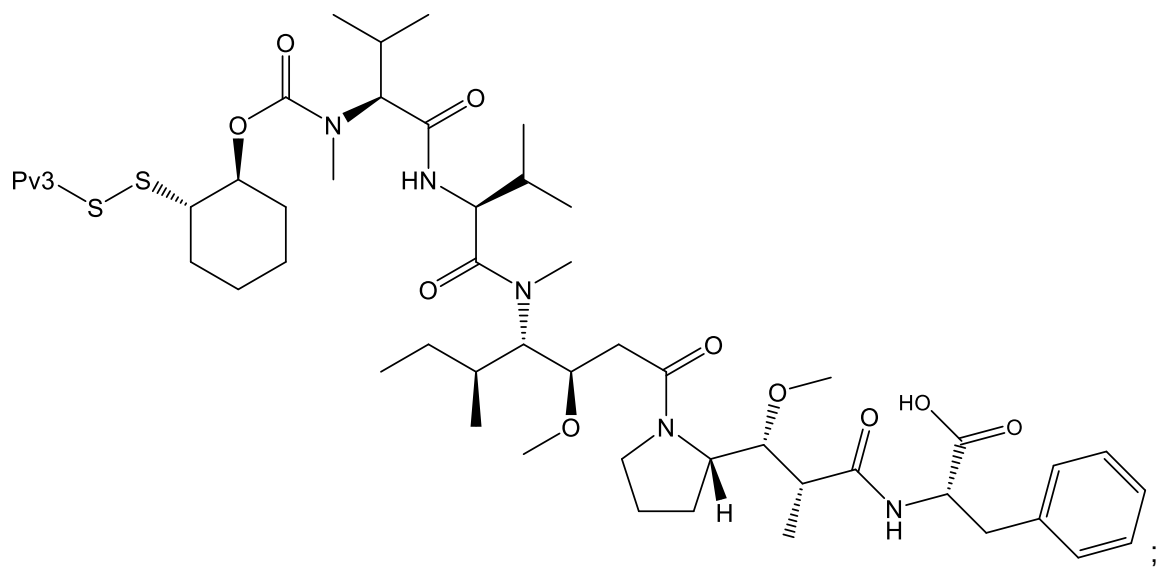


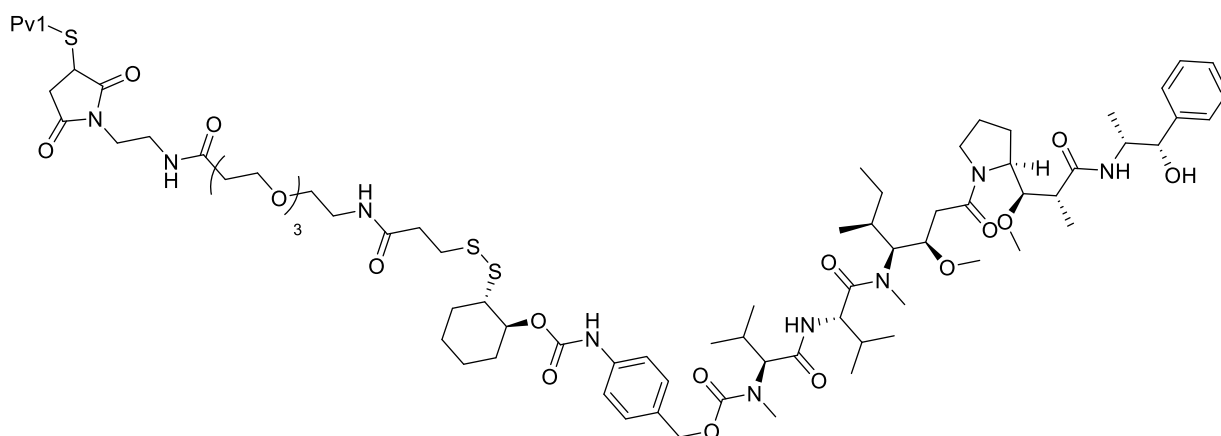
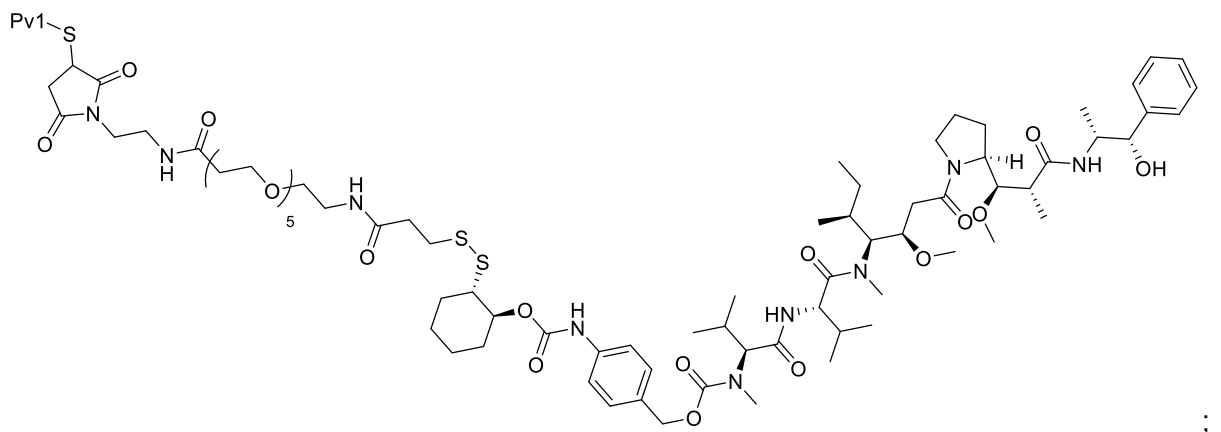












;

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente, donde:

Pv1 es un péptido que comprende la siguiente secuencia:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG (SEQ ID NO: 1);

Pv2 es un péptido que comprende la siguiente secuencia:

AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADECG (SEQ ID NO: 2); y

Pv3 es un péptido que comprende la siguiente secuencia:

ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWDADECG (SEQ ID NO: 3).

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

Los aminoácidos están representados por las abreviaturas IUPAC, de la siguiente forma: alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), cisteína (Cys; C), glutamina (Gln; Q), ácido glutámico (Glu; E), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro;

P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y), valina (Val; V).

El término "Pv1" significa ADDQNPWRAYLDLLFPTDTLLLDLLWCG, que es el péptido de la SEQ ID No. 1.

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

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

El término "Pv4" significa AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGKCG, que es el péptido de la SEQ ID NO. 4.

El término "Pv5" significa AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTC, que es el péptido de la SEQ ID NO. 5. El término "Pv6" significa AAEQNPIYWWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG, que es el péptido de la SEQ ID NO. 6. En los compuestos de la invención, los péptidos R¹ están unidos al conector disulfuro mediante un resto de cisteína.

El término "manto ácido y/o hipóxico" se refiere al entorno de la célula en el tejido enfermo en cuestión que tiene un pH menor de 7,0 y preferiblemente menor de 6,5. Un manto ácido o hipóxico tiene más preferiblemente un pH de alrededor de 5,5 y muy preferiblemente tiene un pH de alrededor de 5,0. Los compuestos de fórmula (I) se insertan a través de una membrana celular que tiene un manto ácido y/o hipóxico de una manera dependiente del pH para insertar R²L en la célula, después de lo cual el enlace disulfuro y el enlazador se escinden para administrar R²L libre (o R²L*, donde L* es un producto de degradación). Dado que los compuestos de fórmula (I) son dependientes del pH, se insertan preferentemente a través de una membrana celular solo en la presencia de un manto ácido o hipóxico que rodea la célula y no a través de la membrana celular de las células "normales", que no tienen un manto ácido o hipóxico.

Las expresiones "sensible al pH" o "dependiente del pH", tal como se usan en la presente para referirse al péptido R¹ o al modo de inserción del péptido R¹ o de los compuestos de la invención a través de una membrana celular, significan que el péptido tiene una mayor afinidad por una bicapa lipídica de membrana celular que tiene un manto ácido o hipóxico que una bicapa lipídica de membrana a pH neutro. Por lo tanto, los compuestos de la invención se insertan preferentemente a través de la membrana celular para insertar R²L en el interior de la célula (y de este modo administrar R²H como se describió anteriormente) cuando la bicapa lipídica de la membrana celular tiene un manto ácido o hipóxico (una célula "enferma"), pero no se insertan a través de una membrana celular cuando el manto (el entorno de la bicapa lipídica de la membrana celular) no es ácido o hipóxico (una célula "normal"). Se cree que esta

inserción preferencial se logra como resultado de que el péptido R¹ forme una configuración helicoidal, lo que facilita la inserción de la membrana.

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

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

El término "n-miembros", donde n es un número entero, típicamente describe el número de átomos formadores de anillos en un resto donde el número de átomos formadores de anillos es n. Por ejemplo, piperidinilo es un ejemplo de un anillo heterocicloalquilo de 6 miembros, pirazolilo es un ejemplo de un anillo heteroarilo de 5 miembros, piridilo es un ejemplo de un anillo heteroarilo de 6 miembros y 1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno es un ejemplo de un grupo cicloalquilo de 10 miembros.

En varios lugares en la presente memoria descriptiva, se pueden describir variables que definen grupos de enlace divalentes. Se pretende específicamente que cada sustituyente de enlace incluya tanto la forma directa como la inversa del sustituyente de enlace. Por ejemplo, -NR(CR'R'')_n- incluye tanto -NR(CR'R'')_n- como -(CR'R'')_nNR- y pretende describir cada una de las formas individualmente. Cuando la estructura requiera un grupo de enlace, las variables de Markush listadas para ese grupo se entenderán como grupos de enlace. Por ejemplo, si la estructura requiere un grupo de enlace y la definición de grupo de Markush para esa variable lista "alquilo" o "arilo", entonces se entiende que el "alquilo" o "arilo" representa un grupo de enlace alquileno o arileno, respectivamente.

El término "sustituido" significa que un átomo o grupo de átomos reemplaza formalmente al hidrógeno como "sustituyente" unido a otro grupo. El término "sustituido", a menos que se indique lo contrario, se refiere a cualquier nivel de sustitución, *por ejemplo*, mono-, di-, tri-,

tetra- o penta-sustitución, donde tal sustitución está permitida. Los sustituyentes se seleccionan independientemente y la sustitución puede estar en cualquier posición químicamente accesible. Debe entenderse que la sustitución en un átomo dado está limitada por la valencia. Debe entenderse que la sustitución en un átomo dado da como resultado una molécula químicamente estable. La frase “opcionalmente sustituido” significa sustituido o no sustituido. El término “sustituido” significa que se elimina un átomo de hidrógeno y se reemplaza por un sustituyente. Un sustituyente divalente simple, por ejemplo, oxo, puede reemplazar dos átomos de hidrógeno.

El término “C_{n-m}” indica un intervalo que incluye los puntos finales, donde n y m son números enteros e indican el número de carbonos. Los ejemplos incluyen C₁₋₄, C₁₋₆ y similares.

El término “alquilo” empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado que puede ser de cadena recta o ramificada. El término “alquilo C_{n-m}” se refiere a un grupo alquilo que tiene n a m átomos de carbono. Un grupo alquilo corresponde formalmente a un alcano con un enlace C-H reemplazado por el punto de unión del grupo alquilo al resto del compuesto. En algunas modalidades, el grupo alquilo contiene desde 1 a 6 átomos de carbono, desde 1 a 4 átomos de carbono, desde 1 a 3 átomos de carbono o 1 a 2 átomos de carbono. Los ejemplos de restos de alquilo incluyen, de modo no taxativo, grupos químicos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo; homólogos superiores tales como 2-metil-1-butilo, *n*-pentilo, 3-pentilo, *n*-hexilo, 1,2,2-trimetilpropilo y similares.

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

El término “alquinilo” empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena recta o ramificada correspondiente a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. Un grupo alquinilo corresponde formalmente a un alquino con un enlace C-H reemplazado por el punto de unión del grupo alquilo al resto del compuesto. El término “alquinilo C_{n-m}” se refiere a un grupo alquinilo que tiene n a m carbonos. Los grupos alquinilo ilustrativos incluyen, de modo no taxativo, etinilo, propin-1-ilo, propin-2-ilo y similares. En algunas modalidades, el resto alquinilo contiene 2 a 6, 2 a 4 o 2 a 3 átomos

de carbono.

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

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

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

El término “ciano” o “nitrilo” se refiere a un grupo de fórmula $-C\equiv N$, que también se puede escribir como $-CN$.

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

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

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

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

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

El término “arilo”, empleado solo o en combinación con otros términos, hace referencia a un grupo hidrocarburo aromático, que puede ser monocíclico o policíclico (por ejemplo, que tiene 2 anillos fusionados). El término “arilo C_{n-m} ” hace referencia a un grupo arilo que tiene de n a m átomos de carbono en el anillo. Los grupos arilo incluyen, por ejemplo, fenilo, naftilo y

similares. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen desde 6 a alrededor de 10 átomos de carbono. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen 6 átomos de carbono. En algunas modalidades, los grupos arilo tienen 10 átomos de carbono. En algunas modalidades, el grupo arilo es fenilo.

El término “heteroarilo” o “heteroaromático”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un heterociclo aromático monocíclico o policíclico que tiene al menos un miembro del anillo heteroátomo seleccionado de azufre, oxígeno y nitrógeno. En algunas modalidades, el anillo heteroarilo tiene 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, cualquier N formador de anillo en un resto de heteroarilo puede ser un N-óxido. En algunas modalidades, el heteroarilo tiene 5-14 átomos en el anillo que incluyen átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el heteroarilo tiene 5-10 átomos en el anillo que incluyen átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 miembros del anillo heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el heteroarilo tiene 5-6 átomos en el anillo y 1 o 2 miembros del anillo heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas modalidades, el heteroarilo es un anillo de heteroarilo de cinco o seis miembros. En otras modalidades, el heteroarilo es un anillo heteroarilo bicíclico fusionado de ocho miembros, nueve miembros o diez miembros. Un anillo heteroarilo de cinco miembros es un grupo heteroarilo que tiene cinco átomos en el anillo donde uno o más (*por ejemplo*, 1, 2 o 3) átomos en el anillo se seleccionan independientemente a partir de N, O y S.

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

El término “cicloalquilo”, empleado solo o en combinación con otros términos, hace referencia a un sistema de anillos de hidrocarburos no aromáticos (monocíclicos, bicíclicos o policíclicos), que incluyen grupos alquilo y alquenilo ciclados. El término “cicloalquilo C_{n-m} ” se refiere a un cicloalquilo que tiene n a m átomos de carbono en los miembros del anillo. Los grupos cicloalquilo pueden incluir grupos mono o policíclicos (*por ejemplo*, que tienen 2, 3 o 4 anillos fusionados) y espirociclos. Los grupos cicloalquilo pueden tener 3, 4, 5, 6 o 7 carbonos formadores de anillos (C_{3-7}). En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo tiene 3 a 6 miembros en el anillo, 3 a 5 miembros en el anillo o 3 a 4 miembros en el anillo. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es monocíclico. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es monocíclico o bicíclico. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es un

grupo cicloalquilo C_{3-6} monocíclico. Los átomos de carbono formadores de anillos de un grupo cicloalquilo se pueden oxidar opcionalmente para formar un grupo oxo o sulfido. Los grupos cicloalquilo también incluyen cicloalquilidenos. En algunas modalidades, cicloalquilo es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. También se incluyen en la definición de cicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos fusionados (es decir, que tienen un enlace en común) con el anillo cicloalquilo, por ejemplo, derivados de benzo o tienilo de ciclopentano, ciclohexano y similares. Un grupo cicloalquilo que contiene un anillo aromático fusionado se puede unir a través de cualquier átomo formador de anillo, incluyendo un átomo formador de anillo del anillo aromático fusionado. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo y similares. En algunas modalidades, el grupo cicloalquilo es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

El término “heterocicloalquilo”, empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un anillo o sistema de anillos no aromático, que puede contener opcionalmente uno o más grupos alquilenos como parte de la estructura del anillo, que tiene al menos un miembro del anillo heteroátomo seleccionado independientemente de nitrógeno, azufre, oxígeno y fósforo, y que tiene 4-10 miembros en el anillo, 4-7 miembros en el anillo o 4-6 miembros en el anillo. Incluidos dentro del término “heterocicloalquilo” están los grupos heterocicloalquilo de 4, 5, 6 y 7 miembros monocíclico. Los grupos heterocicloalquilo pueden incluir sistemas de anillos monocíclicos o bicíclicos (*por ejemplo*, que tienen dos anillos fusionados o puenteados) o espirocíclicos. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo es un grupo monocíclico que tiene 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados independientemente a partir de nitrógeno, azufre y oxígeno. Los átomos de carbono formadores de anillos y heteroátomos de un grupo heterocicloalquilo se pueden oxidar opcionalmente para formar un grupo oxo o sulfido u otro enlace oxidado (*por ejemplo*, $C(O)$, $S(O)$, $C(S)$ o $S(O)_2$, *N*-óxido, etc.) o un átomo de nitrógeno se puede cuaternizar. El grupo heterocicloalquilo se puede unir a través de un átomo de carbono formador de anillo o un heteroátomo formador de anillo. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo contiene 0 a 3 enlaces dobles. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo contiene 0 a 2 enlaces dobles. También se incluyen en la definición de heterocicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos fusionados (es decir, que tienen un enlace en común) con el anillo heterocicloalquilo, por ejemplo, derivados benzo o tienilo de piridina, morfolina, azepina, etc. Un grupo heterocicloalquilo que contiene un anillo aromático fusionado se puede unir a través de cualquier átomo formador de anillo, incluyendo un átomo formador de anillo del anillo aromático fusionado. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen 2-pirrolidinilo, morfolinilo, azetidino, tetrahidrofuranilo,

tetrahidropiraniilo y piperaziniilo.

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

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

La resolución de mezclas racémicas de compuestos puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica. Un método incluye la recrystalización fraccional mediante el uso de un ácido de resolución quiral que sea un ácido orgánico formador de sales y ópticamente activo. Los agentes de resolución adecuados para los métodos de recrystalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos canforsulfónicos ópticamente activos tales como ácido α -canforsulfónico. Otros agentes de resolución adecuados para los métodos de cristalización fraccionada incluyen formas estereoisoméricamente puras de α -metilbencilamina (por ejemplo, formas *S* y *R*, o formas diastereoméricamente puras), 2-fenilglicinol, norefedrina, efedrina, *N*-metilefedrina, ciclohexiletilamina, 1,2-diaminociclohexano y similares.

La resolución de mezclas racémicas también se puede realizar por elución en una columna empaquetada con un agente de resolución ópticamente activo (*por ejemplo*, dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la técnica puede determinar la composición del solvente de elución adecuada.

En algunas modalidades, los compuestos de la invención tienen la configuración (*R*). En otras

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

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

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

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

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

Todos los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de estos se pueden encontrar junto con otras sustancias tales como agua y solventes (por ejemplo, hidratos y solvatos) o se pueden aislar. Cuando están en estado sólido, los compuestos descritos en la presente y las sales de estos se pueden presentar en diversas formas y pueden, por ejemplo, tomar la forma de solvatos, incluidos hidratos. Los compuestos pueden estar en cualquier forma de estado sólido, tal como un polimorfo o solvato, por lo que, a menos que se indique claramente lo contrario, la referencia en la memoria descriptiva a compuestos y sales de estos debe entenderse que abarca cualquier forma de estado sólido del compuesto.

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

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

Las expresiones “temperatura ambiental” y “temperatura ambiente”, como se usan en la presente, se entienden en la técnica y se refieren generalmente a una temperatura, por ejemplo, una temperatura de reacción, que es alrededor de la temperatura de la habitación en la que se realiza la reacción. por ejemplo, una temperatura desde alrededor de 20°C a alrededor de 30°C.

La presente invención también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente. El término “sales farmacéuticamente aceptables” se

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

Síntesis

Los compuestos de la invención, incluidas las sales de estos, se pueden preparar mediante el uso de técnicas de síntesis orgánica conocidas y se pueden sintetizar de acuerdo con cualquiera de las numerosas rutas de síntesis posibles, como las de los Esquemas de reacción siguientes.

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

La preparación de compuestos de la invención puede involucrar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. La necesidad de protección y desprotección, y la selección de

grupos protectores apropiados, puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. La química de los grupos protectores se describe, por ejemplo, en Kocienski, *Protecting Groups*, (Thieme, 2007); Robertson, *Protecting Group Chemistry*, (Oxford University Press, 2000); Smith et ál., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 6.^a ed. (Wiley, 2007); Petursson et ál., "Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry," *J. Chem. Educ.*, 1997, 74(11), 1297; y Wuts et ál., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4.^a ed., (Wiley, 2006).

Las reacciones pueden controlarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos se puede controlar por medios espectroscópicos, tal como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^1H o ^{13}C), espectroscopia infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible) o espectrometría de masas, o mediante métodos cromatográficos como alta cromatografía líquida de rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC).

Los compuestos de Fórmula (I) se pueden preparar, por ejemplo, mediante el uso de un proceso como se describe a continuación.

Los péptidos R^1 pueden prepararse mediante el uso del método sintético en fase sólida descrito por primera vez por Merrifield en JACS, vol. 85, pág. 2149-2154 (1963), aunque también pueden emplearse otros métodos conocidos en la técnica. La técnica de Merrifield se conoce bien y es un método común para la preparación de péptidos. En varios libros se describen técnicas útiles para la síntesis de péptidos en fase sólida, tal como el texto "Principles of Peptide Synthesis" de Bodanszky, Springer Verlag 1984. Este método de síntesis involucra la adición escalonada de aminoácidos protegidos a una cadena de péptidos en crecimiento que estaba unida por enlaces covalentes a una partícula de resina sólida. Mediante este procedimiento, los reactivos y subproductos se eliminan por filtración, eliminando así la necesidad de purificar intermediarios. El concepto general de este método depende de la unión del primer aminoácido de la cadena a un polímero sólido por un enlace covalente, seguido de la adición de los siguientes aminoácidos protegidos, uno a la vez, de manera escalonada hasta que se ensambla la secuencia deseada. Finalmente, el péptido protegido se elimina del soporte de resina sólida y los grupos protectores se escinden.

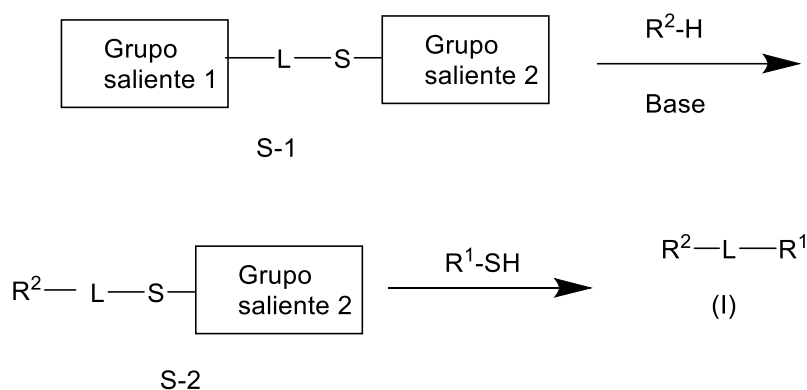
Los aminoácidos se pueden unir a cualquier polímero adecuado. El polímero debe ser insoluble en los solventes usados, debe tener una forma física estable que permita una fácil filtración y debe contener un grupo funcional al que el primer aminoácido protegido se pueda enlazar firmemente por un enlace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

La preparación de diversos enlazadores proporcionados en la presente se describe en la

patente estadounidense n.º 10,933,069 y las publicaciones de solicitud estadounidenses n.º 2021/0009536 y 2021/0009719.

Los compuestos de la invención se pueden preparar de acuerdo con el siguiente esquema general:

Esquema 1:



L es un resto que contiene tiol donde el átomo S del compuesto S-1 forma un enlace disulfuro con L. El compuesto S-1, que está flanqueado por grupos salientes ortogonales, puede hacerse reaccionar con el compuesto nucleofílico R²H para proporcionar el compuesto S-2. Luego, el compuesto S-2 se puede hacer reaccionar con un péptido que contiene tiol (R¹-SH) que participa en una reacción de intercambio de disulfuro para proporcionar un compuesto de Fórmula (I).

Métodos de Uso

En la presente se proporciona el uso de los compuestos de fórmula (I) en el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Otro aspecto de la presente invención es el uso de los compuestos de fórmula (I) en el tratamiento de enfermedades que involucran tejido enfermo ácido o hipóxico, tales como cáncer. La hipoxia y acidosis son marcadores fisiológicos de muchos procesos patológicos, incluyendo el cáncer. En el cáncer, la hipoxia es un mecanismo responsable del desarrollo de un ambiente ácido dentro de los tumores sólidos. Como resultado, los iones de hidrógeno se deben eliminar de la célula (por ejemplo, por una bomba de protones) para mantener un pH normal dentro de la célula. Como consecuencia de esta exportación de iones de hidrógeno, las células cancerosas a menudo tienen un gradiente de pH aumentado a través de la bicapa lipídica de la membrana celular y un pH menor en el medio extracelular en comparación con las células normales. Un enfoque para mejorar la eficacia e índice terapéutico de agentes citotóxicos es aprovechar esta característica fisiológica para proporcionar el suministro selectivo del compuesto a las

células hipóxicas sobre el tejido sano.

En estos métodos de tratamiento, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este como un agente único o en combinación con otras formas de terapia, tal como radiación ionizante o agentes citotóxicos en el caso del cáncer. En la terapia de combinación, el compuesto de fórmula (I) puede administrarse antes, al mismo tiempo o después que la otra modalidad terapéutica, como apreciarán los expertos en la técnica. Cualquiera de los métodos de tratamiento (agente único o combinación con otras formas de terapia) puede administrarse como un ciclo de tratamiento que involucre múltiples dosis o tratamientos durante un período de tiempo.

Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar mediante el uso de los compuestos de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer epitelial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores gastrointestinales, cáncer de cabeza y cuello, cánceres intestinales, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de recto, carcinoma renal de células claras, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, y cáncer de útero. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y cáncer de próstata. En algunas modalidades, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse mediante el uso de los compuestos de la presente descripción incluyen además linfoma de Hodgkin, linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), cáncer de ovario, cáncer urotelial, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón escamoso no microcítico (sqNSCLC), cáncer escamoso de cabeza y cuello, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de las trompas de Falopio y cáncer peritoneal.

Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar mediante el uso de los compuestos de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, cáncer de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no

Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemias crónicas o agudas que incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uretra, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del CNS, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma de tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluyendo los inducidos por asbestos, y combinaciones de dichos cánceres. En algunas modalidades, los cánceres tratables con compuestos de la presente descripción incluyen cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer epitelial, cáncer de esófago., Sarcoma de Ewing, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores gastrointestinales, cáncer de cabeza y cuello (cáncer aerodigestivo superior), cánceres intestinales, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma), melanoma, cáncer de próstata, cáncer de recto, carcinoma renal de células claras, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides y cáncer de útero.

En algunas modalidades, los cánceres tratables con compuestos de la presente descripción incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de colon y cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas). Además, la descripción incluye neoplasias malignas refractarias o recurrentes cuyo crecimiento se puede inhibir mediante el uso de los compuestos de la descripción.

En algunas modalidades, los cánceres que se pueden tratar mediante el uso de los compuestos de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de la cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma, cáncer de vejiga, etc.), cánceres hematológicos (por ejemplo, linfoma, leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena

aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), DLBCL, linfoma de células del manto, linfoma no Hodgkin (incluyendo NHL recidivante o refractario y folicular recurrente), linfoma de Hodgkin o mieloma múltiple) y combinaciones de dichos cánceres.

En determinadas modalidades, un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este puede usarse en combinación con un agente quimioterapéutico, una terapia dirigida contra el cáncer, una inmunoterapia o radioterapia. Los agentes se pueden combinar con los presentes compuestos en una sola forma de dosificación, o los agentes se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente como formas de dosificación separadas. En algunas modalidades, el agente quimioterapéutico, la terapia contra el cáncer dirigida, la inmunoterapia o la radioterapia son menos tóxicas para el paciente, tal como, por ejemplo, al presentar una toxicidad reducida en la médula ósea, cuando se administran junto con un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en comparación con cuando se administra en combinación con el correspondiente agente dirigido a microtúbulos (por ejemplo, R²-H).

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

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

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

Los agentes quimioterapéuticos u otros agentes contra el cáncer adecuados incluyen además, por ejemplo, ciertos productos naturales y sus derivados (por ejemplo, vinca alcaloides,

antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas) tales como vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, ara-C, paclitaxel (TAXOLTM), mitramicina, desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN- α), etopósido y tenipósido.

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

También son adecuados agentes citotóxicos tales como, por ejemplo, epidofilotoxina; una enzima antineoplásica; un inhibidor de topoisomerasa; procarbazona; mitoxantrona; complejos de coordinación de platino tales como cis-platino y carboplatino; modificadores de la respuesta biológica; inhibidores del crecimiento; agentes terapéuticos antihormonales; leucovorina; tegafur; y factores de crecimiento hematopoyético.

Otros agentes contra el cáncer incluyen agentes terapéuticos de anticuerpos tales como trastuzumab (Herceptin), anticuerpos contra moléculas coestimuladoras tales como CTLA-4, 4-1BB y PD-1, o anticuerpos contra citocinas (IL-10, TGF- α , etc.).

Otros agentes contra el cáncer también incluyen los que bloquean la migración de células inmunes, tales como antagonistas para receptores de quimiocinas, incluyendo CCR2 y CCR4.

Otros agentes contra el cáncer también incluyen aquellos que aumentan el sistema inmune, tales como adyuvantes o transferencia de linfocitos T adoptivos.

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

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

Los compuestos de esta invención pueden ser efectivos en combinación con agentes antihormonales para el tratamiento del cáncer de mama y otros tumores. Los ejemplos adecuados son agentes antiestrógenos, incluyendo, pero no limitado a, tamoxifeno y toremifeno, inhibidores de aromatasa, incluyendo, pero no limitado a, letrozol, anastrozol y exemestano, adrenocorticosteroides (por ejemplo, prednisona), progestágenos (por ejemplo, acetato de megastrol) y antagonistas de los receptores de estrógenos (por ejemplo, fulvestrant). Los agentes antihormonales adecuados usados para el tratamiento de cánceres

de próstata y otros también se pueden combinar con compuestos de la presente invención. Estos incluyen antiandrógenos incluyendo, pero no limitado a, flutamida, bicalutamida y nilutamida, análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) incluyendo leuprolida, goserelina, triptorelina e histrelina, antagonistas de LHRH (por ejemplo, degarelix), bloqueadores del receptor de andrógeno (por ejemplo, enzalutamida) y agentes que inhiben la producción de andrógenos (por ejemplo, abiraterona).

Los compuestos de la presente invención se pueden combinar o administrar en secuencia con otros agentes contra las cinasas receptoras de membrana, especialmente para pacientes que han desarrollado resistencia primaria o adquirida a la terapia dirigida. Estos agentes terapéuticos incluyen inhibidores o anticuerpos contra EGFR, Her2, VEGFR, c-Met, Ret, IGFR1 o Flt-3 y contra proteínas cinasas de fusión asociadas al cáncer, tales como Bcr-Abl y EML4-Alk. Los inhibidores contra EGFR incluyen gefitinib y erlotinib, y los inhibidores contra EGFR/Her2 incluyen, de modo no taxativo, dacomitinib, afatinib, lapatinib y neratinib. Los anticuerpos contra el EGFR incluyen, de modo no taxativo, cetuximab, panitumumab y necitumumab. Los inhibidores de c-Met se pueden usar en combinación con los compuestos de la invención. Estos incluyen onartumzumab, tivantinib e INC-280. Los agentes contra Abl (o Bcr-Abl) incluyen imatinib, dasatinib, nilotinib y ponatinib y aquellos contra Alk (o EML4-ALK) incluyen crizotinib.

Los inhibidores de la angiogénesis pueden ser eficaces en algunos tumores en combinación con compuestos de la invención. Estos incluyen anticuerpos contra VEGF o VEGFR o inhibidores de cinasas de VEGFR. Los anticuerpos u otras proteínas terapéuticas contra VEGF incluyen bevacizumab y aflibercept. Los inhibidores de las cinasas de VEGFR y otros inhibidores anti-angiogénesis incluyen, de modo no taxativo, sunitinib, sorafenib, axitinib, cediranib, pazopanib, regorafenib, brivanib y vandetanib.

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

Los agentes contra la cinasa PI3 incluyen, de modo no taxativo topilralisib, idelalisib, buparlisib. Los inhibidores de mTOR tales como rapamicina, sirolimus, temsirolimus y everolimus se pueden combinar con compuestos de la invención. Otros ejemplos adecuados incluyen, de modo no taxativo, vemurafenib y dabrafenib (inhibidores de Raf) y trametinib, selumetinib y GDC-0973 (inhibidores de MEK). Los inhibidores de una o más JAK (por

ejemplo, ruxolitinib, baricitinib, tofacitinib), Hsp90 (por ejemplo, tanespimicina), cinasas dependientes de ciclina (por ejemplo, palbociclib), HDAC (por ejemplo, panobinostat), PARP (por ejemplo, olaparib) y proteasomas (por ejemplo, bortezomib, carfilzomib) también se pueden combinar con compuestos de la presente invención. Un ejemplo adicional de un inhibidor de PARP que se puede combinar con un compuesto de la invención es talazoparib. Los métodos para la administración segura y eficaz de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos son conocidos por los expertos en la técnica. Además, su administración está descrita en la bibliografía estándar. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterapéuticos se describe en la "Physicians' Desk Reference" (PDR, por ejemplo, edición de 1996, Medical Economics Company, Montvale, NJ), cuya descripción se incorpora en la presente mediante referencia como si estuviera descrita en su totalidad.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto (agente terapéutico, ingrediente activo, fármaco, etc.) se refiere a una cantidad del compuesto que se administrará a un sujeto que necesita terapia o tratamiento que alivia un síntoma, mejora una afección, o ralentiza la aparición de las afecciones de la enfermedad, de acuerdo con los estándares clínicamente aceptables para el trastorno o afección que se va a tratar. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una cantidad que se haya demostrado que tiene un efecto terapéutico deseado en un ensayo *in vitro*, un ensayo animal *in vivo* o un ensayo clínico. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar según la forma de dosificación particular, el método de administración, el protocolo de tratamiento, la enfermedad o afección específica que se desee tratar, la relación entre el riesgo y el beneficio, etc., entre muchos otros factores. Dicha cantidad terapéuticamente eficaz se puede obtener a partir de un ensayo clínico, un modelo animal o un ensayo de cultivo celular *in vitro*. Se sabe en la técnica que la cantidad eficaz adecuada para uso humano se puede calcular a partir de la cantidad eficaz determinada a partir de un modelo animal o un ensayo de cultivo celular *in vitro*. Por ejemplo, según lo informado por Reagan-Shaw et ál., FASEB J. 2008: 22(3) 659-61, "µg/ml" (cantidad eficaz basada en ensayos de cultivo celular *in vitro*) = "mg/kg de peso corporal/día" (cantidad eficaz para un ratón). Además, la cantidad eficaz para un ser humano se puede calcular a partir de la cantidad eficaz para un ratón con base en el hecho de que la velocidad del metabolismo de los ratones es 6 veces más rápida que la de los humanos.

Como ejemplo de tratamiento que usa un compuesto de fórmula (I) en combinación con un agente citotóxico, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) a un paciente que padece cáncer como parte de un régimen de tratamiento que también involucra una cantidad terapéuticamente eficaz de radiación ionizante o un agente citotóxico. En el contexto de este régimen de tratamiento, debe

entenderse que el término cantidad “terapéuticamente eficaz” significa eficaz en la terapia de combinación. Los expertos en la técnica del tratamiento del cáncer entenderán cómo ajustar las dosis para lograr el resultado terapéutico óptimo.

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

El término “tratar” como se usa en la presente incluye la administración de un compuesto o composición que reduce la frecuencia, retrasa el inicio o reduce la progresión de los síntomas de una enfermedad que involucra tejido enfermo ácido o hipóxico, tal como cáncer, apoplejía, infarto de miocardio, o enfermedad neurodegenerativa a largo plazo, en un sujeto en relación con un sujeto que no recibe el compuesto o la composición. Esto puede incluir revertir, reducir o detener los síntomas, signos clínicos o patología subyacente de una afección de una manera para mejorar o estabilizar la afección de un sujeto (por ejemplo, regresión del crecimiento de tumor, para el cáncer o disminuir o mejorar la lesión por reperfusión de isquemia miocárdica en infarto de miocardio, apoplejía o enfermedad cardiovascular similar). Los términos “inhibir” o “reducir” se usan para el cáncer en referencia a los métodos para inhibir o reducir el crecimiento de tumor (por ejemplo, disminuir el tamaño de un tumor) en una población en comparación con una población de control no tratada.

Todas las publicaciones (incluyendo las patentes) mencionadas en la presente se incorporan en la presente mediante referencia con el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, que se podrían usar en relación con la descripción descrita en la presente. Las publicaciones discutidas a lo largo del texto se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud.

En la presente se describen varios tipos de intervalos. Cuando se describe o reivindica un intervalo de cualquier tipo, la intención es describir o reivindicar individualmente cada número posible que tal intervalo podría abarcar razonablemente, incluyendo los puntos finales del intervalo, así como cualquier subintervalo y combinación de subintervalos abarcados en estos. Cuando se describe o reivindica un intervalo de cantidades terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo, por ejemplo, la intención es describir o reivindicar individualmente cada número posible que tal intervalo pudiera abarcar, consistente con la descripción en la presente. Por ejemplo, mediante una descripción de que la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede estar en un intervalo de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg (del peso corporal del sujeto).

Formulación, Formas de Dosificación y Administración

Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención, un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este se combina como ingrediente activo en una mezcla íntima con un vehículo farmacéutico de acuerdo con las técnicas convencionales de composición farmacéutica, cuyo vehículo puede tomar un amplio variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral. En la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales. tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o portadores tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales, como por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas. Debido a su facilidad de administración, las tabletas y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso obviamente se emplean portadores farmacéuticos sólidos. Si se desea, las tabletas se pueden recubrir con azúcar o recubrir entéricamente mediante técnicas estándar. Para los parenterales, el portador comprenderá normalmente agua estéril, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo, para ayudar a la solubilidad o con fines de conservación. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Un experto en las técnicas farmacéutica y médica podrá determinar fácilmente una dosis adecuada de las composiciones farmacéuticas de la invención para la enfermedad o afección particular a tratar.

EJEMPLOS***Métodos de Espectrometría de Masas***

La espectrometría de masas se midió en un Agilent 1260 Infinity II con 6130B Quadrupole MS y Agilent 1290 Infinity II con 6125B Quadrupole MS.

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

La espectrometría de masas por ESI (Ionización por Electrorrocío) se midió ya sea en LC-MS serie Agilent 1100 con un 1946 MSD o una MS de alta resolución Waters Xevo Qtof, ambas

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

Métodos de HPLC

Las HPLC se registraron a partir de una máquina Agilent 1260 Infinity II. Los métodos de HPLC se describen con más detalle según sea necesario en cada ejemplo a continuación.

Preparación del enlazadores

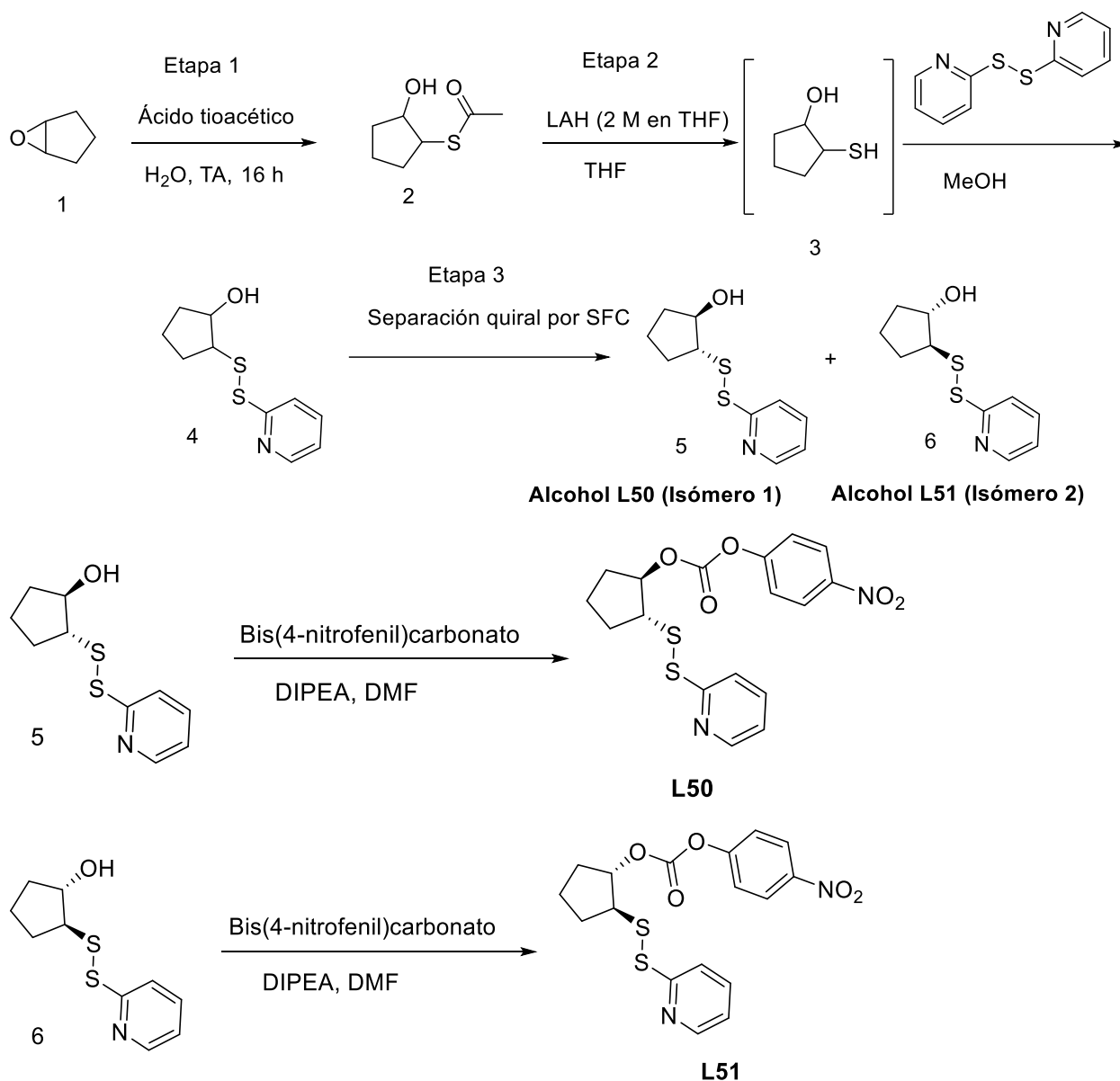
La preparación de diversos enlazadores proporcionados en la presente se describe en la patente estadounidense n.º 10,933,069 y las publicaciones de solicitud estadounidenses n.º 2021/0009536 y 2021/0009719. Por ejemplo, la síntesis de los siguientes enlazadores se describe en la publicación de solicitud estadounidense n.º 2021/0009719:

Nombre del enlazador	Estructura
L31	
L55*	
L56*	
L61*	
L62*	
L65	
L64	

*Se muestra la estereoquímica relativa. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud

estadounidense n.º 2021/0009719 por más detalles.

Síntesis de los compuestos enlazadores L50 y L51.



Etapa 1: Síntesis de etanotioato de S-(2-hidroxiciclopentilo)

A una solución agitada de 6-oxabicyclo[3.1.0]hexano (5 g, 59,4 mmol) en agua (50 ml) se le añadió ácido tioacético (4,98 g, 65,4 mmol) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se inactivó con una solución acuosa de NaHCO₃ saturado y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó para proporcionar etanotioato de S-(2-hidroxiciclopentilo) (6,1 g, 38,1 mmol, 64,0 % de rendimiento) como un líquido incoloro. El producto bruto se llevó a la siguiente etapa sin purificación.

Etapas 2: Síntesis de 2-mercaptociclopentan-1-ol

A una solución agitada de etanotioato de S-(2-hidroxíciclopentilo) (6,1 g, 38,1 mmol) en THF (60 ml) a 0 °C, se añadió por goteo una solución 2,0 M de LAH en THF (28,6 ml, 57,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se inactivó con una solución acuosa de HCl 1,5 N y se extrajo con DCM. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó para proporcionar 2-mercaptociclopentan-1-ol (5 g, 42,3 mmol, 111 % de rendimiento) como un líquido incoloro. El producto bruto se llevó a la siguiente etapa sin purificación. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 4,90 (s, 1H), 3,78 (s, 1H), 2,93-2,87 (m, 1H), 2,44-2,42 (m, 1H), 2,19-2,05 (m, 1H), 1,96-1,88 (m, 1H), 1,69-1,67 (m, 2H), 1,50-1,35 (m, 2H).

Etapas 3: 2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentan-1-ol

A una solución agitada de 2-mercaptociclopentan-1-ol (5 g, 42,3 mmol) en metanol (60 ml) se le añadió 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (13,98 g, 63,5 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad. Se añadió agua helada, se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó para obtener un residuo bruto. El residuo bruto se purificó dos veces mediante cromatografía en columna ultrarrápida mediante el uso de acetato de etilo al 10 % en éter de petróleo para obtener 2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentan-1-ol como una mezcla racémica. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₀H₁₃NOS₂, 227,04; hallada 228,1 (M+H). Pureza quiral de SFC: Columna: Lux A1; Cosolvente: MeOH al 40 %; Velocidad de flujo: 4 mL / min; RT (min): 2,98; % de área: 49,92; RT (min): 4,26; % de área: 48,79. HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 5,76; Pureza (Máx): 99,41 %.

Separación por SFC de los isómeros (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentan-1-ol (alcohol L-50) y (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentan-1-ol (alcohol L-51)

Los isómeros se separaron mediante purificación por SFC de 2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentan-1-ol racémico. El isómero 1 de la fracción de SFC obtenida (primer pico eluido) se concentró a presión reducida a 30 °C para proporcionar (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentan-1-ol (alcohol L-50) (1,2 g, 5,18 mmol, 12,25 % de rendimiento) como un aceite incoloro. Se asignó la estereoquímica absoluta como se establece en Yamshita H., Bull.Chem.Soc.Jpn.,61, 1213-1220 (1988). LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₀H₁₃NOS₂, 227,04; hallada 228,1 (M+H). HPLC: Columna: X-Bridge C8 (50 x 4,6) mm, 3,5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B:TFA al 0,1 % en ACN; Flujo: 2,0 mL / min; RT (min):

2,71; Pureza (Máx): 98,19 %. Pureza quiral de SFC: Columna: Lux A1; Cosolvente: MeOH al 40 %; Velocidad de flujo: 40 mL / min; RT (min): 2,94; % de área: 100,0. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,55 (s, 1H), 7,65-7,61 (m, 1H), 7,54-7,51 (m, 1H), 7,21-7,17 (m, 1H), 4,05-4,04 (m, 1H), 3,03 (t, J = 8,00 Hz, 1H), 2,12-2,05 (m, 2H), 1,72-1,64 (m, 5H).

Síntesis del precursor del Enlazador L50

A una solución agitada de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentan-1-ol (1,1 g, 4,84 mmol) en DMF (10 ml) se le añadió carbonato de bis(4-nitrofenilo) (2,94 g, 9,68 mmol) y DIPEA (2,51 ml, 14,52 mmol) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua helada, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 para obtener un producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de fase inversa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H_2O y ACN. La fracción del producto se concentró a presión reducida para obtener el producto puro que se liofilizó para proporcionar ((1R,2R)-2-(piridin-2-il disulfaneil)ciclopentilo) carbonato de 4-nitrofenilo (1,7 g, 4,32 mmol, 89 % de rendimiento) como una goma de color amarillo pálido. LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$, 392,05; hallada 392,9 (M+H). HPLC: Columna: X-Bridge C8 (50 x 4,6) mm, 3,5 μm ; Fase móvil: A: TFA al 0,1 % en H_2O ; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo: 2,0 mL / min; RT (min): 5,01; Pureza (Máx): 99,73 %. Pureza quiral de SFC: Columna: YMC Amilosa-SA; Cosolvente: IPA al 30 %; Velocidad de flujo: 3 mL / min; RT (min): 4,26; % de área: 99,95. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,50 (s, 1H), 8,29-8,27 (m, 2H), 7,71-7,65 (m, 2H), 7,39-7,36 (m, 2H), 7,14-7,11 (m, 1H), 5,25 (t, J = 3,20 Hz, 1H), 3,60-3,55 (m, 1H), 2,30-2,27 (m, 2H), 2,03-1,79 (m, 3H), 1,70-1,69 (m, 1H).

Síntesis del precursor del Enlazador L51

A una solución agitada de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentan-1-ol (1,1 g, 4,84 mmol) en DMF (10 ml) se le añadió carbonato de bis(4-nitrofenilo) (2,94 g, 9,68 mmol) y DIPEA (2,51 ml, 14,52 mmol) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua helada, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 para obtener un producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de fase inversa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H_2O y ACN. La fracción del producto se concentró a presión reducida para obtener el producto puro que se liofilizó para proporcionar ((1S,2S)-2-(piridin-2-il disulfaneil)ciclopentilo) carbonato de 4-nitrofenilo (1,7 g, 4,24 mmol, 88 % de rendimiento) como un compuesto de goma de color amarillo pálido. LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$, 392,05; hallada 392,8 (M+H).

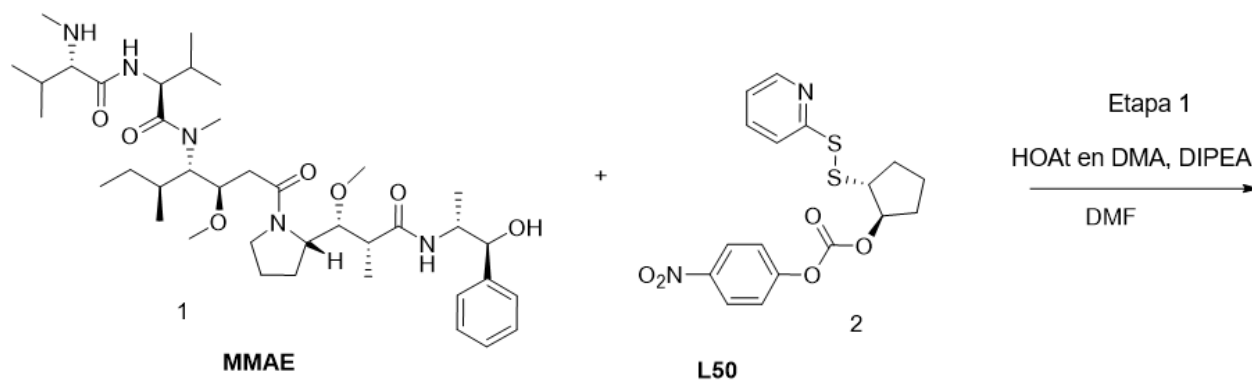
HPLC: Columna: X-Bridge C8 (50 x 4,6) mm, 3,5 μ m; Fase móvil: A: TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Velocidad de flujo: 2,0 mL / min; RT (min): 5,01; Pureza (Máx): 97,86 %. Pureza quiral de SFC: Columna: YMC Amilosa-SA; Cosolvente: IPA al 30 %; Velocidad de flujo: 3 mL / min; RT (min): 3,56; % de área: 99,74. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,50 (s, 1H), 8,29-8,27 (m, 2H), 7,71-7,65 (m, 2H), 7,39-7,36 (m, 2H), 7,14-7,11 (m, 1H), 5,25 (t, J = 3,20 Hz, 1H), 3,60-3,55 (m, 1H), 2,30-2,27 (m, 2H), 2,03-1,79 (m, 3H), 1,70-1,69 (m, 1H).

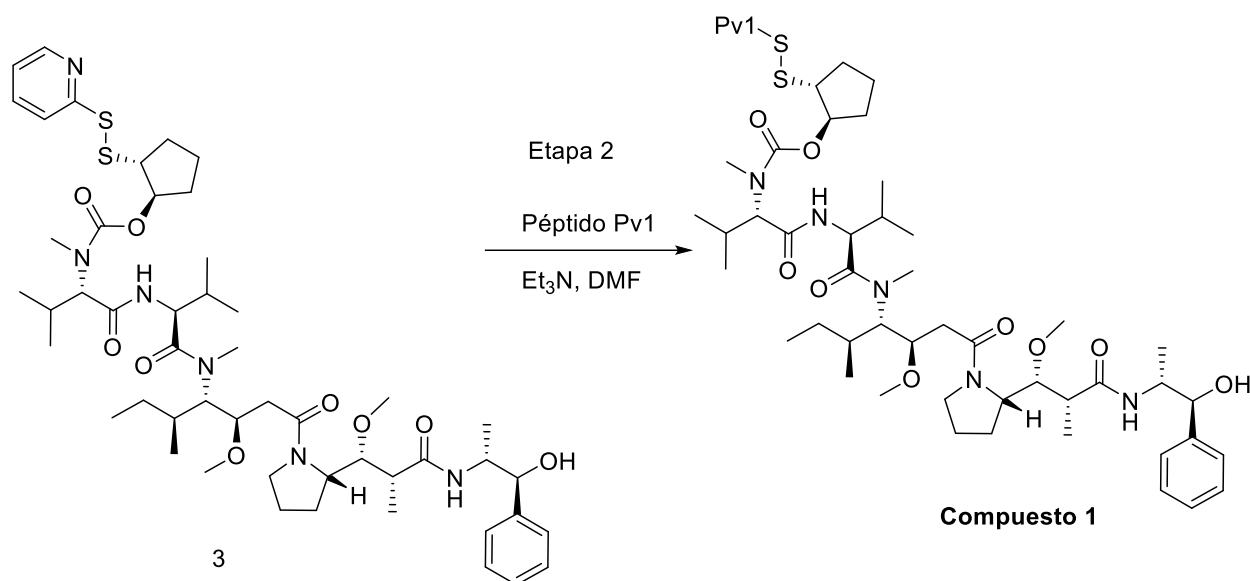
Síntesis alternativa del Enlazador L51

El enlazador L51 se puede preparar de acuerdo con el proceso de resolución quiral enzimática descrito en la solicitud internacional WO 2022/150596, que se incorpora a la presente en su totalidad (véase, por ejemplo, el Ejemplo 11 de WO 2022/150596).

Síntesis de compuestos de la descripción

Ejemplo 1: Síntesis del Compuesto 1





Etapa 1: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (3)

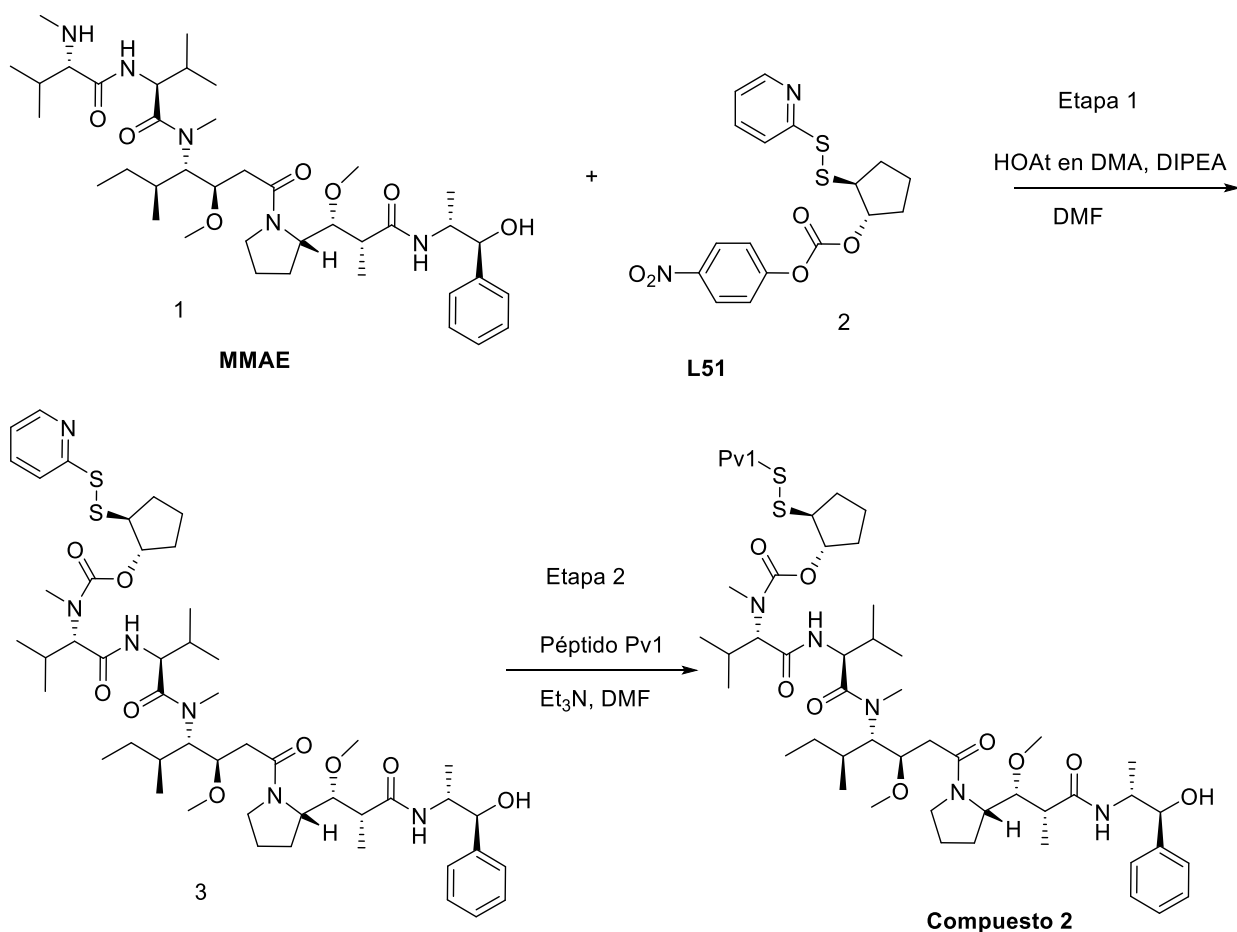
A una solución agitada de (S)-N-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (150 mg, 0,209 mmol) en DMF (1 mL) se le agregó ((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil) carbonato de 4-nitrofenilo (L50) (98 mg, 0,251 mmol) a 0 °C. Luego, se añadió una solución 1 M de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,104 ml, 0,104 mmol) y DIPEA (0,054 ml, 0,313 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante preparación mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción de producto se liofilizó para proporcionar ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (138 mg, 0,140 mmol, 67,1 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₀H₇₈N₆O₉S₂, 970,53; hallada 971,3 (M+H). HPLC: Columna: X-Bridge C8 (50X4,6) mm, 3,5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:2,0 mL / min; RT (min): 5,49; Pureza (Máx): 98,69 %.

Paso 2: síntesis del Compuesto 1

A una solución agitada de((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-

1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (115 mg, 0,118 mmol) en DMF (1,5 ml) se le agregó péptido Pv1 (425,6 mg, 0,130 mmol) y trietilamina (0,02 ml, 0,141 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción del producto se liofilizó para producir el Compuesto 1 (205 mg, 0,049 mmol, 41,5 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉₇H₂₉₉F₆N₄₁O₅₂S₂, 4135,15; hallada 1380,3 (M+3)/3. HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 12,29; Pureza (Máx): 99,69 %

Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 2



Etapla 1: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-

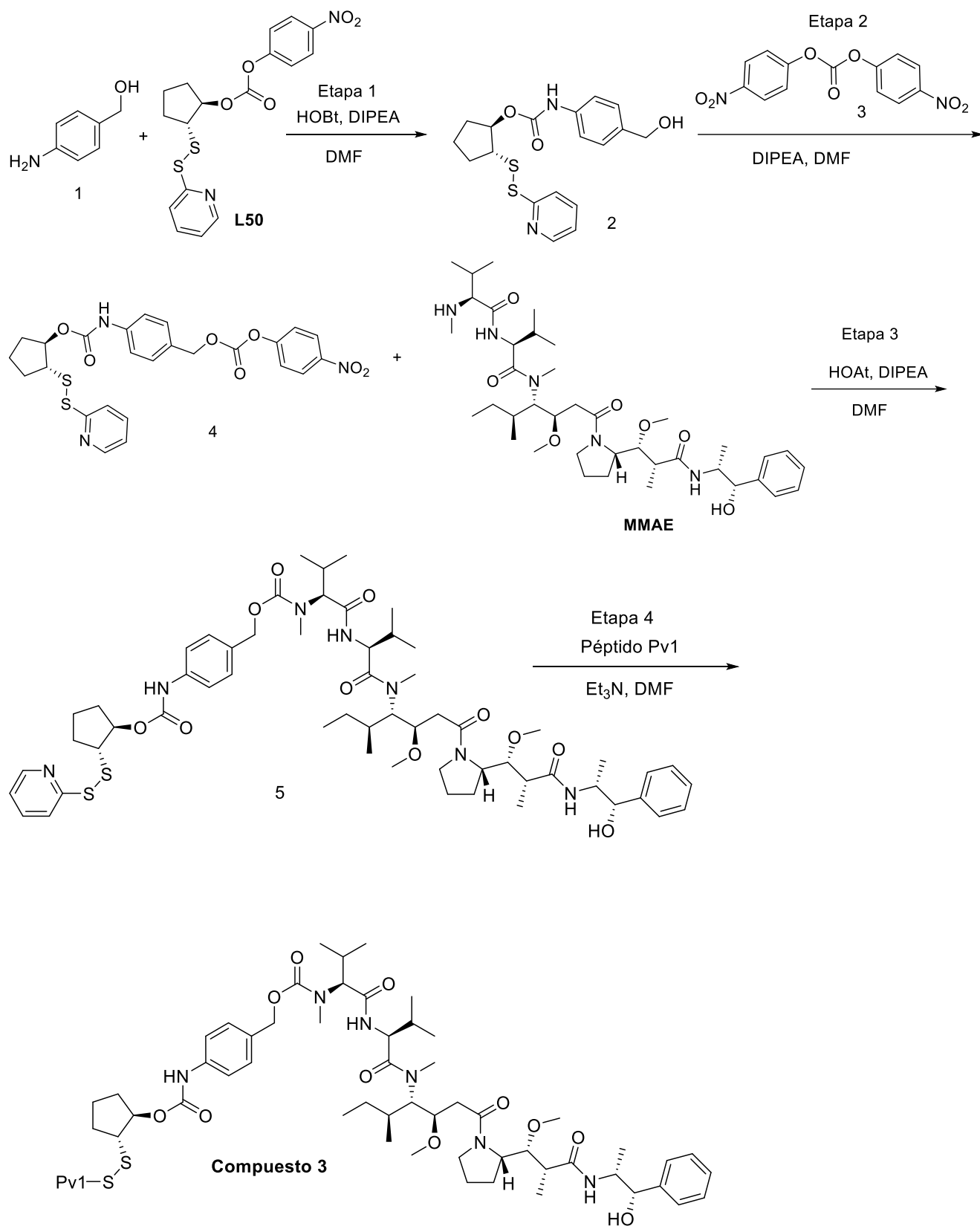
*il)*amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo

A una solución agitada de (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (180 mg, 0,251 mmol) en DMF (1 mL) se le agregó ((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil) carbonato de 4-nitrofenilo (L51) (118 mg, 0,301 mmol) a 0 °C. Luego, se añadió una solución 1 M de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,125 ml, 0,125 mmol) y DIPEA (0,066 ml, 0,376 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante preparación mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción de producto se liofilizó para proporcionar ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (200 mg, 0,251 mmol, 79 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₀H₇₈N₆O₉S₂, 970,53; hallada 971,4 (M+H). Columna: X-Bridge C8 (50X4,6) mm, 3,5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:2,0 mL / min; RT (min): 5,48; Pureza (Máx): 95,59 %.

Etapa 2: Síntesis del Compuesto 2

A una solución agitada de((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (200 mg, 0,206 mmol) en DMF (2 ml) se le agregó péptido Pv1 (742,9 mg, 0,226 mmol) y trietilamina (0,035 ml, 0,247 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h 30 min. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción del producto se liofilizó para producir el Compuesto 2 (410 mg, 0,099 mmol, 48 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉₇H₂₉₉F₆N₄₁O₅₂S₂, 4135,15; hallada 1380,0 (M+3)/3. HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 11,94; Pureza (Máx): 99,66 %

Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto 3



Etapa 1: Síntesis de (4-hidroximetil) fenil) carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)

ciclopentilo

Una solución agitada de (4-aminofenil)metanol (120 mg, 0,974 mmol) y ((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)carbonato de 4-nitrofenilo (L50) (382 mg, 0,974 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió con hielo. A la solución anterior se le añadieron HOBt (65,8 mg, 0,487 mmol) y DIPEA (0,338 ml, 1,949 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua helada, se extrajo con acetato de etilo y se lavó con salmuera. La capa orgánica se concentró para obtener un residuo bruto. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida mediante el uso de acetato de etilo al 40 % en éter de petróleo para proporcionar (4-(hidroximetil)fenil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (350 mg, 0,876 mmol, 90 % de rendimiento) como una goma marrón. LCMS: $[M + H]^+$ calculada para $C_{18}H_{20}F_6N_2O_3S_2$, 376,09; hallada 377,6 (M+H). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9,61 (s, 1H), 8,45 (d, $J = 4,80$ Hz, 1H), 7,79-7,77 (m, 2H), 7,39-7,22 (m, 2H), 7,19-7,14 (m, 3H), 5,08 (t, $J = 5,60$ Hz, 1H), 5,00 (s, 1H), 4,41 (d, $J = 5,60$ Hz, 2H), 3,51-3,34 (m, 1H), 2,17-2,00 (m, 2H), 1,78-1,67 (m, 4H).

Etapas 2: Síntesis de (4-(((4-nitrofenoxi) carbonil) oxi) metil) fenil) carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentilo

A una solución agitada de (4-(hidroximetil)fenil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (0,35 g, 0,930 mmol) en DMF (5 ml) se le agregaron carbonato de bis(4-nitrofenilo) (1,131 g, 3,72 mmol) y DIPEA (0,242 ml, 1,394 mmol) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua helada, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida para obtener un residuo bruto. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida mediante el uso de acetato de etilo al 20 % en éter de petróleo para proporcionar (4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (420 mg, 0,740 mmol, 80 % de rendimiento) como una goma marrón. LCMS: $[M + H]^+$ calculada para $C_{25}H_{23}N_3O_7S_2$, 541,10; hallada 542,1 (M+H). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9,78 (s, 1H), 8,45 (d, $J = 5,20$ Hz, 1H), 8,33-8,31 (m, 2H), 7,79-7,77 (m, 2H), 7,59-7,56 (m, 2H), 7,49-7,47 (m, 2H), 7,39-7,37 (m, 2H), 7,24-7,21 (m, 1H), 5,23 (s, 2H), 5,03 (t, $J = 2,40$ Hz, 1H), 3,52-3,51 (m, 1H), 2,20-2,10 (m, 2H), 1,78-1,68 (m, 4H).

Etapas 3: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-

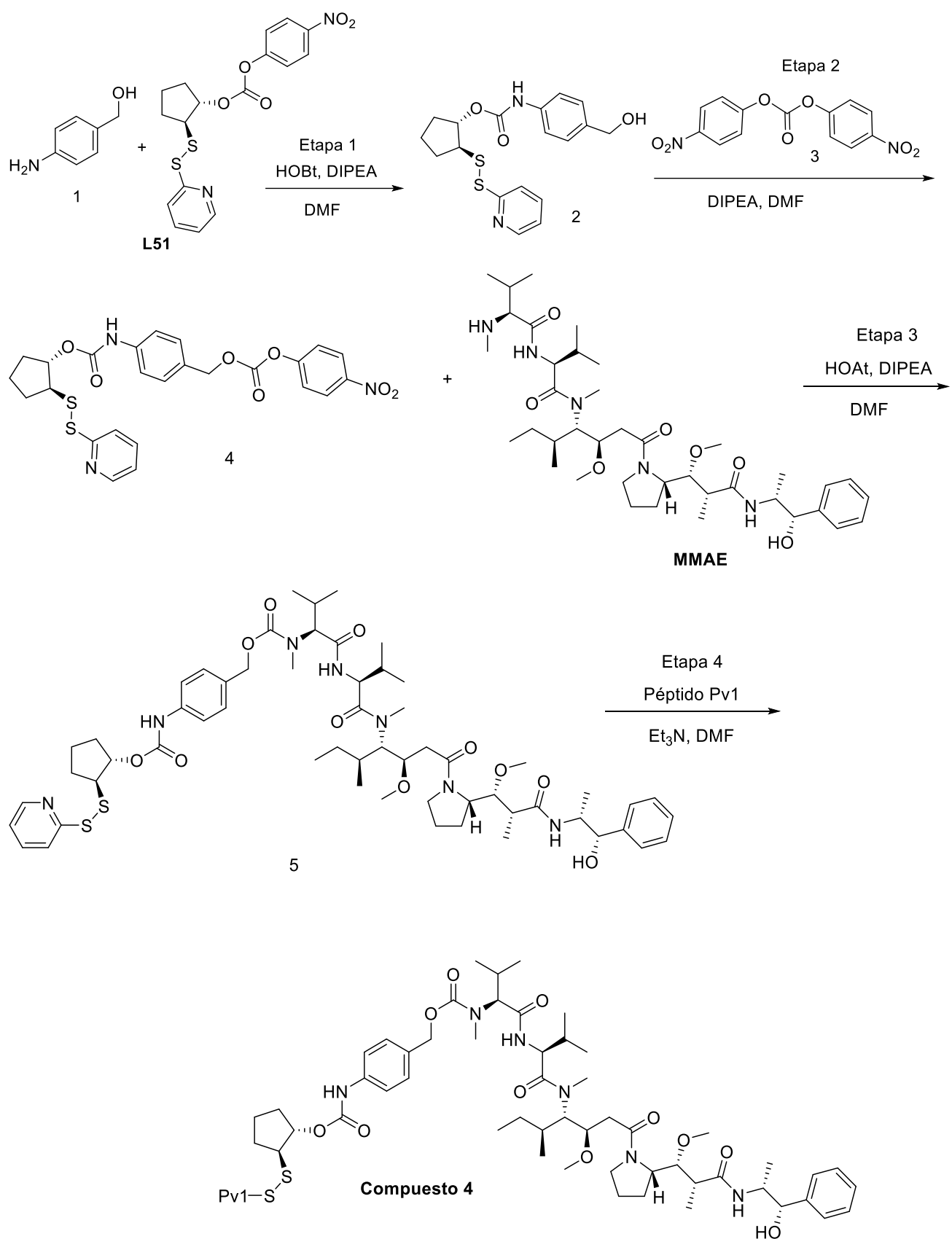
il)(metil)carbamato de 4-((((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)bencilo

A una solución agitada de (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (MMAE) (150 mg, 0,209 mmol) en DMF (1 ml) se le agregaron (4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (113 mg, 0,209 mmol), solución 1 M de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,104 ml, 0,104 mmol) y DIPEA (0,054 ml, 0,313 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción de producto se liofilizó para proporcionar ((S)-1-(((S)-1-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-((((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)bencilo (150 mg, 0,133 mmol, 63,6 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₈H₈₅N₇O₁₁S₂, 1119,57; hallada 1121,4 (M+H). HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 13,61; Pureza (Máx): 99,26 %.

Etapas 4: Síntesis del Compuesto 3

A una solución helada de ((S)-1-(((S)-1-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-((((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)bencilo (60 mg, 0,054 mmol) en DMF (0,5 ml) se le agregaron péptido Pv1 (176 mg, 0,054 mmol) y trietilamina (8,96 µl, 0,064 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción del producto se liofilizó para producir el Compuesto 3 (65 mg, 0,015 mmol, 27,8 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₂₀₅H₃₀₆N₄₂O₅₄S₂, 4284,19; hallada 1430,2 (M+3)/3. HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 12,20; Pureza (Máx): 99,84 %.

Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto 4



Etapla 1: Síntesis de (4-(hidroximetil)fenil) carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentilo

Una solución agitada de 2-(4-nitrofenil)acetato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (L-51) (380 mg, 0,974 mmol) y (4-aminofenil)metanol (120 mg, 0,974 mmol) en DMF (2,5 ml) se enfrió hasta 0 °C. Luego, se añadió DIPEA (0,339 ml, 1,949 mmol) seguido de HOBt (74,6 mg, 0,487 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se vertió en agua helada y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se secó en Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna mediante el uso de EtOAc al 50 % en éter de petróleo como eluyente. Las fracciones del producto se evaporaron a presión reducida para proporcionar (4-(hidroximetil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (304 mg, 0,798 mmol, 82 % de rendimiento) como goma marrón. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₈H₂₀F₆N₂O₃S₂, 376,09; hallada 377,1 (M+H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,61 (s, 1H), 8,45 (d, J = 4,80 Hz, 1H), 7,79-7,77 (m, 2H), 7,39-7,22 (m, 2H), 7,19-7,14 (m, 3H), 5,08 (t, J = 5,60 Hz, 1H), 5,00 (s, 1H), 4,41 (d, J = 5,60 Hz, 2H), 3,51-3,34 (m, 1H), 2,17-2,00 (m, 2H), 1,78-1,67 (m, 4H).

Etapla 2: Síntesis de (4-(((4-nitrofenoxi) carbonil) oxi) metil) fenil) carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentilo

A una solución de (4-(hidroximetil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (300 mg, 0,797 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (970 mg, 3,19 mmol) en DMF (5 ml) se añadió DIPEA (0,208 ml, 1,195 mmol) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se vertió en agua helada y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna mediante el uso de acetato de etilo al 25 % en éter de petróleo como eluyente. Las fracciones del producto se concentraron a presión reducida para proporcionar (4-(((4-nitrofenoxi) carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (330 mg, 0,599 mmol, 75 % de rendimiento) como un sólido gomoso de color amarillo. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₂₅H₂₃N₃O₇S₂, 541,10; hallada 542,0 (M+H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,78 (s, 1H), 8,45 (d, J = 5,20 Hz, 1H), 8,31-8,33 (m, 2H), 7,81-7,77 (m, 1H), 7,57 (d, J = 8,80 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 8,40 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 8,40 Hz, 2H), 7,24-7,21 (m, 1H), 5,23 (s, 2H), 5,03 (t, J = 2,40 Hz, 1H), 3,54-3,49 (m, 1H), 2,20-2,10 (m, 2H), 1,80-1,67 (m, 4H).

Etapla 3: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-((((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)bencilo

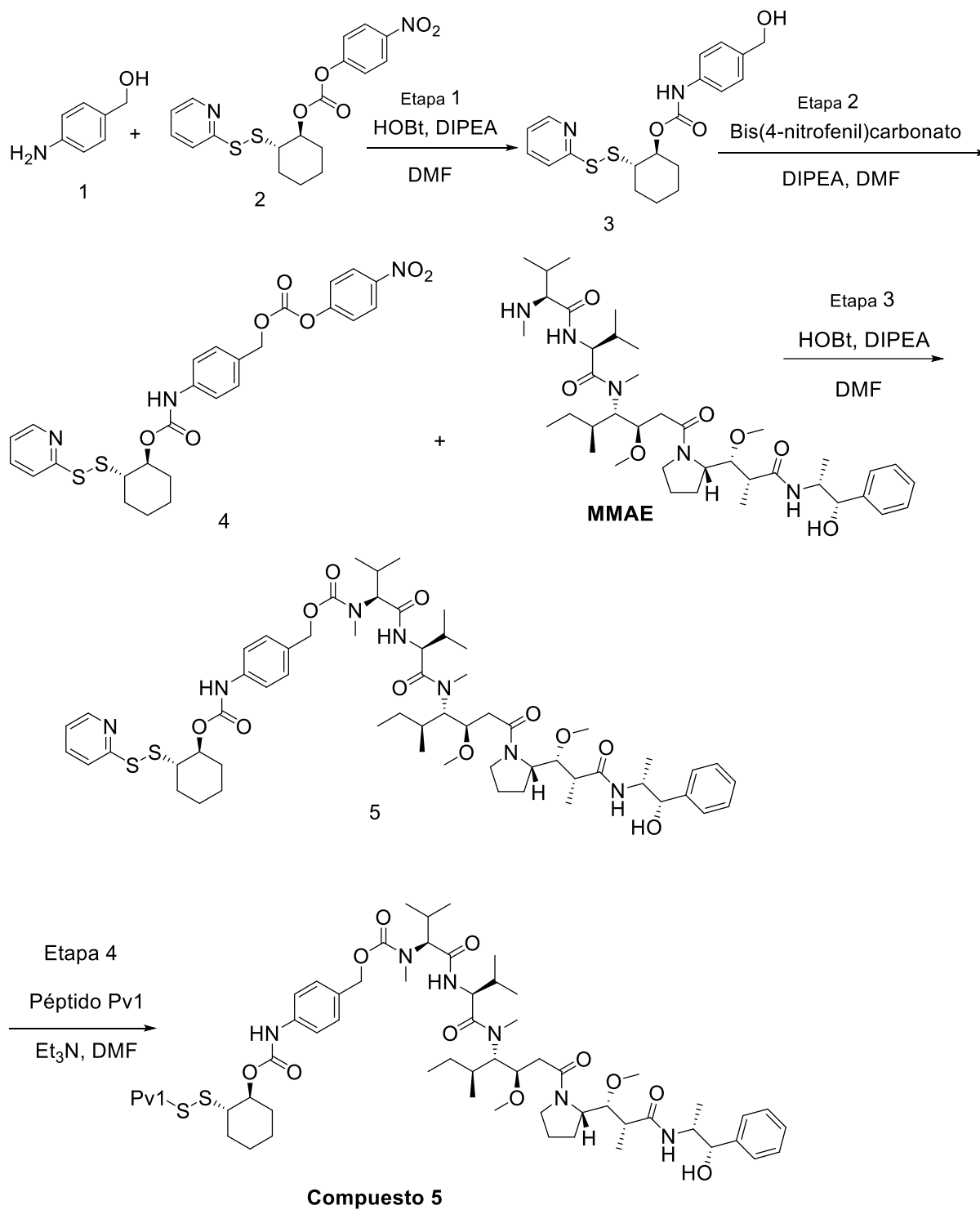
A una solución agitada de (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (150 mg, 0,209 mmol) y 4-((((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (113 mg, 0,209 mmol) en DMF (1 ml) se le agregaron una solución 1M de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,104 ml, 0,104 mmol) y DIPEA (0,055 ml, 0,313 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción de producto se liofilizó para proporcionar ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-((((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)bencilo (150 mg, 0,129 mmol, 61,9 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₈H₈₅N₇O₁₁S₂, 1119,57; hallada 1120,6 (M+H). HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 13,60; Pureza (Máx): 96,55 %.

Etapla 4: Síntesis del Compuesto 4

A una solución agitada de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-((((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)bencilo (70 mg, 0,062 mmol) y péptido Pv1 (203,2 mg, 0,062 mmol) en DMF (0,75 ml) se le agregó trietilamina (10,45 µl, 0,074 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 26 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción del producto se liofilizó para producir el Compuesto 4 (41 mg, 9,56 µmol, 15,4 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₂₀₅H₃₀₆N₄₂O₅₄S₂, 4284,19; hallada 1430,1 (M+3)/3. HPLC: Columna: Atlantis dC18

(250X4,6) mm, 5 μ m; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 12,33; Pureza (Máx): 99,61 %.

Ejemplo 5: Síntesis del Compuesto 5



Etapa 1: Síntesis de (4-(hidroximetil)fenil) carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclohexilo

Una solución agitada de (4-aminofenil)metanol (20 mg, 0,162 mmol) y ((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)carbonato de 4-nitrofenilo (79 mg, 0,195 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió con hielo. Se añadieron DIPEA (0,057 ml, 0,325 mmol) y 1H-benzo[d][1,2,3] triazol-1-ol (10,97 mg, 0,081 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura TA durante 36 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para obtener un residuo bruto. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna mediante el uso de acetato de etilo al 75-80 % en éter de petróleo como eluyente. La fracción del producto se evaporó para producir (4-(hidroximetil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (40 mg, 0,090 mmol, 55,4 % de rendimiento) se obtuvo como un sólido gomoso. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉H₂₂N₂O₃S₂, 390,11; hallada 391,1 (M+H). HPLC: Columna: X-Bridge C8 (50X4,6) mm, 3,5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:2,0 mL / min; RT (min): 3,80; Pureza (Máx): 87,78 %.

Etapa 2: Síntesis de (4-(((4-nitrofenoxi) carbonil) oxi) metil) fenil) carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclohexilo

A una solución agitada de (4-(hidroximetil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (20 mg, 0,051 mmol) en DMF (1 ml) se le agregaron carbonato de bis(4-nitrofenilo) (62,3 mg, 0,205 mmol) y DIPEA (0,013 ml, 0,077 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. A la mezcla de reacción, se le agregó agua helada y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se secó en Na₂SO₄, se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna mediante el uso de acetato de etilo al 15 % y éter de petróleo como eluyente. La fracción del producto se concentraron a presión reducida para proporcionar (4-(((4-nitrofenoxi) carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (12 mg, 0,021 mmol, 40,3 % de rendimiento) como un sólido gomoso. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₂₆H₂₅N₃O₇S₂, 555,11; hallada 555,9 (M+H).

Etapa 3: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (4-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)oxi)carbonil)amino)bencilo

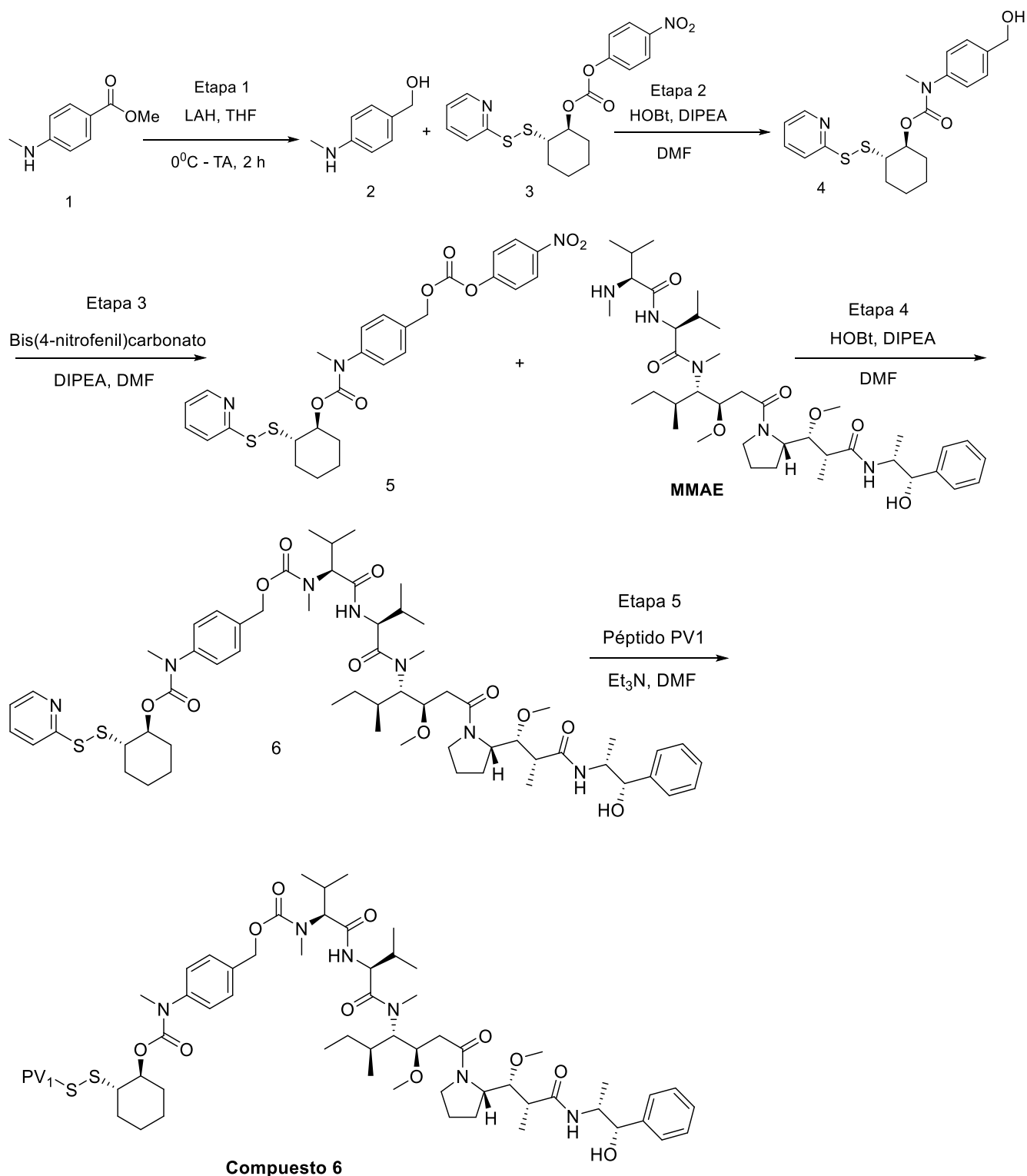
Una solución de (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-

dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (15,51 mg, 0,022 mmol) y 4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (12 mg, 0,022 mmol) en DMF (0,8 ml) se enfrió con hielo. A esta se le añadió DIPEA (5,66 µl, 0,032 mmol) y una solución 1 M de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (10,80 µl, 10,80 µmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción de producto se liofilizó para proporcionar ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-((((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)oxi)carbonil)amino)bencilo (15 mg, 0,013 mmol, 60,5 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₉H₈₇N₇O₁₁S₂, 1133,59; hallada 1135,1 (M+H). HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 15,62; Pureza (Máx): 98,83 %.

Etapas 4: Síntesis del Compuesto 5

Una solución de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-((((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)oxi)carbonil)amino)bencilo (15 mg, 0,013 mmol) y péptido Pv1 (47,7 mg, 0,015 mmol) en DMF (0,5 ml) se enfrió con hielo. A esta se añadió trietilamina (2,211 µl, 0,016 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción del producto se liofilizó para producir el Compuesto 5 (42 mg, 9,58 µmol, 72,5 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₂₀₆H₃₀₈N₄₂O₅₄S₂, 4298,21; hallada 1435,0 (M+3)/3. HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 12,93; Pureza (Máx): 98,12 %.

Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 6



Etapa 1: Síntesis de (4-(metilamino)fenil)metanol

A una solución agitada de 4-(metilamino) benzoato de metilo (0,2 g, 1,211 mmol) en THF (2 ml) se le agregó solución 2M de LAH en THF (0,726 ml, 1,453 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 horas. La mezcla de reacción se inactivó con solución

saturada de NH_4Cl . La capa de acetato de etilo se separó, se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida mediante el uso de acetato de etilo al 20 % en éter de petróleo. La fracción del producto se evaporó para proporcionar (4-(metilamino)fenil)metanol (150 mg, 0,847 mmol, 70,0 % de rendimiento) como un líquido amarillo. LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$, 137,08; hallada 138,2 (M+H). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,03 (d, $J = 8,40$ Hz, 2H), 6,50-6,50 (m, 2H), 5,49-5,48 (m, 1H), 4,33 (t, $J = 5,60$ Hz, 1H), 4,04 (d, $J = 6,80$ Hz, 2H), 2,66 (s, 3H).

Etap 2: Síntesis de (4-(hidroximetil)fenil) (metil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclohexilo

A una solución agitada de (4-(metilamino)fenil)metanol (30 mg, 0,219 mmol) en DMF (2 ml) se le agregaron ((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil) carbonato de 4-nitrofenilo (107 mg, 0,262 mmol), DIPEA (0,076 ml, 0,437 mmol) y 1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-ol (14,78 mg, 0,109 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 18 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para obtener un residuo bruto. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida. El producto se eluyó con acetato de etilo al 35 % en éter de petróleo. La fracción del producto se evaporó para producir (4-(hidroximetil)fenil) (metil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (40 mg, 0,057 mmol, 26,1 % de rendimiento) como un líquido amarillo. LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$, 404,12; hallada 405,1 (M+H).

Etap 3: Síntesis de metil(4-(((4-nitrofenoxi) carbonil) oxi) metil) fenil) carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclohexilo

A una solución agitada de (4-(hidroximetil)fenil)(metil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (40 mg, 0,099 mmol) en DMF (1 ml) se le agregaron carbonato de bis(4-nitrofenilo) (120 mg, 0,396 mmol) y DIPEA (0,035 ml, 0,198 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 6 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua helada, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida para obtener un residuo bruto. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida. El producto se eluyó con acetato de etilo al 20 % en éter de petróleo. La fracción del producto se evaporó para proporcionar (4-(((4-nitrofenoxi) carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (25 mg, 0,044 mmol, 44,3 % de rendimiento) como un sólido gomoso incoloro. LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$, 569,13; hallada 570,1 (M+H).

Etapas 4: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-(metil(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclohexil)oxi)carbonil)amino)bencilo

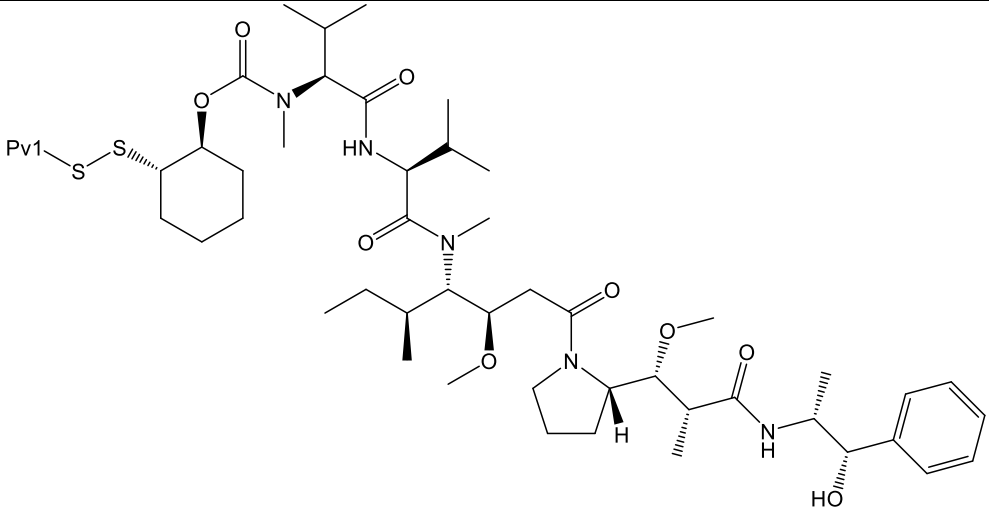
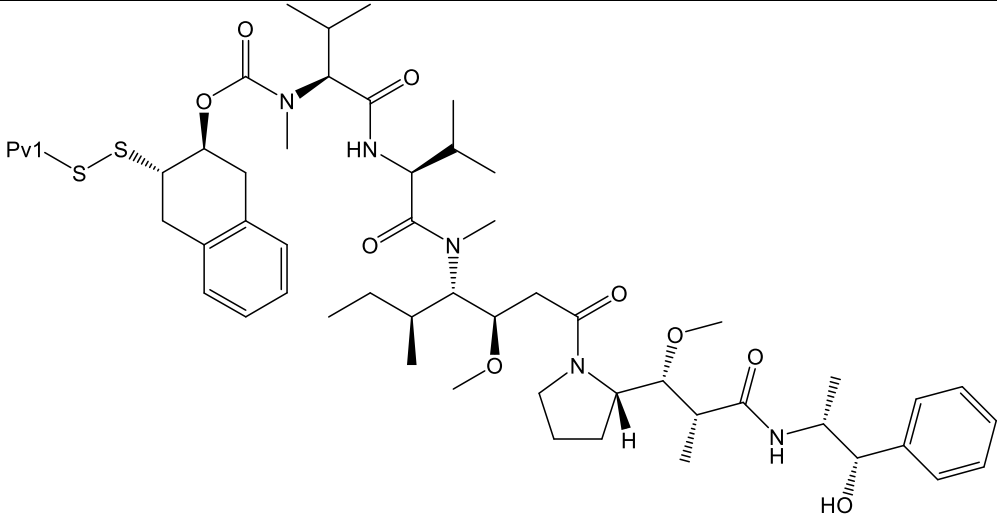
A una solución agitada de (S)-N-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (25 mg, 0,035 mmol) y metil(4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (19,83 mg, 0,035 mmol) en DMF (1 ml) se le agregaron DIPEA (9,12 µl, 0,052 mmol) y una solución 1 M de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,017 ml, 0,017 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción de producto se liofilizó para proporcionar ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-(metil(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)oxi)carbonil)amino)bencilo (33 mg, 0,026 mmol, 74,8 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₆₀H₈₉N₇O₁₁S₂, 1147,61; hallada 1149,6 (M+H).

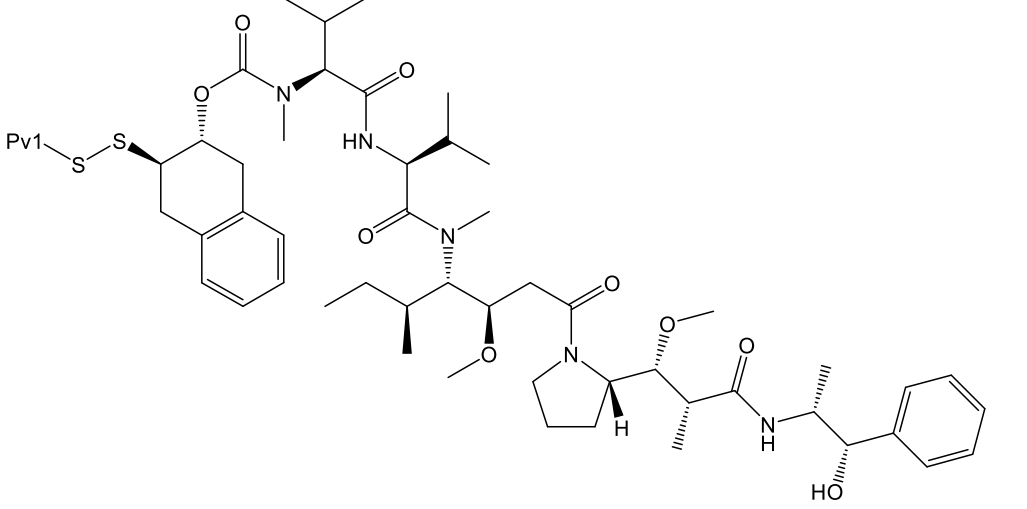
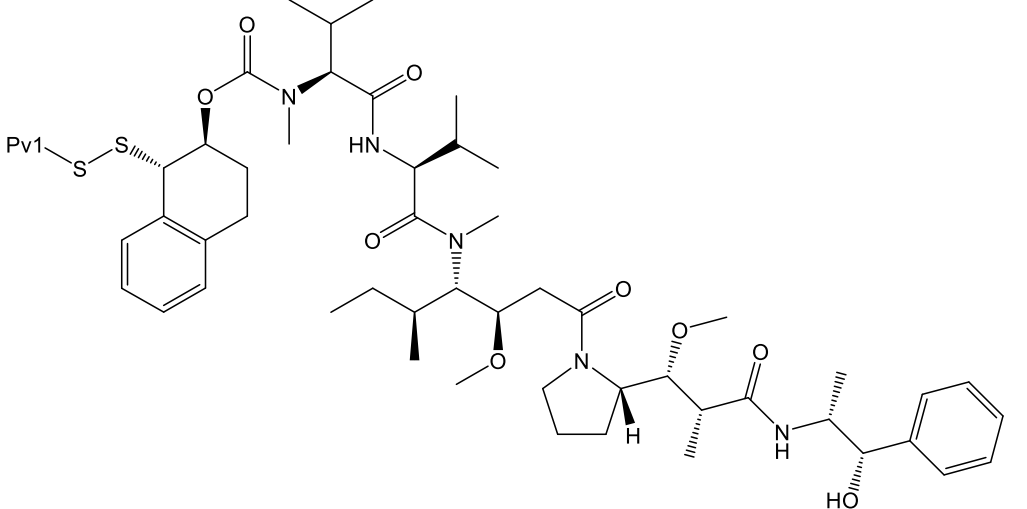
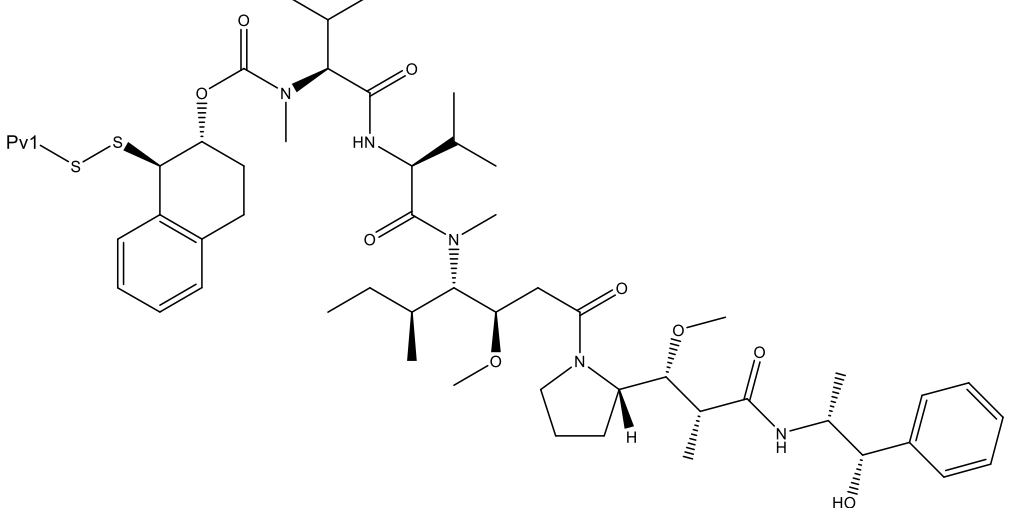
Etapas 5: Síntesis del Compuesto 6

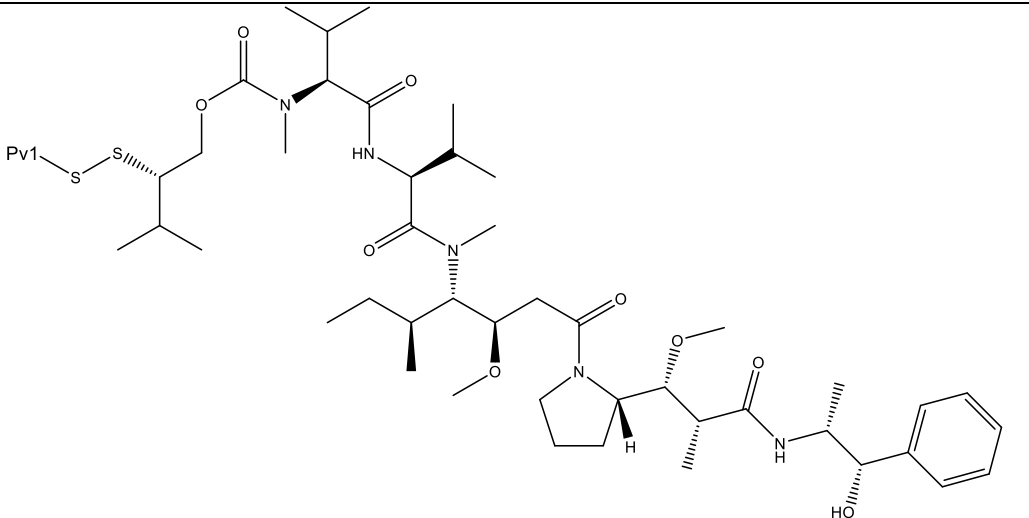
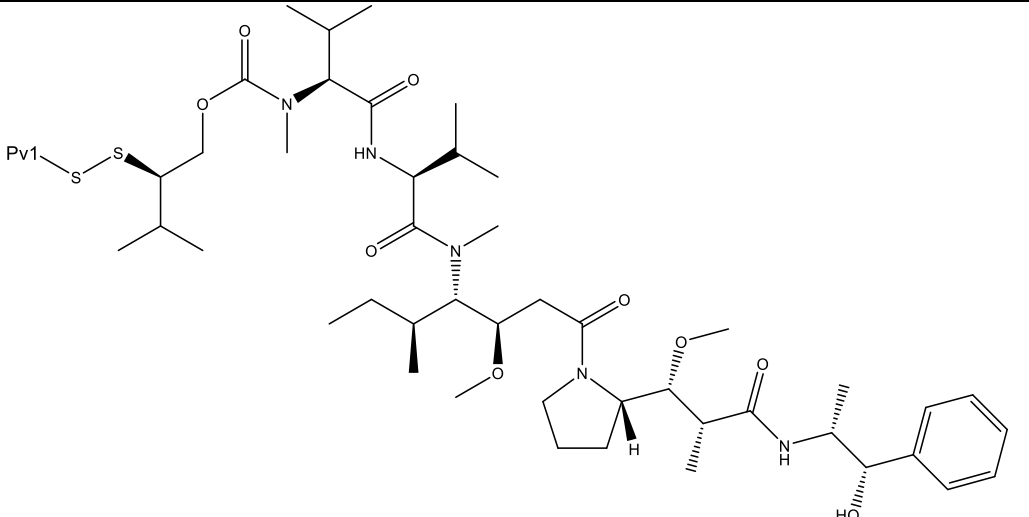
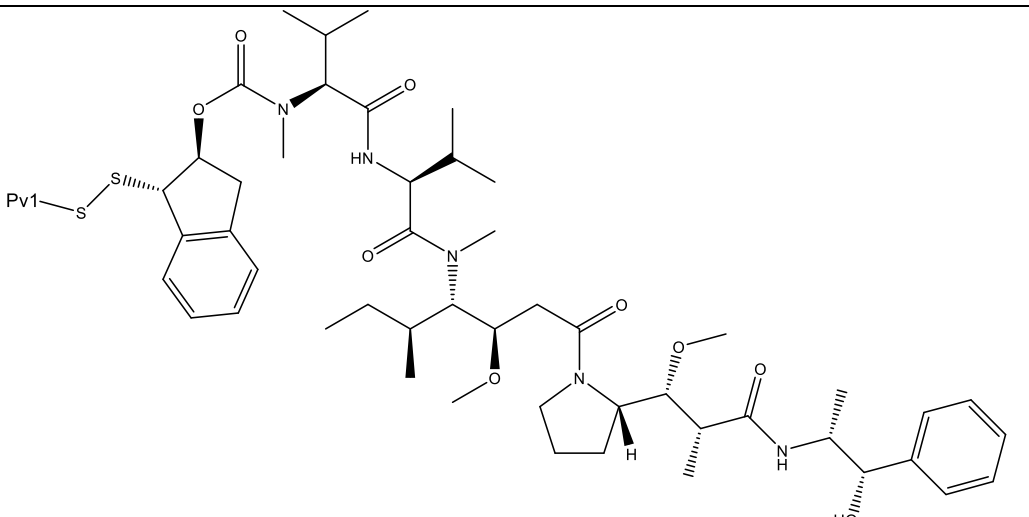
Una solución de (4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenil)(metil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (23 mg, 0,020 mmol) y péptido PV1 (72,2 mg, 0,022 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió con hielo. A esta se le añadió trietilamina (2,432 mg, 0,024 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción del producto se liofilizó para producir el Compuesto 6 (45 mg, 10,03 µmol, 50,1 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₂₀₇H₃₁₀N₄₂O₅₄S₂, 4312,22; hallada 1437,7 (M-3)/3. HPLC: Columna: Atlantis dC18 (250X4,6) mm, 5 µm; Fase móvil: A:TFA al 0,1 % en H₂O; Fase móvil: B: TFA al 0,1 % en ACN; Flujo:1,0 mL / min; RT (min): 12,66; Pureza (Máx): 96,18 %.

Los siguientes compuestos de la Tabla 2 se prepararon mediante el uso de los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores.

Tabla 2.

Ejemplo	Estructura
7	 Chemical structure of compound 7. It features a central chain of amide and ester linkages. On the left, a cyclohexane ring is connected via an ester linkage to a chiral center, which is further linked to a thiol group (S-S-Pv1). The main chain includes several amide bonds, a pyrrolidine ring, and a terminal hydroxyl group (HO) attached to a chiral center. The structure is highly complex with multiple stereocenters indicated by wedges and dashes.
8	 Chemical structure of compound 8. It is similar to compound 7, but the cyclohexane ring is replaced by a benzene ring. The rest of the molecule, including the amide and ester linkages, the pyrrolidine ring, and the terminal hydroxyl group, remains the same as in compound 7.

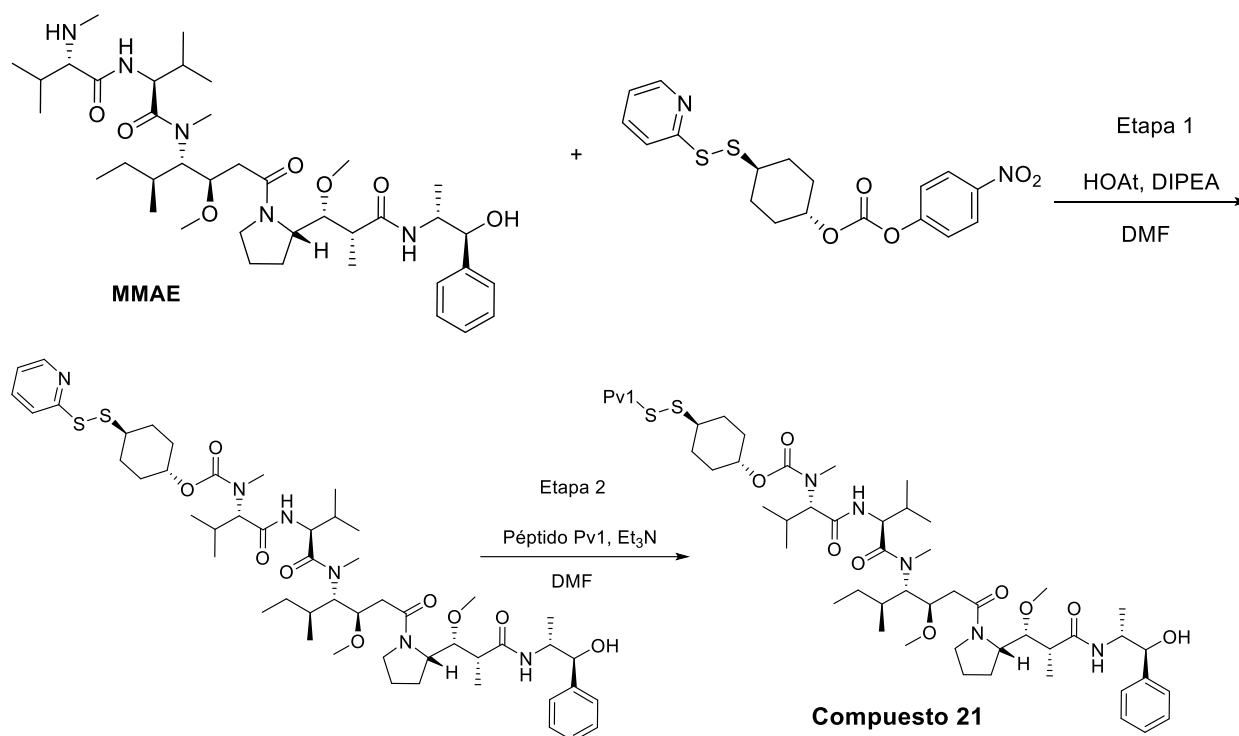
Ejemplo	Estructura
9	
10	
11	

Ejemplo	Estructura
12	
13	
14	

Ejemplo	Estructura
15	
16	
17	

Ejemplo	Estructura
18	
19	
20	

Ejemplo 21: Síntesis del Compuesto 21



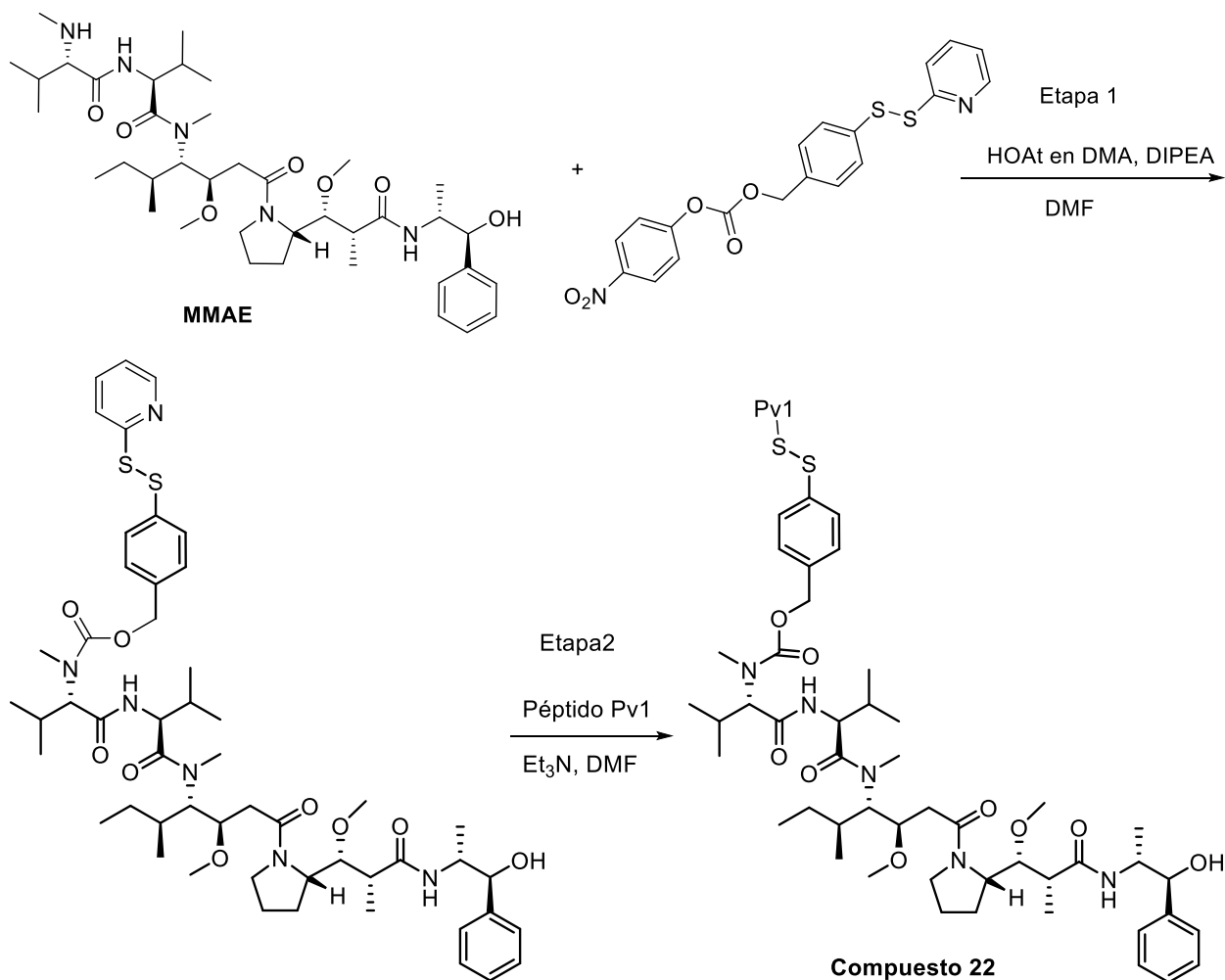
Etapa 1: Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de trans-4-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo

A una solución agitada de (S)-N-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (20 mg, 0,028 mmol) y (trans-4-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil) carbonato de 4-nitrofenilo (11,32 mg, 0,028 mmol) en DMF (0,5 ml) se le agregó DIPEA (7,3 µL, 0,042 mmol) seguido r 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (13,92 µl, 13,92 µmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de trans-4-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (19 mg, 0,019 mmol, 69,2 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₁H₈₀N₆O₉S₂, 985,34; hallada 985,3.

Etapa 2: Síntesis del Compuesto 21

Una solución de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de *trans*-4-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (19 mg, 0,019 mmol) en DMF (0,5 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (69,54 mg, 0,021 mmol) y trietilamina (3,22 µl, 0,023 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 21 (80 mg, 0,019 mmol, 99,9 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido era una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉₈H₃₀₁N₄₁O₅₂S₂, 4151,941; hallada 1384,8 [(M+3)/3]; HPLC: Columna Atlantis dC18 (250 X4,6)mm, 5µm, Fase móvil A : TFA al 0,1 % en agua MilliQ, Fase móvil B: ACN; Flujo: 1,0 mL / min; RT (min): 11,826; Pureza (Máx): 99,71 %.

Ejemplo 22: Síntesis del Compuesto 22

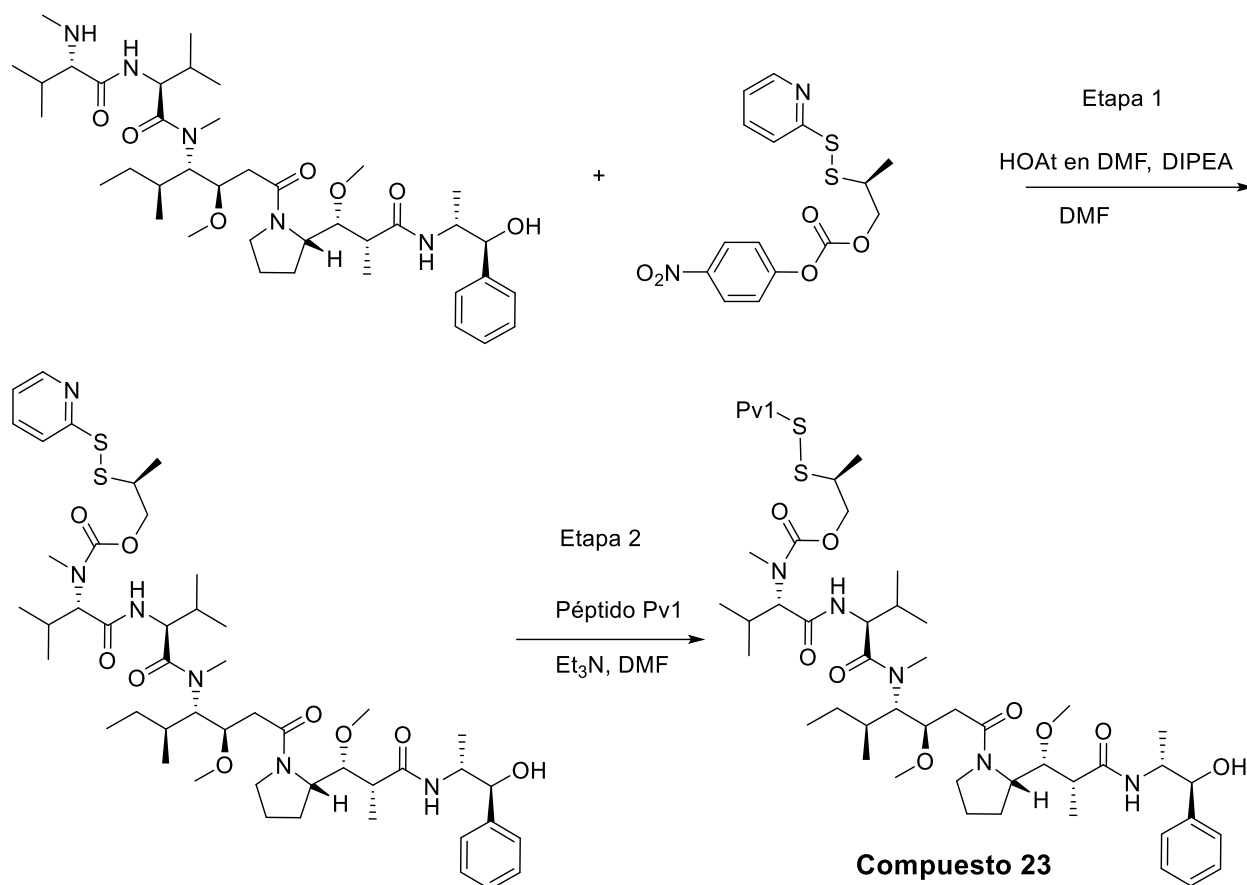


Etapla 1: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-(piridin-2-ildisulfaneil)bencilo

A una solución agitada de (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (50 mg, 0,069 mmol) y (4-(piridin-2-ildisulfaneil)bencil) carbonato de 4-nitrofenilo (37,52 mg, 0,090 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (24,13 μ L, 0,014 mmol) seguido r 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,47 ml, 0,035 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-(piridin-2-ildisulfaneil)bencilo (22 mg, 0,022 mmol, 31,80 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₂H₇₆N₆O₉S₂, 993,333; hallada 994,5.

Etapla 2: Síntesis del Compuesto 22

Una solución de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de 4-(piridin-2-ildisulfaneil)bencilo (22 mg, 0,022 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (80 mg, 0,024 mmol) y trietilamina (12,34 μ L, 0,088 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 22 (40 mg, 0,022 mmol, 43,41 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉₉H₂₉₇N₄₁O₅₂S₂, 4159,920; hallada 1385,1 [(M-3)/3]; HPLC: Columna X-Bridge C8(50X4,6)mm,3,5 μ m, Fase móvil:A:TFA al 0,1 % en agua, Fase móvil:B:TFA al 0,1 % en ACN, Flujo:2,0mL/min; RT (min): 5,52; Pureza (Máx): 99,147 %.

Ejemplo 23: Síntesis del Compuesto 23

Etapa 1: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)propilo

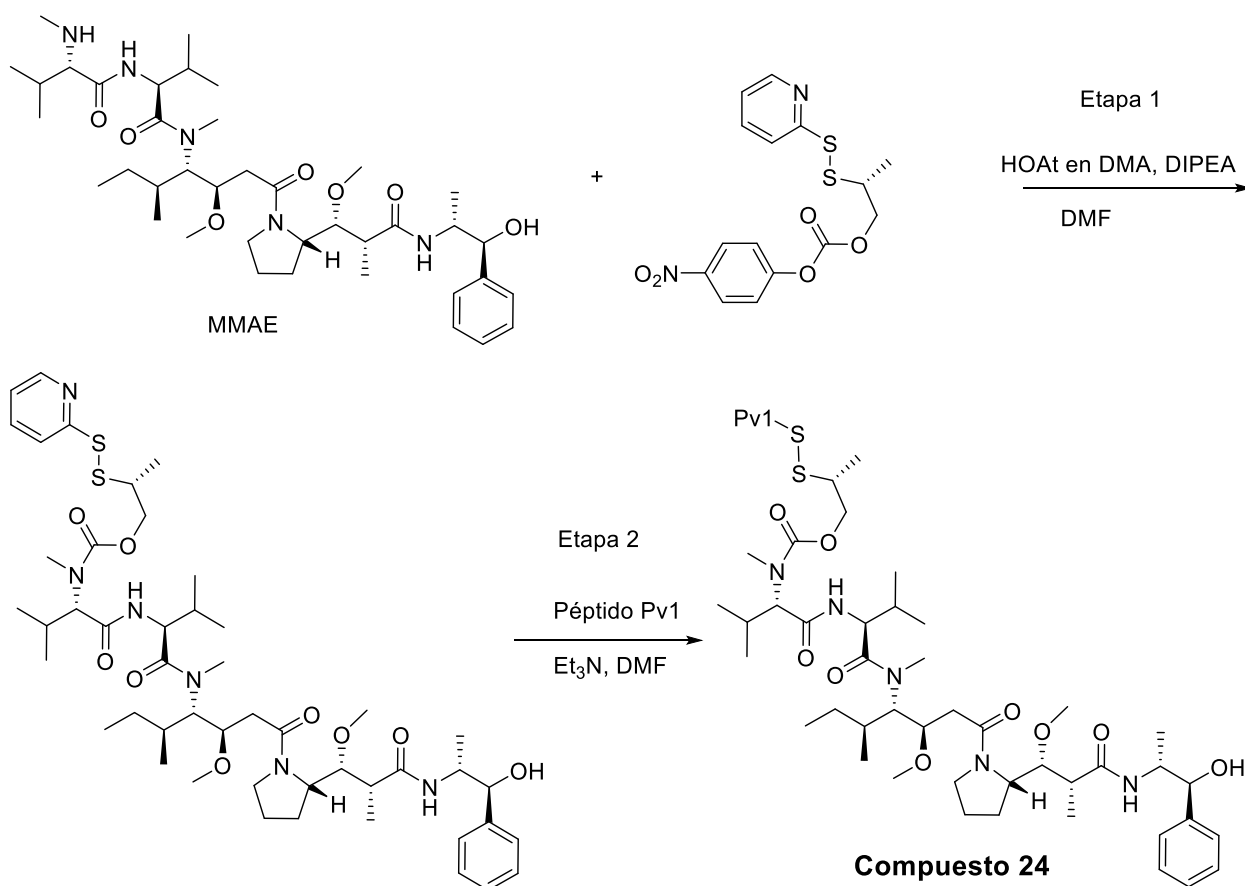
A una solución agitada de (S)-N-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (50 mg, 0,069 mmol) y (2-(piridin-2-ildisulfaneil)propil) carbonato de (S)-4-nitrofenilo (30,61 mg, 0,090 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (24,13 μL , 0,014 mmol) seguido r 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,47 ml, 0,035 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H_2O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)propilo (40 mg, 0,041 mmol, 60,77 % de rendimiento) como un sólido blanco.

LCMS: $[M + H]^+$ calculada para $C_{48}H_{76}N_6O_9S_2$, 945,289; hallada 945,5.

Etapas 2: Síntesis del Compuesto 23

Una solución de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)propilo (40 mg, 0,042 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (152 mg, 0,046 mmol) y trietilamina (23,59 µl, 0,169 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 23 (126,3 mg, 0,030 mmol, 72,59 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: $[M + H]^+$ calculada para $C_{195}H_{297}N_{41}O_{52}S_2$, 4111,876; hallada 1371,1 [(M+3)/3]; HPLC: Columna X-Bridge C8(50X4,6)mm,3,5µm, Fase móvil:A:TFA al 0,1 % en agua, Fase móvil:B:TFA al 0,1 % en ACN, Flujo:2,0 mL/min; RT (min): 5,43; Pureza (Máx): 98,857 %.

Ejemplo 24: Síntesis del Compuesto 24



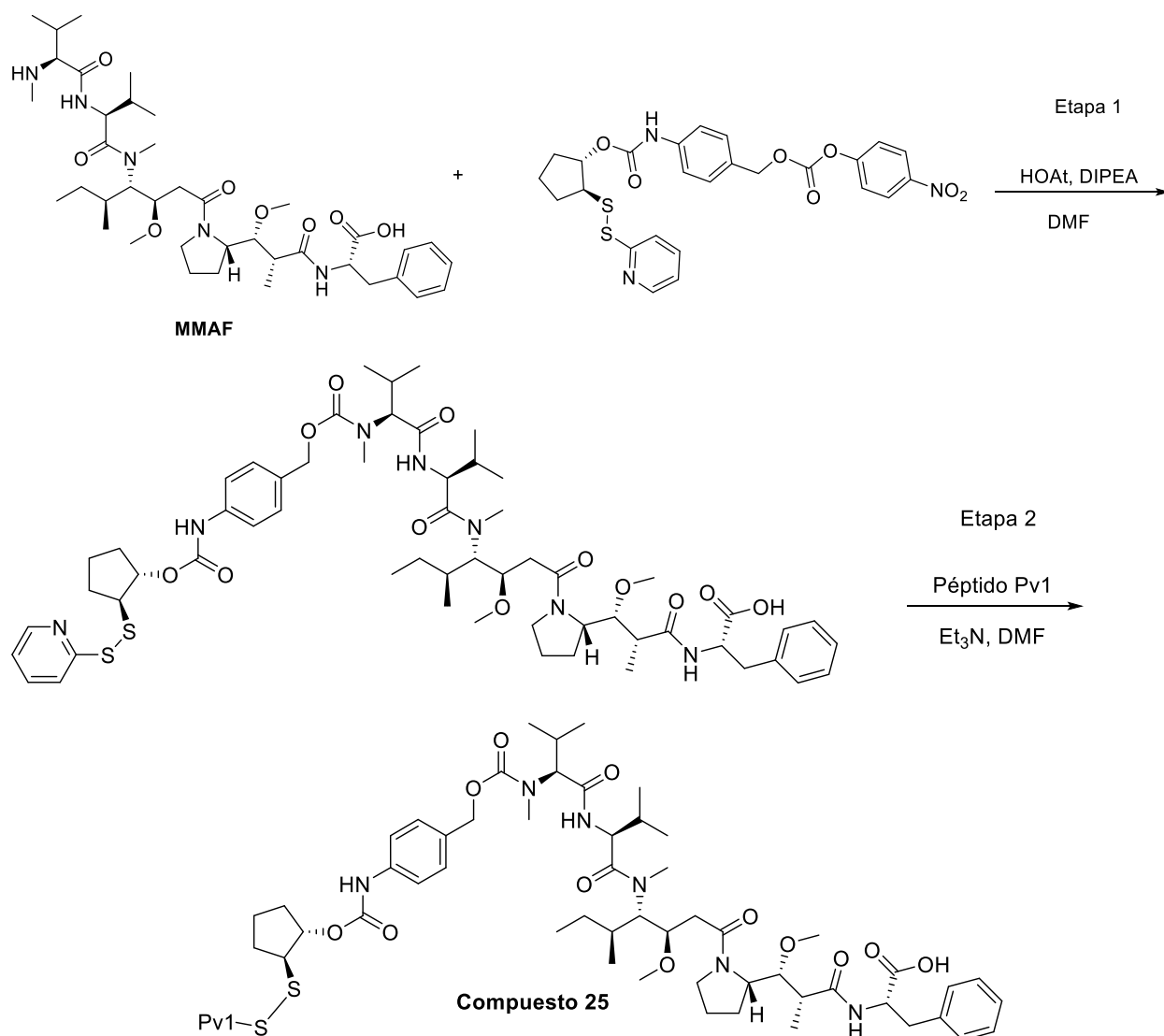
Etapla 1: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)propilo

A una solución agitada de (S)-N-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (50 mg, 0,069 mmol) y (2-(piridin-2-ildisulfaneil)propil) carbonato de (R)-4-nitrofenilo (30,619 mg, 0,083 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (24,13 µL, 0,014 mmol) seguido r 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,47 ml, 0,035 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)propilo (40 mg, 0,042 mmol, 60,77 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₄₈H₇₆N₆O₉S₂, 945,289; hallada 946,4.

Etapla 2: Síntesis del Compuesto 24

Una solución de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)propilo (40 mg, 0,042 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (138,73 mg, 0,042 mmol) y trietilamina (11,79 µL, 0,084 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 24 (40 mg, 0,01 mmol, 22,98 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉₅H₂₉₇N₄₁O₅₂S₂, 4111,876; hallada 1369,1 [(M-3)/3]; HPLC: Columna X-Bridge C8(50X4,6)mm,3,5µm, Fase móvil:A:TFA al 0,1 % en agua, Fase móvil:B:TFA al 0,1 % en ACN, Flujo:2,0 mL/min; RT (min): 5,43; Pureza (Máx): 98,413 %.

Ejemplo 25: Síntesis del Compuesto 25



Etapa 1: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentil) oxi) carbonil) amino) bencil) oxi) carbonil) amino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina

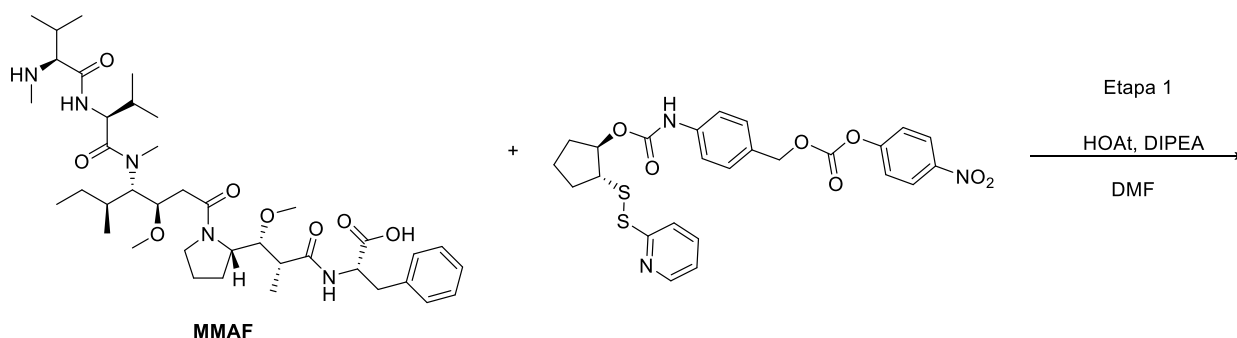
A una solución agitada de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil lamino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (100 mg, 0,137 mmol) y (4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentilo (74 mg, 0,137 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (0,036 ml, 0,205 mmol) seguido por 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,068 ml, 0,068 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para

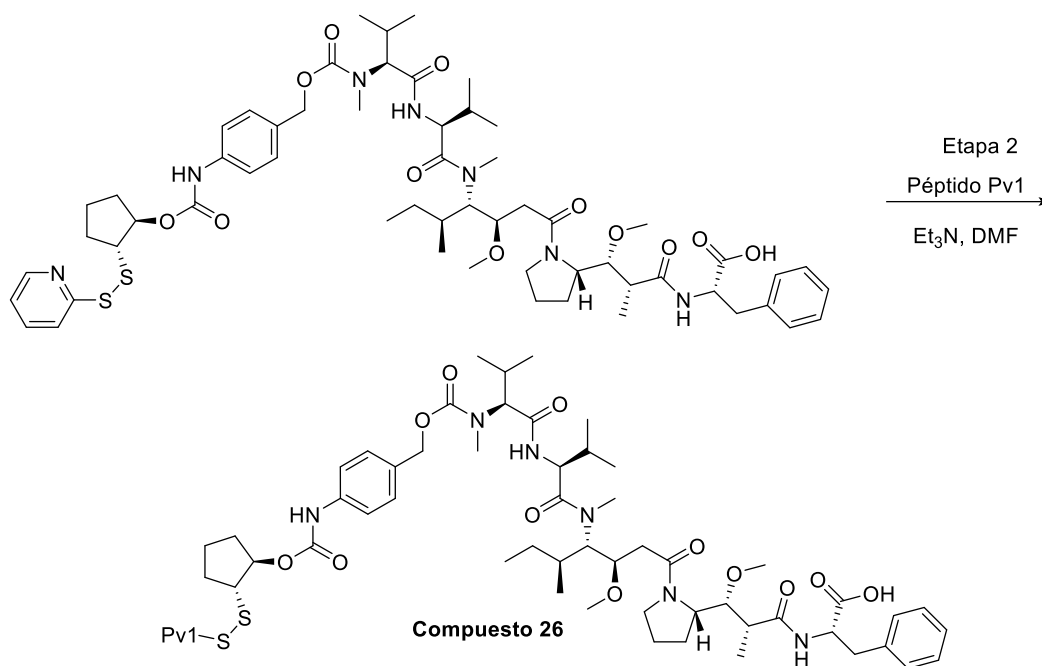
proporcionar: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentil)oxi)carbonil)amino) bencil)oxi)carbonil)amino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (80 mg, 0,066 mmol, 51,61 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: $[M + H]^+$ calculada para $C_{58}H_{83}N_7O_{12}S_2$, 1134,459; hallada 1134,5.

Etapas 2: Síntesis del Compuesto 25

Una solución de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentil) oxi) carbonil) amino) bencil) oxi) carbonil) amino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (50 mg, 0,044 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido PV1 (145 mg, 0,044 mmol) y trietilamina (7,37 μ l, 0,053 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H_2O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 25 (40 mg, 0,01 mmol, 21,10 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: $[M + H]^+$ calculada para $C_{205}H_{304}N_{42}O_{55}S_2$, 4301,046; hallada 1434,8 $[(M+3)/3]$; HPLC: Columna Atlantis dC18 (250 X4,6)mm, 5 μ m, Fase móvil A : TFA al 0,1 % en agua MilliQ, Fase móvil B: ACN; Flujo: 1,0 mL / min; RT (min): 12,056; Pureza (Máx): 99,47 %.

Ejemplo 26: Síntesis del Compuesto 26





Etapa 1: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentil) oxi) carbonil) amino) bencil) oxi) carbonil) amino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina

A una solución agitada de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (40 mg, 0,054 mmol) y (4-(((4-nitro fenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1R,2R)-2-(piridin-2-il disulfaneil)ciclopentilo (29,59 mg, 0,054 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (14,20 μ l, 0,082 mmol) seguido por 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (2,73 μ l, 0,027 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)bencil)oxi)carbonil) amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (35 mg, 0,031 mmol, 56,46 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₈H₈₃N₇O₁₂S₂, 1134,459; hallada 1133,8.

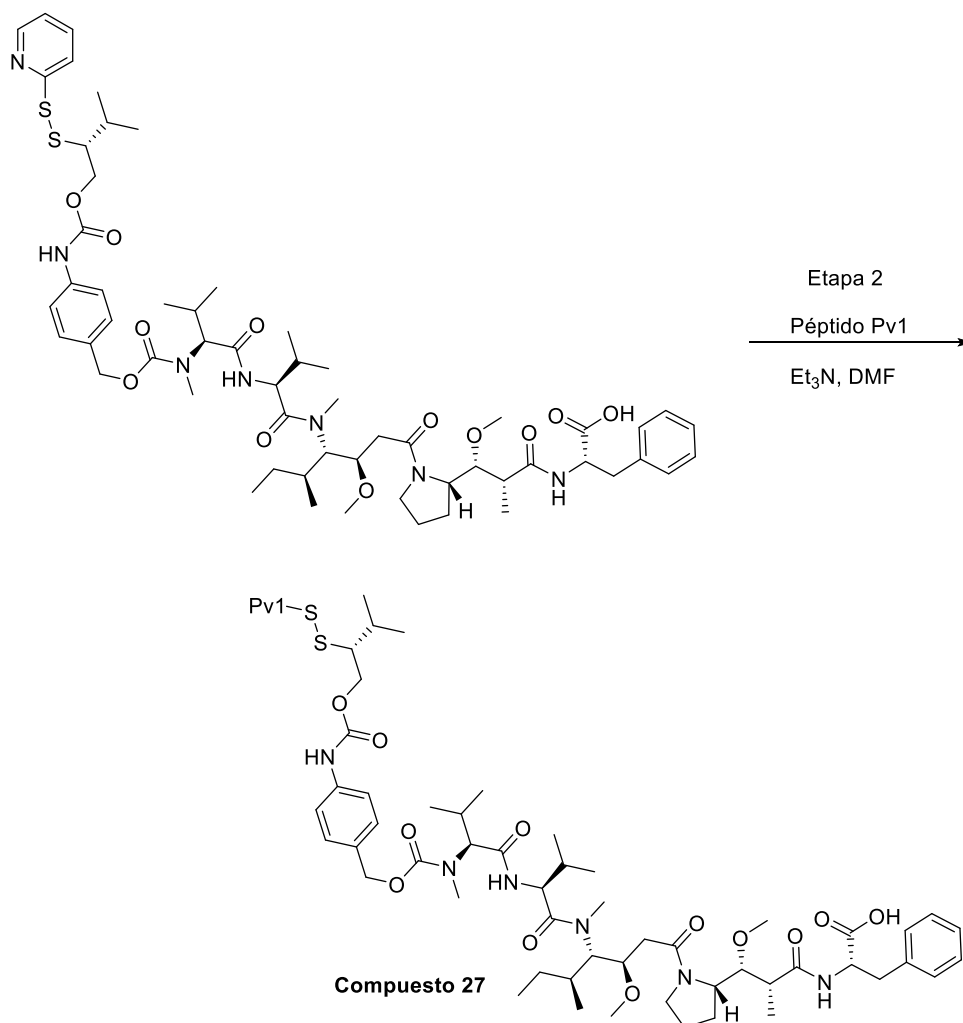
Etapa 2: Síntesis del Compuesto 26

Una solución de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclopentil) oxi) carbonil) amino) bencil) oxi) carbonil) amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (35 mg, 0,031 mmol, 56,46 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₈H₈₃N₇O₁₂S₂, 1134,459; hallada 1133,8.

Etapa 1

HOAt en DMA, DIPEA

DMF



Etapa 1: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfaneil)butoxi) carbonil)amino) \bencil) oxi) carbonil) amino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina

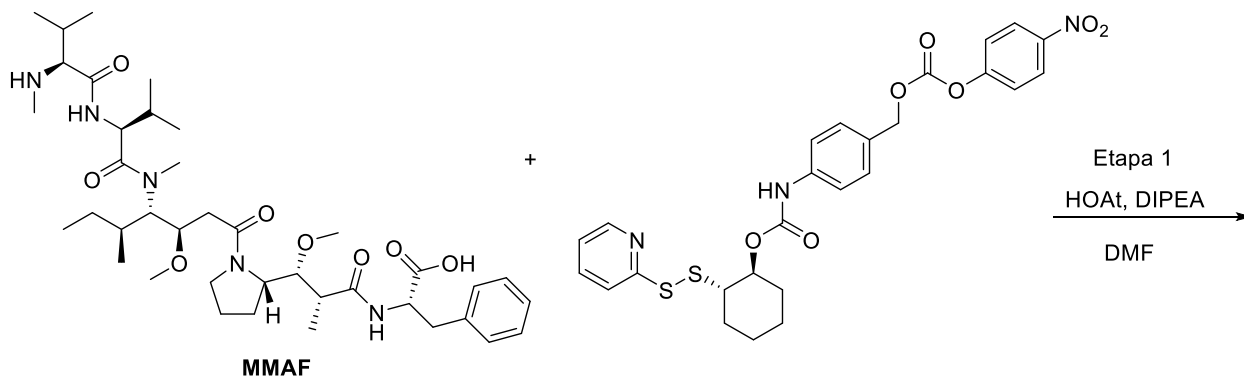
A una solución agitada de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (40 mg, 0,054 mmol) y (4-(((4-nitro fenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (R)-3-metil-2-(piridin-2-il disulfaneil) butilo (1) (29,70 mg, 0,054 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (10,59 μ l, 0,082 mmol) seguido por 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (3,71 μ l, 0,027 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfaneil)butoxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (35 mg, 0,029

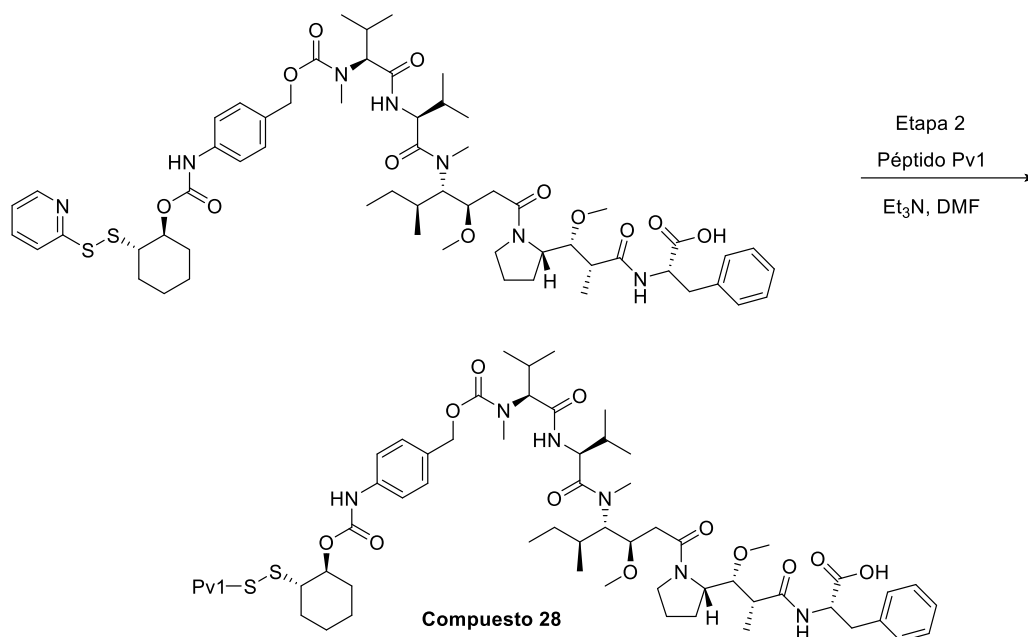
mmol, 56,36 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: $[M + H]^+$ calculada para $C_{58}H_{85}N_7O_{12}S_2$, 1136,475; hallada 1136,5.

Etapas 2: Síntesis del Compuesto 27

Una solución de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfaneil)butoxi)carbonil)amino) bencil)oxi) carbonil)amino) butanamido) butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (35 mg, 0,031 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (100,9 mg, 0,031 mmol) y trietilamina (5,15 µl, 0,037 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 27 (64 mg, 0,014 mmol, 47,22 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: $[M + H]^+$ calculada para $C_{205}H_{306}N_{42}O_{55}S_2$, 4303,062; hallada 1435,4 $[(M+3)/3]$; HPLC: Columna X-Bridge C8(50X4,6)mm,3,5µm, Fase móvil:A:TFA al 0,1 % en agua, Fase móvil:B:TFA al 0,1 % en ACN, Flujo:2,0 mL/min; RT (min): 5,83; Pureza (Máx): 96,842 %.

Ejemplo 28: Síntesis del Compuesto 28





Etapa 1: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclohexil) oxi) carbonil) amino) bencil) oxi) carbonil) amino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina

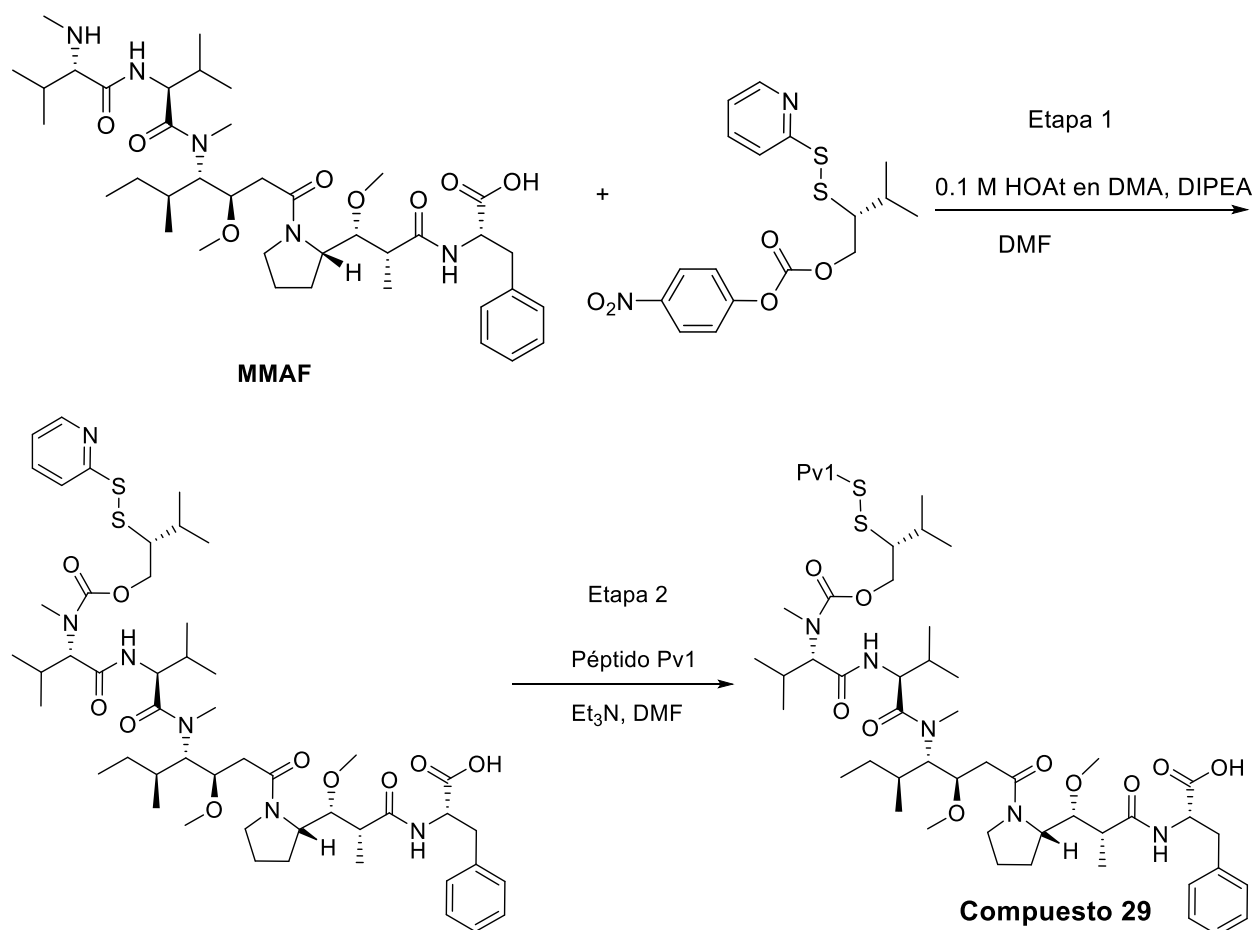
A una solución agitada de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil amino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (51 mg, 0,069 mmol) y (4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamato de (1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexilo (38,71 mg, 0,069 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (18,10 μ l, 0,104 mmol) seguido por 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (3,48 μ l, 0,034 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclohexil)oxi)carbonil)amino)bencil)oxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (33 mg, 0,029 mmol, 41,23 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₉H₈₅N₇O₁₂S₂, 1148,486; hallada 1148,5.

Etapa 2: Síntesis del Compuesto 28

Una solución de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((4-(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil) ciclohexil) oxi) carbonil) amino) bencil) oxi) carbonil)

amino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (33 mg, 0,029 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (103,63 mg, 0,031 mmol) y trietilamina (4,80 µl, 0,034 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 28 (75 mg, 0,017 mmol, 60,49 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₂₀₆H₃₀₆N₄₂O₅₅S₂, 4315,073; hallada 1439,3 [(M+3)/3]; HPLC: Columna Atlantis dC18 (250 X4,6)mm, 5µm, Fase móvil A : TFA al 0,1 % en agua MilliQ, Fase móvil B: ACN; Flujo: 1,0 mL / min; RT (min): 12,516; Pureza (Máx): 99,59 %.

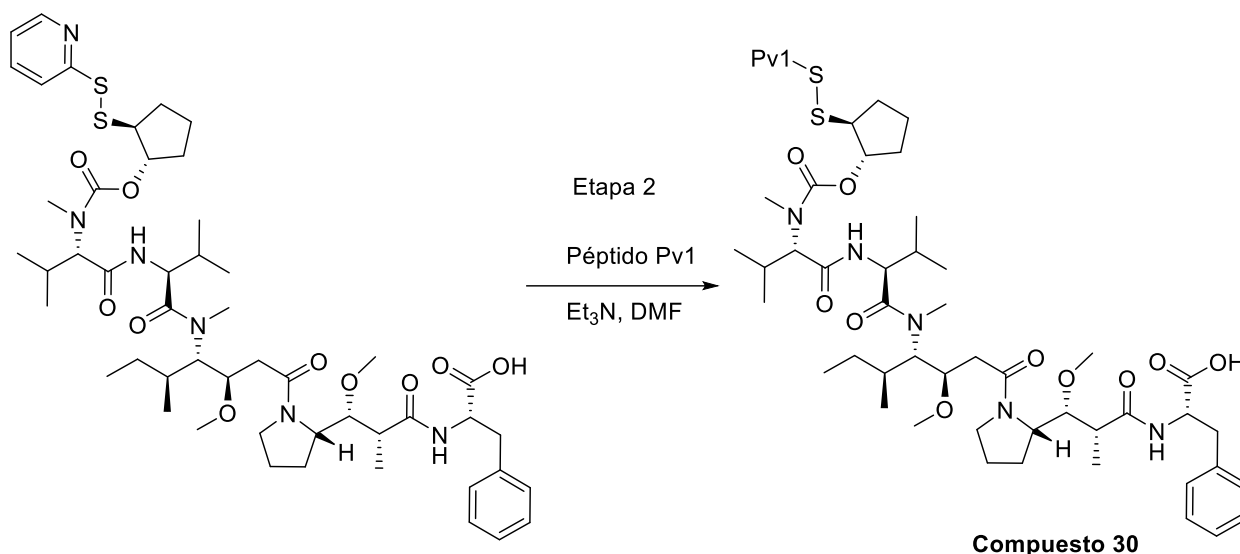
Ejemplo 29: Síntesis del Compuesto 29



Etapa 1: ((2R,3R)-3-((R)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfaneil)butoxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina

A una solución agitada de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-

Una solución de ((2R,3R)-3-((R)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((R)-3-metil-2-(piridin-2-ildisulfaneil)butoxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (150 mg, 0,152 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (498 mg, 0,152 mmol) y trietilamina (41,8 µl, 0,304 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 29 (425 mg, 0,101 mmol, 67,34 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉₇H₂₉₉N₄₁O₅₃S₂, 4153,913; hallada 1385,7 [(M+3)/3]; HPLC: Columna Atlantis dC18 (250 X4,6)mm, 5µm, Fase móvil A : TFA al 0,1 % en agua MilliQ, Fase móvil B: ACN; Flujo: 1,0 mL / min; RT (min): 12,257; Pureza (Máx): 98,793 %.



Etapa 1: ((2R,3R)-3-((R)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina

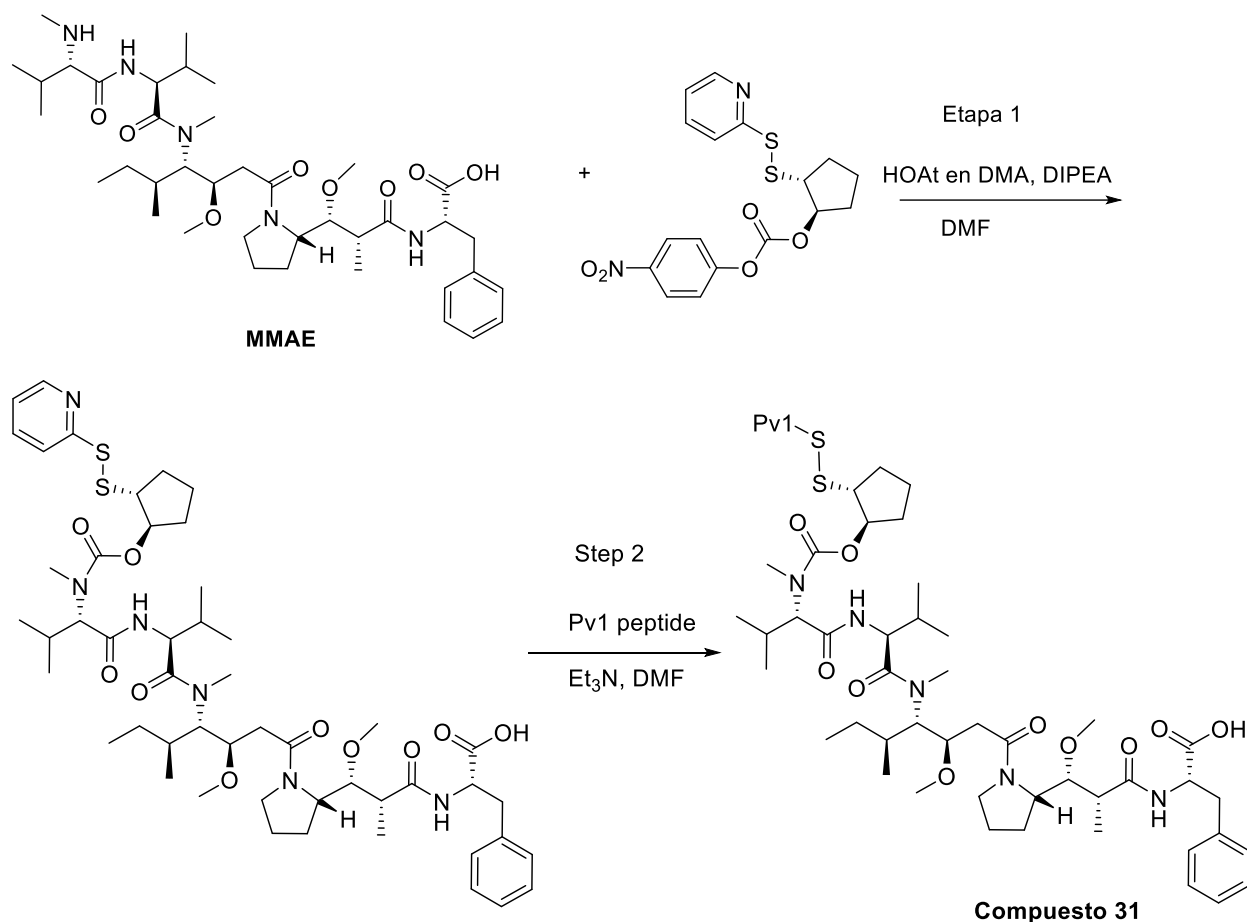
A una solución agitada de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (56 mg, 0,076 mmol) y ((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil) carbonato de 4-nitrofenilo (35,84 mg, 0,092 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (20,42 μ l, 0,115 mmol) seguido por 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (5,20 μ l, 0,038 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar: ((2R,3R)-3-((R)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (2) (45 mg, 0,041 mmol, 59,69 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₀H₇₆N₆O₁₀S₂, 985,310; hallada 983,4 (M-H)

Etapa 2: Síntesis del Compuesto 30

Una solución de ((2R,3R)-3-((R)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((1S,2S)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (43 mg, 0,044 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (143 mg, 0,044 mmol) y trietilamina

(12,16 µl, 0,087 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 30 (102 mg, 0,024 mmol, 56,29 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉₇H₂₉₇N₄₁O₅₃S₂, 4151,897; hallada 1383,1 [(M-3)/3]; HPLC: Columna X-Bridge C8(50X4,6)mm,3,5µm, Fase móvil:A:TFA al 0,1 % en agua, Fase móvil:B:TFA al 0,1 % en ACN, Flujo:2,0 mL/min; RT (min): 5,596; Pureza (Máx): 98,55 %

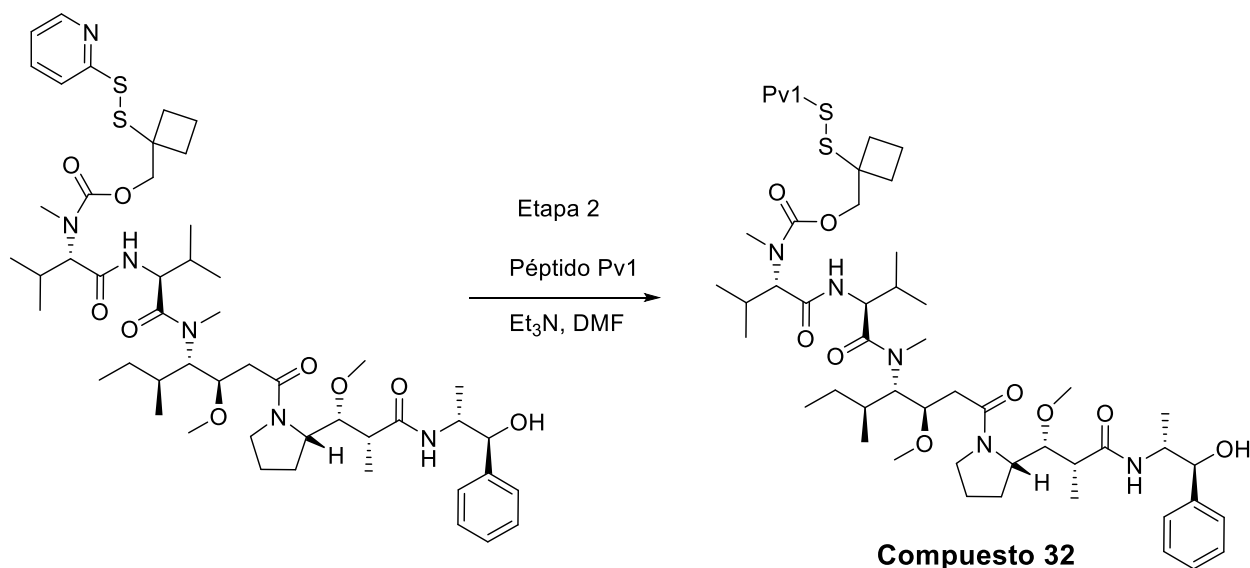
Ejemplo 31: Síntesis del Compuesto 31



Etapa 1: ((2R,3R)-3-((R)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina

A una solución agitada de ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino) butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (56 mg, 0,076 mmol) y ((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil) carbonato de (4-nitrofenilo) (35,84 mg, 0,092 mmol) en DMF (1 ml) se

Una solución de ((2R,3R)-3-(((R)-1-(((3R,4S,5S)-4-(((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metil(((1R,2R)-2-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclopentil)oxi)carbonil)amino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoil)-L-fenilalanina (25 mg, 0,025 mmol) en DMF (1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (83 mg, 0,025 mmol) y trietilamina (2,56 µl, 0,025 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 31 (70 mg, 0,017 mmol, 66,44 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₁₉₇H₂₉₇N₄₁O₅₃S₂, 4151,897; hallada 1384,9 [(M+3)/3]; HPLC: Columna Atlantis dC18 (250 X4,6)mm, 5µm, Fase móvil A : TFA al 0,1 % en agua MilliQ, Fase móvil B: ACN; Flujo: 1,0 mL / min; RT (min): 12,134; Pureza (Máx): 98,998 %



Etapa 1: ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclobutil)metilo

A una solución agitada de (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (50 mg, 0,069 mmol) y ((1-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclobutil)metil) carbonato de 4-nitrofenilo (2) (36,55 mg, 0,083 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó DIPEA (24,13 μ L, 0,014 mmol) seguido r 1-hidroxi-7-azabenzotriazol en DMA (0,47 ml, 0,035 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de HCOOH al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para proporcionar:

((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclobutil)metilo (35 mg, 0,034 mmol, 49,45 % de rendimiento) como un sólido blanco. LCMS: [M + H]⁺ calculada para C₅₀H₇₇N₇O₁₁S₂, 1016,324; hallada 1015,0 (M-H)

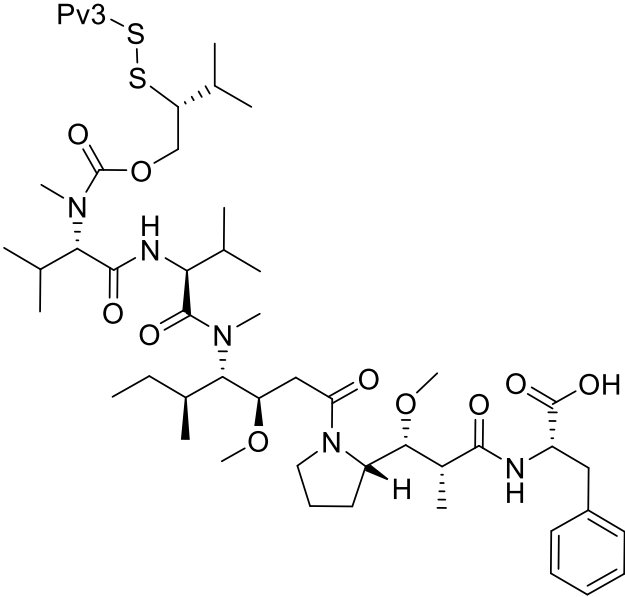
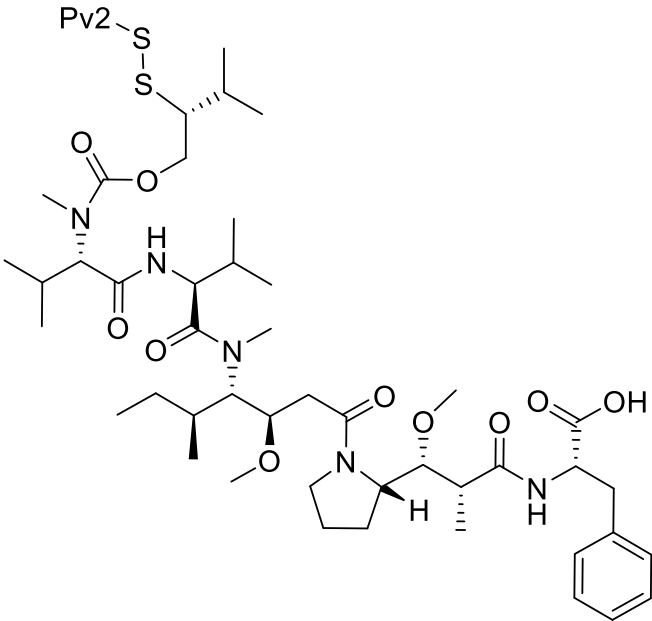
Etapa 2: Síntesis del Compuesto 32

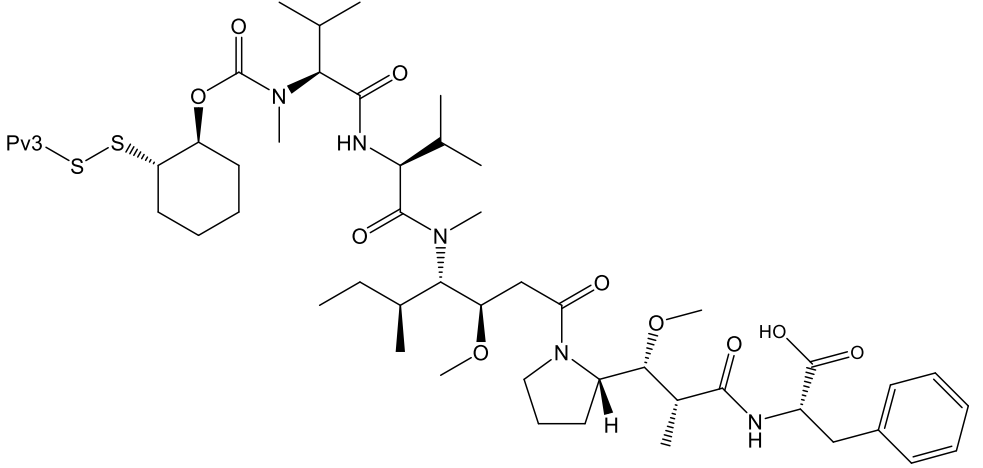
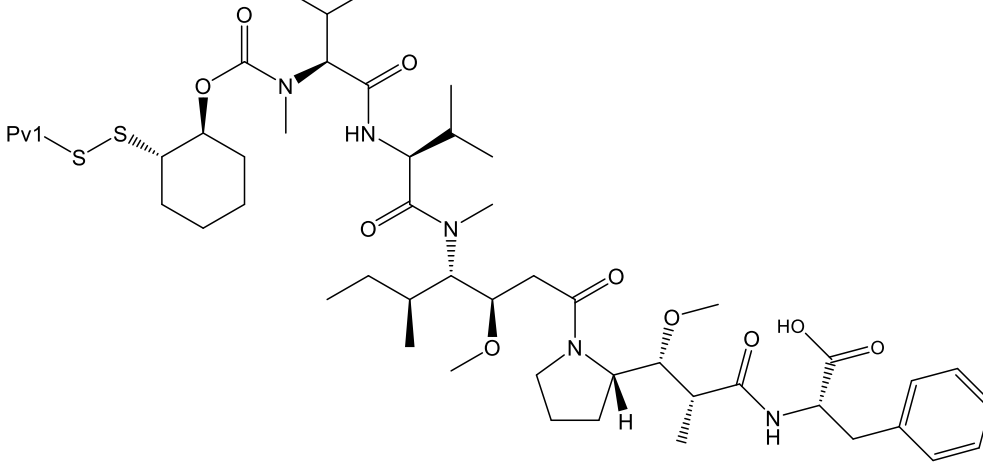
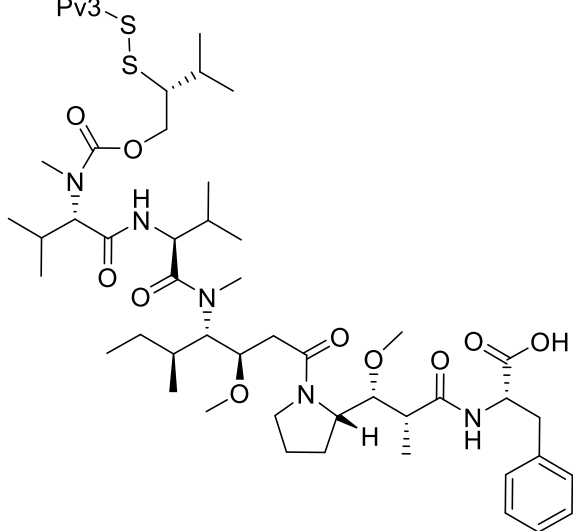
Una solución de ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((R)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato de (1-(piridin-2-ildisulfaneil)ciclobutil)metilo (35 mg, 0,034 mmol) en DMF

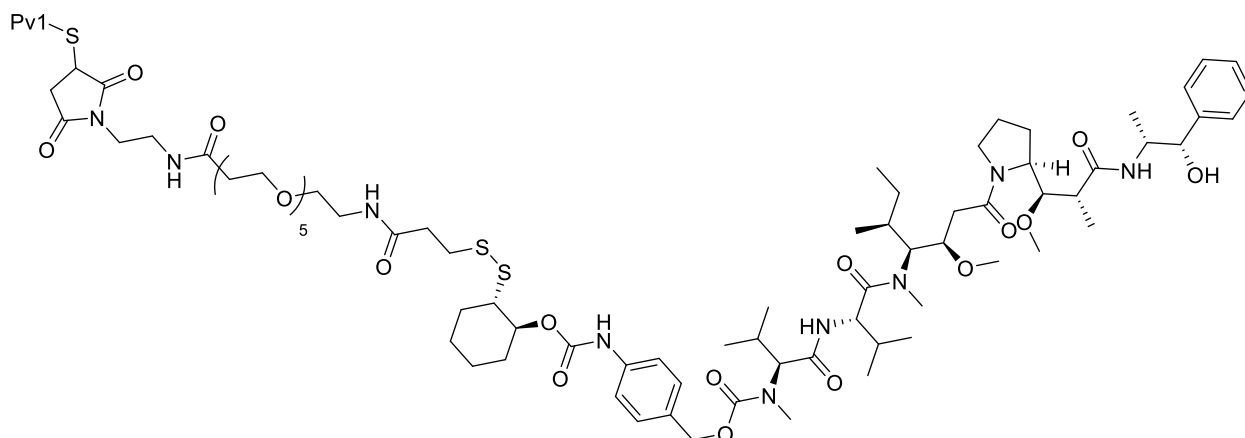
(1 ml) se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron péptido Pv1 (112,9 mg, 0,034 mmol) y trietilamina (9,6 µl, 0,068 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa mediante el uso de TFA al 0,1 % en H₂O y ACN. La fracción preparativa se liofilizó para producir el Compuesto 32 (82 mg, 0,020 mmol, 57,45 % de rendimiento) como un sólido blanco. El producto obtenido es una sal de di-TFA. LCMS: $[M + H]^+$ calculada para C₁₉₇H₂₉₉N₄₁O₅₂S₂, 4137,914; hallada 1378,1 [(M-3)/3]; HPLC: Columna X-Bridge C8(50X4,6)mm,3,5µm, Fase móvil:A:TFA al 0,1 % en agua, Fase móvil:B:TFA al 0,1 % en ACN, Flujo:2,0 mL/min; RT (min): 5,53; Pureza (Máx): 98,659 %

Los siguientes compuestos de la Tabla 3 se prepararon mediante el uso de los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores.

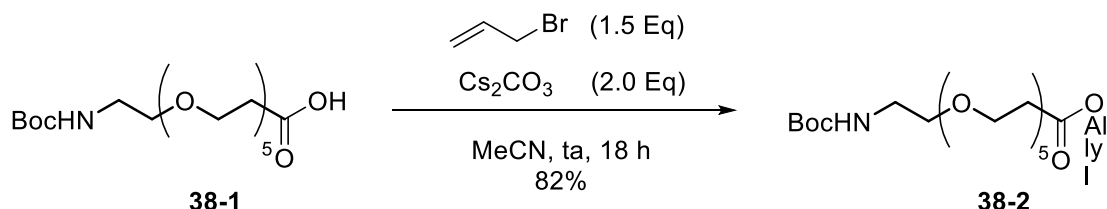
Tabla 3.

Ejemplo	Estructura
33	 Chemical structure of compound 33. It features a complex molecule with a central pyrrolidine ring. The structure includes a carboxylic acid group (COOH) attached to a chiral center, a methoxy group (OMe), and a side chain with a methyl group and a chiral center. The molecule is also linked to a side chain containing a methyl group and a chiral center. The structure is labeled with 'Pv3' and 'S-S' indicating a disulfide bond.
34	 Chemical structure of compound 34. It is very similar to compound 33, but the side chain is labeled with 'Pv2' and 'S-S' indicating a disulfide bond. The structure includes a central pyrrolidine ring, a carboxylic acid group (COOH), a methoxy group (OMe), and a side chain with a methyl group and a chiral center.

35	
36	
37	

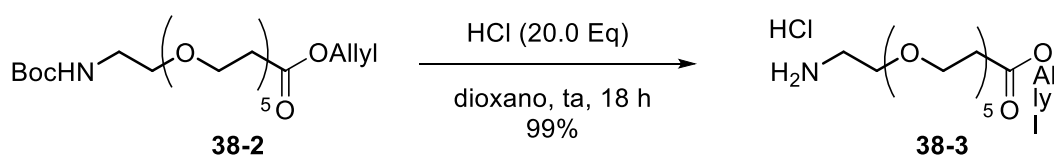
Ejemplo 38: Síntesis del Compuesto 38

Etapas 1: Síntesis de 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11,14,17,20-hexaoxa-5-azatricosan-23-oato de alilo (38-2)



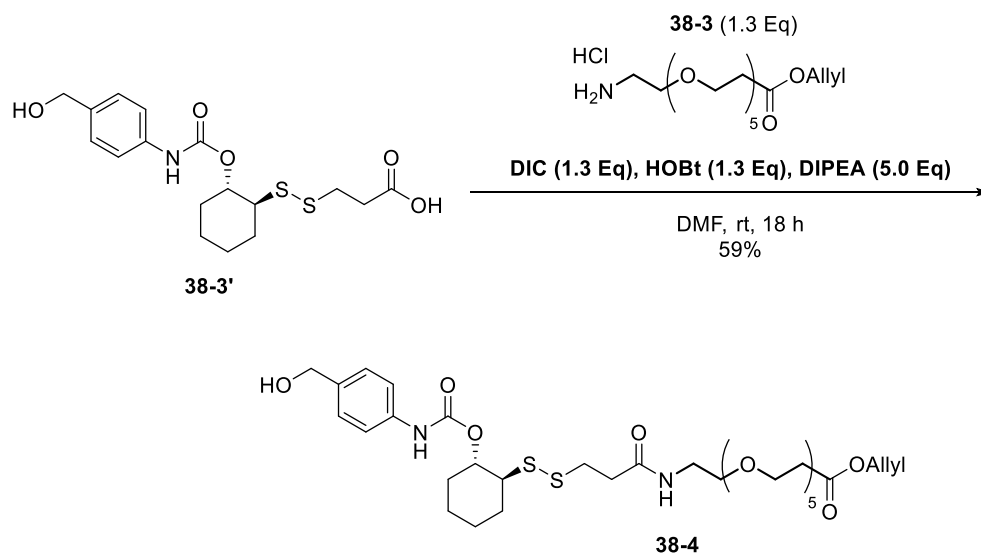
A una solución de **38-1** (2,00 g, 1,0 Eq., 4,88 mmol) en acetonitrilo (50 mL) se le añadieron carbonato de cesio (3,18 g, 2,0 Eq., 9,77 mmol) y bromuro de alilo (630 μ L, 1,50 Eq., 7,33 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El carbonato de cesio restante se separó mediante filtración y el solvente se eliminó al vacío. La purificación por cromatografía ultrarrápida (EtOAc/ciclohexano, 0 % para 2 CV, 0 % a 100 % en 10 CV) proporcionó el compuesto del título (1,80 g, 82 %) como un sólido blanco. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 6,75 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 5,95 - 5,85 (m, 1H), 5,34 - 5,24 (m, 1H), 5,22 - 5,16 (m, 1H), 4,55 (dt, J = 5,3, 1,6 Hz, 2H), 3,64 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,54 - 3,50 (m, 16H), 3,4 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 3,05 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,57 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 1,37 (s, 9H).

Etapas 2: Síntesis de clorhidrato de 1-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadecan-18-oato de alilo (38-3)



A una solución de **38-2** (1,80 g, 1,0 Eq., 4,00 mmol) en dioxano (20 mL) se le añadió HCl 4 N en dioxano (20,0 mL, 20,0 Eq., 80,0 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se concentró al vacío y el residuo se trituró con éter dietílico para proporcionar el compuesto del título (1,55 g, 99 %) como un aceite incoloro. ^1H NMR (400 MHz, MeOD-d_4) δ 5,95 (ddt, $J = 17,2, 10,5, 5,6$ Hz, 1H), 5,37 – 5,27 (m, 1H), 5,24 – 5,20 (m, 1H), 4,61 (dt, $J = 5,6, 1,5$ Hz, 2H), 3,68 – 3,62 (m, 20H), 3,17 – 3,11 (m, 2H), 2,64 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H).

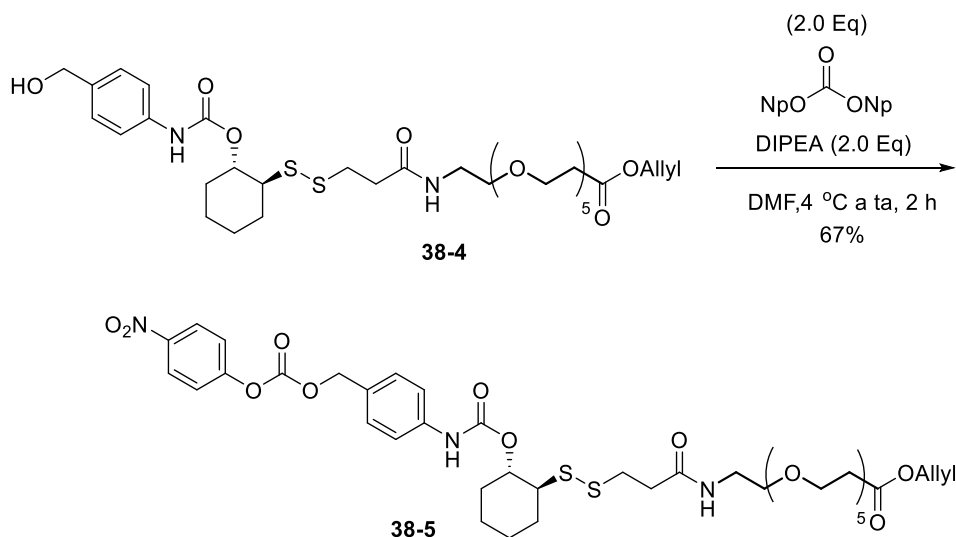
Etapas 3: Síntesis de 1-(((1S,2S)-2-(((4-(hidroximetil)fenil)carbamoil)oxi)ciclohexil)disulfaneil)-3-oxo-7,10,13,16,19-pentaoxa-4-azadocosan-22-oato de alilo (38-4)



A una solución de **38-3'** (500 mg, 1,0 Eq., 1,30 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se le añadió 1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-ol (228 mg, 1,3 Eq., 1,69 mmol), N,N'-diisopropilcarbodiimida (262 μL , 1,3 Eq., 1,69 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (838 mg, 5,0 Eq., 6,49 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min. A continuación, se añadió clorhidrato de 1-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadecan-18-oato de alilo **38-3** (651 mg, 1,3 Eq., 1,69 mmol) en DMF (10 mL) y la solución se continuó agitando a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se purificó mediante cromatografía de fase inversa (metanol/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar el compuesto del título (545 mg, 59 %) como un sólido blanco. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,58 (s, 1H), 7,97 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 7,41 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,24 – 7,16 (m, 2H), 5,90 (ddt, $J = 17,3, 10,6, 5,4$ Hz, 1H), 5,38 – 5,12 (m, 2H), 4,67 – 4,58 (m, 1H), 4,55 (dt, $J = 5,4, 1,5$ Hz, 2H), 4,43 – 4,37 (m, 2H), 3,64 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 3,52 – 3,44 (m, 16H), 3,38 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,21 – 3,13 (m, 2H), 2,92 – 2,81 (m, 3H), 2,59 – 2,53 (m, 2H), 2,44 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,16 – 2,00 (m, 2H),

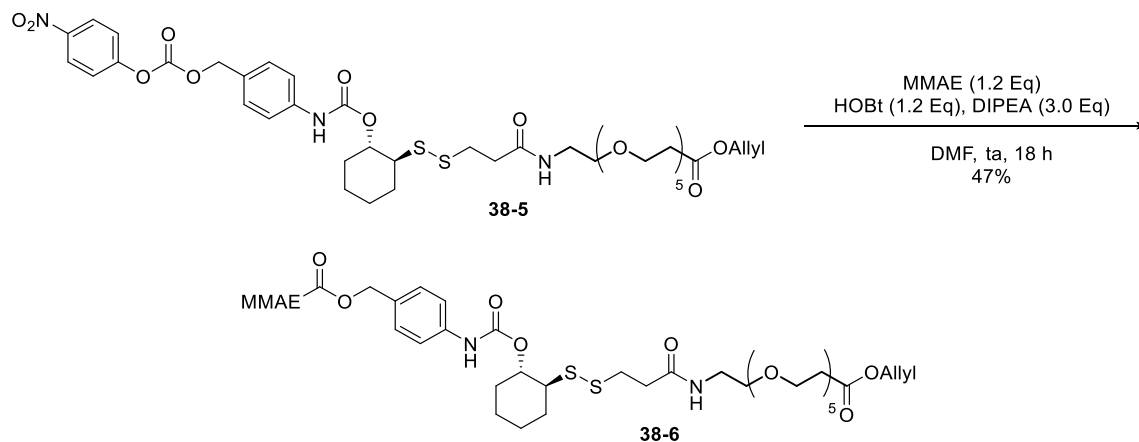
1,77 – 1,26 (m, 6H). LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[C_{33}H_{53}N_2O_{11}S_2]^+$ $[M + H]^+$: 717, hallada: 717.

Etapas 4: Síntesis de 1-(((1S,2S)-2-(((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamoil)oxi)ciclohexil)disulfaneil)-3-oxo-7,10,13,16,19-pentaoxa-4-azadocosan-22-oato de alilo (38-5)



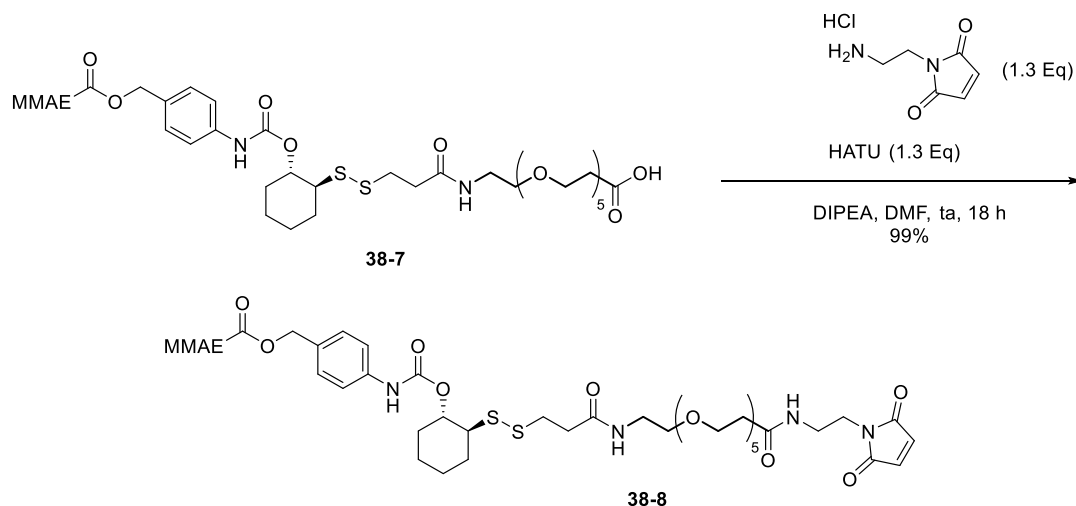
A una solución de **38-4** (540 mg, 1,0 Eq., 753 μ mol) en DMF anhidra (15 mL a 4 °C se le añadió carbonato de bis(4-nitrofenilo) (458 mg, 2,0 Eq., 1,51 mmol) y diisopropiletilamina (388 μ L, 3,0 Eq., 2,26 mmol). Se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. La mezcla se purificó mediante cromatografía de fase inversa (metanol/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar *el compuesto del título* (444 mg, 67 %) como un sólido blanco. ^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8,37 – 8,26 (m, 2H), 7,55 – 7,43 (m, 4H), 7,42 – 7,34 (m, 2H), 5,93 (ddt, J = 17,2, 10,8, 5,5 Hz, 1H), 5,34 – 5,27 (m, 1H), 5,26 – 5,23 (m, 2H), 5,22 – 5,18 (m, 1H), 4,74 – 4,64 (m, 1H), 4,60 – 4,56 (m, 2H), 3,73 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,61 – 3,56 (m, 16H), 3,49 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 2,95 (td, J = 7,2, 1,8 Hz, 2H), 2,88 – 2,79 (m, 1H), 2,61 – 2,55 (m, 4H), 2,23 – 2,12 (m, 2H), 1,82 – 1,38 (m, 6H), 3 protones muy probablemente cubiertos por la señal de metanol. LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[C_{40}H_{56}N_3O_{15}S_2]^+$ $[M + H]^+$: 882, hallada: 882.

Etapa 5: Síntesis del compuesto 38-6



A una solución de **38-5** (400 mg, 1,0 Eq., 454 μmol) en DMF (4 mL) se le añadieron HOBT (93,1 mg, 1,2 Eq., 544 μmol), DIPEA (234 μL , 3,0 Eq., 1,36 mmol), MMAE (391 mg, 1,2 Eq., 544 μmol) y tamices moleculares de 3 Å. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 hora. La mezcla se purificó mediante cromatografía de fase inversa (metanol/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar el compuesto del título (313 mg, 47 %) como un sólido blanco esponjoso. LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[\text{C}_{73}\text{H}_{118}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{S}_2]^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 1461, hallada: 1461.

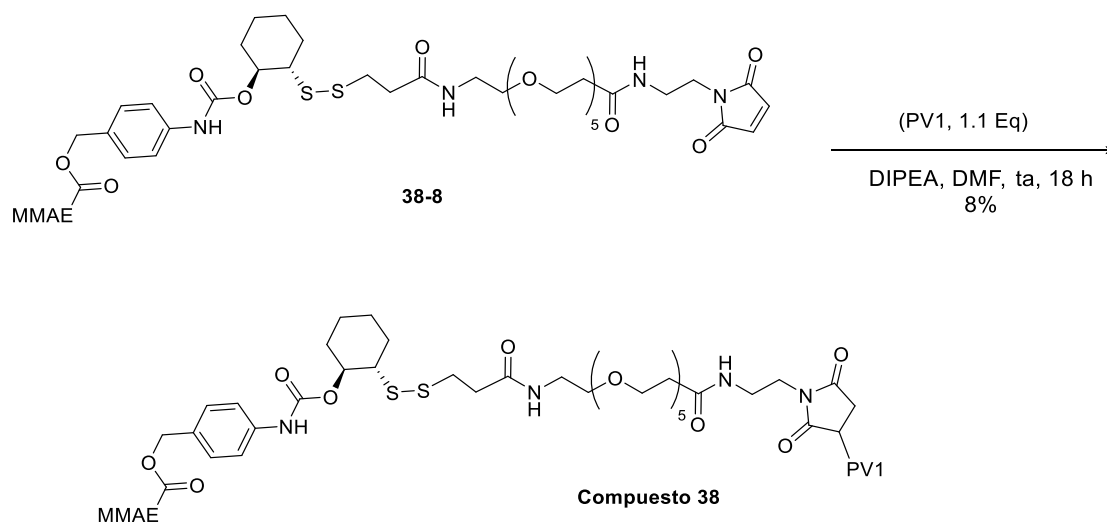
Etapa 7: Síntesis del Compuesto 38-8



A una solución de **38-7** (60 mg, 1,0 Eq., 42 μmol) en DMF (5 mL) se le añadió HATU (21 mg, 1,3 Eq., 55 μmol) y diisopropiletilamina (29 μL , 4,0 Eq., 0,17 mmol). Después de 15 minutos de agitación a temperatura ambiente, se añadió una solución de clorhidrato de 1-(2-aminoetil)-1H-pirrol-2,5-diona (9,7 mg, 1,3 Eq., 55 μmol) en DMF (5 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se purificó mediante cromatografía de

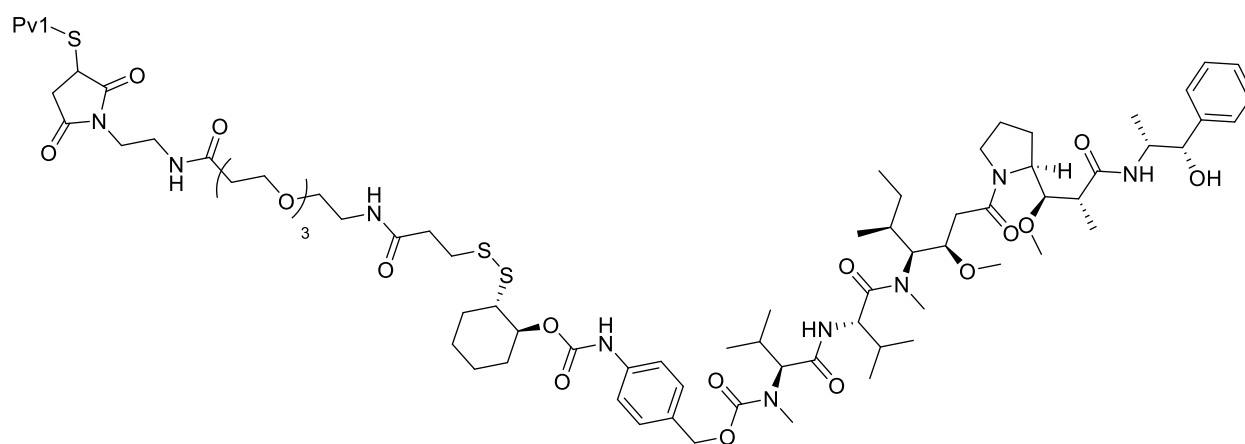
fase inversa (acetonitrilo/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar *el compuesto del título* como un sólido blanco (65 mg, 99 %). LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[C_{76}H_{120}N_9O_{20}S_2]^+$ $[M + H]^+$: 1542,8, hallada:1543,3

Etapas 8: Síntesis del Compuesto 38

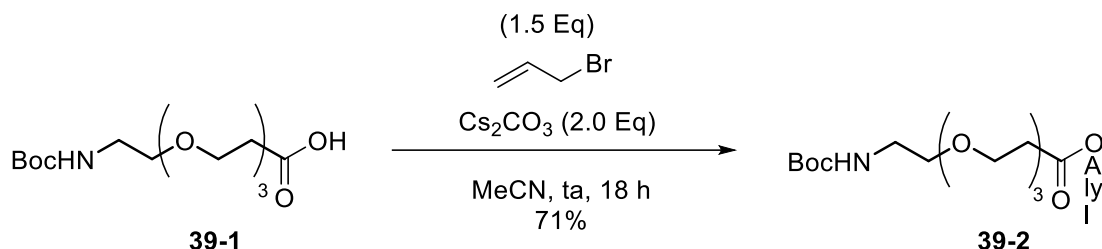


A una solución de **38-8** (65 mg, 1,0 Eq., 42 μ mol) en DMF (3 mL) se le añadió Pv1 (150 mg, 1,1 Eq., 46 μ mol) y diisopropiletilamina (51 μ L, 7,0 Eq., 0,29 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (acetonitrilo/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar el Compuesto 38 como un sólido blanco (16 mg, 8 %). HPLC: 96 % a 220 nm. LC-MS (ESI-) Masa exacta calculada para $[C_{228}H_{341}N_{44}O_{64}S_3]^{3-}$ $[M - 3H]^{3-}$: 1605,8, hallada:1605,9. Masa exacta calculada para $[C_{228}H_{340}N_{44}O_{64}S_3]^{4-}$ $[M - 4H]^{4-}$: 1204,1, hallada:1204,1

Ejemplo 39: Síntesis del Compuesto 39

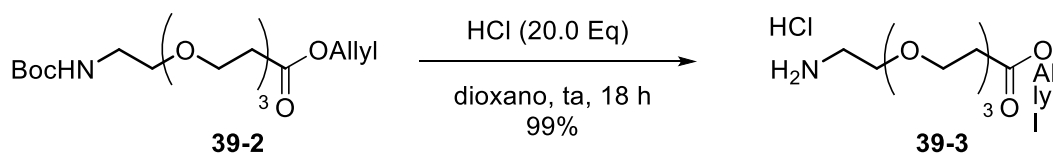


Etapas 1: Síntesis de 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azaheptadecan-17-oato de alilo (39-2)



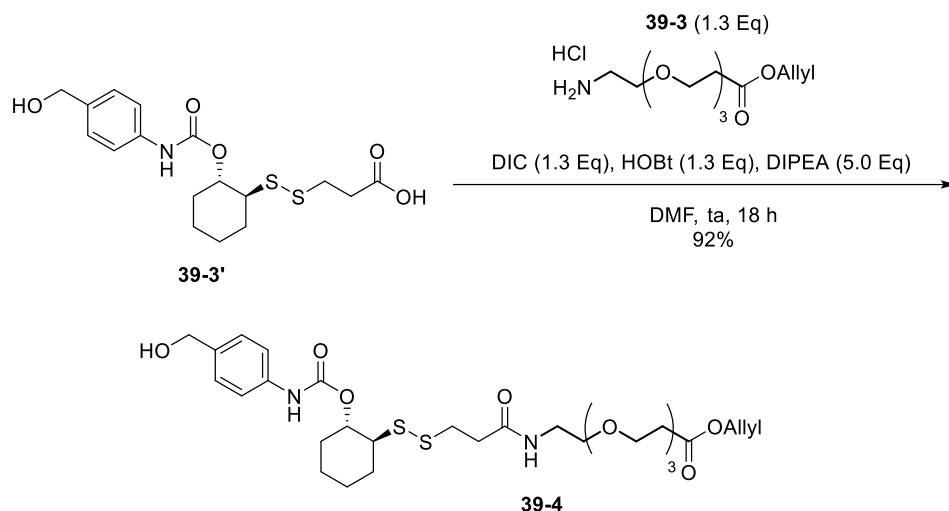
A una solución de **39-1** (2,00 g, 1,0 Eq., 6,23 mmol) en acetonitrilo (50 mL) se le añadieron carbonato de cesio (4,06 g, 2,0 Eq., 12,5 mmol) y bromuro de alilo (803 μ L, 1,5 Eq., 9,35 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El carbonato de cesio restante se separó mediante filtración y el solvente se eliminó al vacío. La purificación por cromatografía ultrarrápida (EtOAc/ciclohexano, 0 % para 2 CV, 0 % a 100 % en 10 CV) proporcionó *el compuesto del título* (1,60 g, 71 %) como un polvo blanco. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5,91 (ddt, J = 17,2, 10,4, 5,7 Hz, 1H), 5,37 – 5,18 (m, 2H), 5,11 – 4,73 (br s, 1H), 4,59 (dt, J = 5,7, 1,4 Hz, 2H), 3,77 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 3,68 – 3,58 (m, 8H), 3,53 (dd, J = 5,5, 4,7 Hz, 2H), 3,30 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 2,63 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 1,43 (s, 9H).

Etapas 2: Síntesis de clorhidrato de 3-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)propanoato de alilo (39-3)



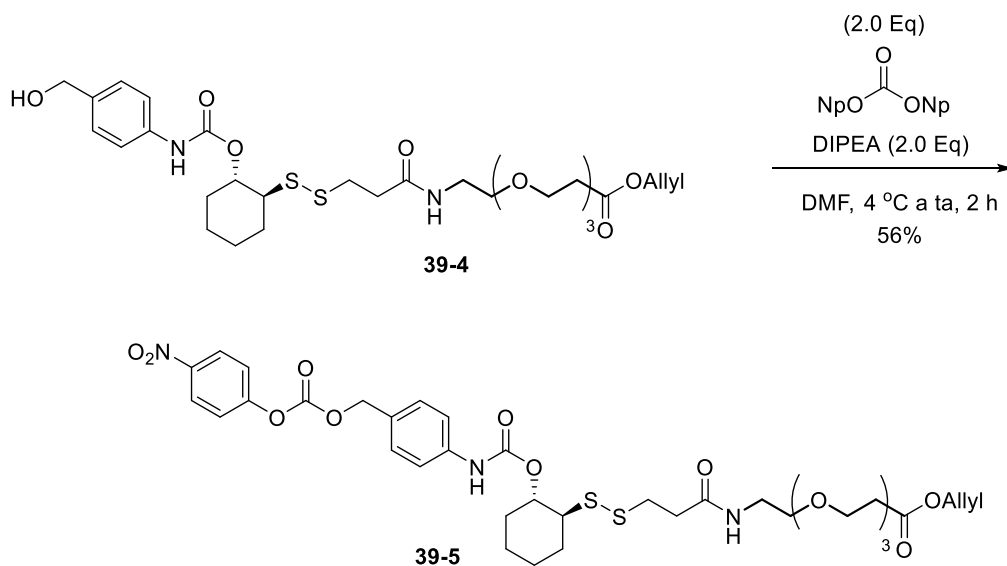
A una solución de **39-2** (1,60 g, 1,00 Eq., 4,23 mmol) en dioxano (20 mL) se le añadió HCl 4 N en dioxano (22,1 mL, 20,0 Eq., 88,5 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se concentró al vacío y el residuo se trituró con éter dietílico para proporcionar *el compuesto del título* (1,32 g, 99 %) como un aceite incoloro. ^1H NMR (400 MHz, MeOD-d_4) 5,99 - 5,89 (m, 1H), 5,32 (dq, J = 17,2, 1,6 Hz, 1H), 5,22 (dq, J = 10,5, 1,4 Hz, 1H), 4,60 (dt, J = 5,6, 1,5 Hz, 2H), 3,78 - 3,74 (m, 2H), 3,72 - 3,69 (m, 2H), 3,67 - 3,65 (m, 6H), 3,64 - 3,62 (m, 4H), 3,14 - 3,11 (m, 2H), 2,63 (t, J = 6,0 Hz, 2H).

Etapas 3: Síntesis de 1-(((1S,2S)-2-(((4-(hidroximetil)fenil)carbamoil)oxi)ciclohexil)disulfaneil)-3-oxo-7,10,13-trioxa-4-azahexadecan-16-oato de alilo (39-4)



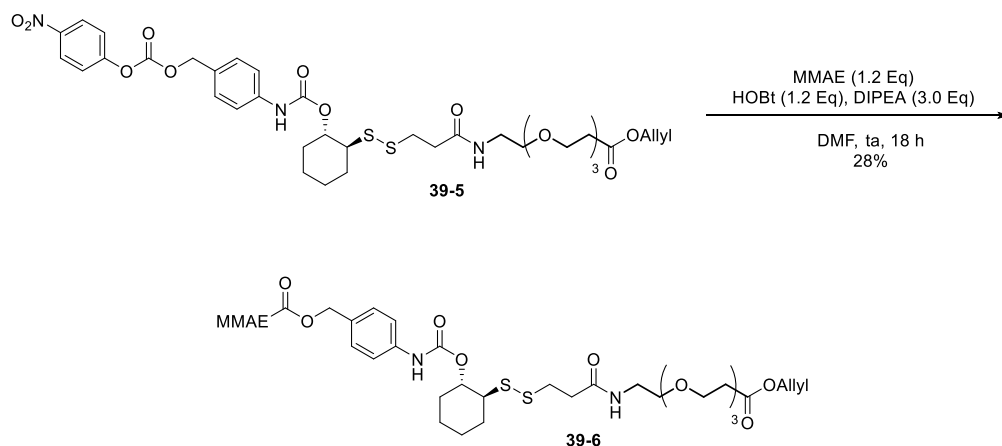
A una solución de **39-3'** (500 mg, 1,0 Eq., 1,30 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se le añadió 1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-ol (228 mg, 1,3 Eq., 1,69 mmol), N,N'-diisopropilcarbodiimida (262 μ L, 1,3 Eq., 1,69 mmol) y diisopropiletilamina (838 mg, 5,0 Eq, 6,49 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min. A continuación, se añadió clorhidrato de 3-(2-(2-(2-aminoetoxy)etoxy)etoxy)propanoato de alilo (502 mg, 1,3 Eq, 1,69 mmol) en DMF (10 mL) y la solución continuó agitando a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se purificó mediante cromatografía de fase inversa (metanol/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar *el compuesto del título* (747 mg, 92 %) como un sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,97 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,41 (m, 2H), 7,21 – 7,19 (m, 2H), 5,90 (ddt, *J* = 17,2, 10,6, 5,3 Hz, 1H), 5,34 – 5,17 (m, 2H), 5,07 – 5,02 (m, 1H), 4,65 – 4,57 (m, 1H), 4,55 (dt, *J* = 5,3, 1,6 Hz, 2H), 4,43 – 4,48 (m, 2H), 3,63 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 3,53 – 3,43 (m, 8H), 3,38 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,22 – 3,13 (m, 3H), 2,92 – 2,83 (m, 3H), 2,57 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,44 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,17 – 1,99 (m, 2H), 1,77 – 1,28 (m, 6H). LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para [C₂₉H₄₅N₂O₉S₂]⁺ [M + H]⁺: 629, hallada: 629.

Etapas 4: Síntesis de 1-(((1S,2S)-2-(((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamoil)oxi)ciclohexil)disulfaneil)-3-oxo-7,10,13-trioxa-4-azahexadecan-16-oato de alilo (5)



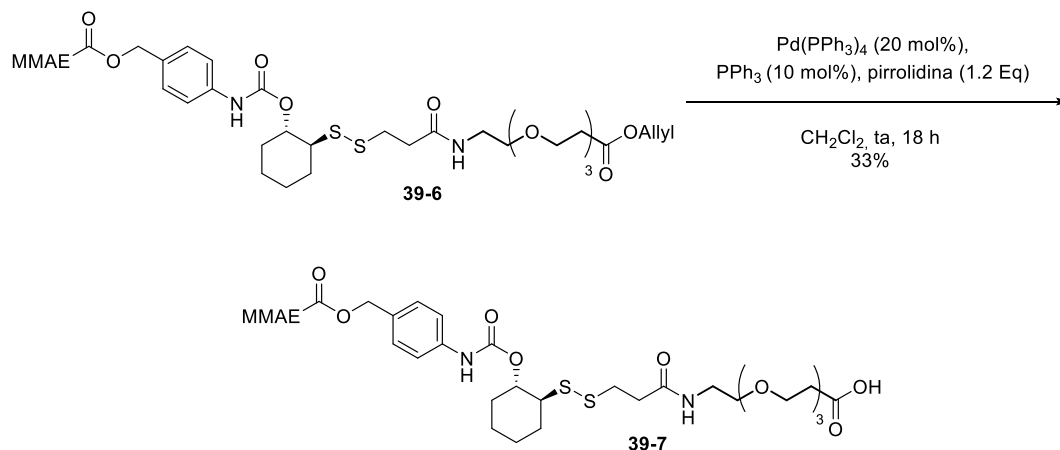
A una solución de **39-4** (740 mg, 1,0 Eq., 1,18 mmol) en DMF anhidra (15 mL a 4 °C se le añadió carbonato de bis(4-nitrofenilo) (716 mg, 2,0 Eq., 2,35 mmol) y diisopropiletilamina (607 μ L, 3,0 Eq., 3,53 mmol). Se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. La mezcla se purificó mediante cromatografía de fase inversa (metanol/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar *el compuesto del título* (520 mg, 56 %) como un sólido blanco. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,35 – 8,27 (m, 2H), 7,97 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 7,60 – 7,54 (m, 2H), 7,53 – 7,48 (m, 2H), 7,40 - 7,36 (m, 2H), 5,89 (ddt, J = 17,3, 10,6, 5,3 Hz, 1H), 5,32 - 5,25 (m, 1H), 5,24 – 5,21 (m, 2H), 5,21 – 5,17 (m, 1H), 4,69 – 4,59 (m, 1H), 4,55 (dt, J = 5,3, 1,6 Hz, 2H), 3,63 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,51 – 3,43 (m, 8H), 3,37 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 3,22 – 3,12 (m, 3H), 2,88 (t, J = 6,9 Hz, 3H), 2,56 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 2,44 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,17 – 2,02 (m, 2H), 1,75 – 1,31 (m, 6H). LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{S}_2]^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 794, hallada: 794.

Etapas 5: Síntesis de 39-6



A una solución de **39-5** (420 mg, 1,0 Eq., 529 μmol) en DMF (4 mL) se le añadieron HOBt (109 mg, 1,2 Eq., 635 μmol), diisopropiletilamina (273 μL , 3,0 Eq., 1,59 mmol), MMAE (456 mg, 1,2 Eq., 635 μmol) y tamices moleculares de 3 Å. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 hora. La mezcla se purificó mediante cromatografía de fase inversa (metanol/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar *el compuesto del título* (313 mg, 28 %) como un sólido blanco esponjoso. LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[\text{C}_{69}\text{H}_{110}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{S}_2]^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 1372,7, hallada:1372,9.

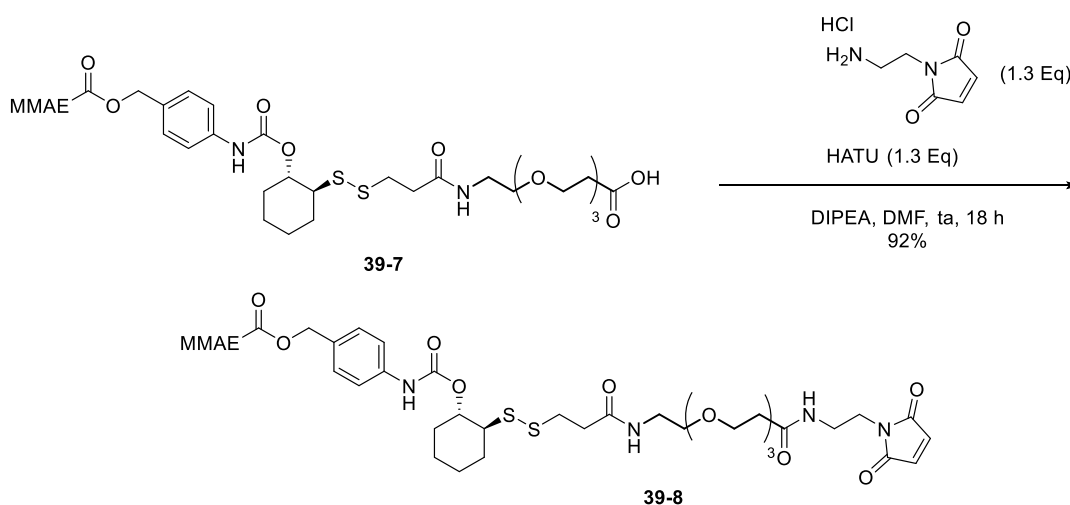
Etapa 6: Síntesis de 39-7



A una solución de **39-6** (200 mg, 1,0 Eq., 146 μmol) en CH_2Cl_2 seco (2 mL) se le añadió trifenilfosfina (3,8 mg, 10 % molar, 15 μmol). La solución se purgó con nitrógeno durante 2 minutos y luego se añadieron $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (33,7 mg, 20 % molar, 29,1 μmol) y pirrolidina (14 μL , 1,2 Eq, 175 μmol). Se dejó la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 18 h. La reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa

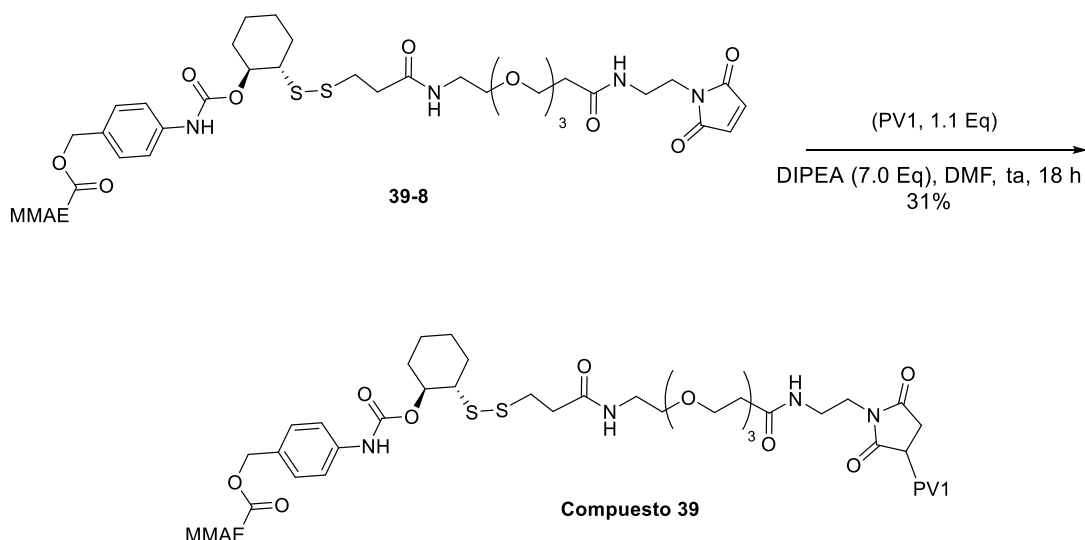
(metanol/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar *el compuesto del título* (64 mg, 33 %) como un sólido amarillo esponjoso. El espectro de ^1H NMR es demasiado complejo para su interpretación. LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[\text{C}_{66}\text{H}_{106}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{S}_2]^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 1332,7, hallada:1332,5.

Etapas 7: Síntesis de 39-8



A una solución de **39-7** (60 mg, 1,0 Eq., 45 μmol) en DMF (4 mL) se le añadió HATU (22 mg, 1,3 Eq., 59 μmol) y diisopropiletilamina (31 μL , 4,0 Eq., 0,18 mmol). Después de 15 minutos de agitación a temperatura ambiente, se añadió una solución de clorhidrato de 1-(2-aminoetil)-1H-pirrol-2,5-diona (10 mg, 1,3 Eq., 59 μmol) en DMF (4 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se purificó mediante cromatografía de fase inversa (acetonitrilo/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar *el compuesto del título* como un sólido blanco (60 mg, 92 %). LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[\text{C}_{72}\text{H}_{112}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{S}_2]^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 1454,7, hallada: 1454,8.

Etapas 8: Síntesis del Compuesto 39



A una solución de 39-8 (60 mg, 1,0 Eq., 41 μmol) en DMF (3 mL) se le añadió Pv1 (150 mg, 1,1 Eq., 45 μmol) y diisopropiletilamina (50 μL , 7,0 Eq., 0,29 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (acetonitrilo/agua (ácido fórmico al 0,1 %), 5 % para 2 CV, 5 % a 95 % en 12 CV, 95 % para 2 CV) para proporcionar el *compuesto del título* como un sólido blanco (60 mg, 31 %). HPLC: 99 % a 220 nm. LC-MS (ESI+) Masa exacta calculada para $[\text{C}_{224}\text{H}_{333}\text{N}_{44}\text{O}_{62}\text{S}_3]^{3-}$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 1576,5, hallada: 1576,2. Masa exacta calculada para $[\text{C}_{224}\text{H}_{332}\text{N}_{44}\text{O}_{62}\text{S}_3]^{4-}$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 1182,1, hallada: 1182,8

Ejemplo A: Ensayo de retraso del crecimiento in vitro en células cancerosas

Las células (células colorrectales HCT116, células de próstata PC3, células de NSCLC NCI-H1975 y células de NSCLC NCI-H292) se sembraron en placas de 3000 células por pocillo en placas de 96 pocillos con fondo transparente y paredes negras (Griener) en medio de cultivo que contenía FBS al 10 %. Las células se dejaron adherir a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de regresar a un incubador a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de 24 horas, el medio se removió y se reemplazó con medio de cultivo reciente que contenía diversas concentraciones de fármaco. Cada concentración de fármaco se añadió por triplicado. Los controles no tratados con fármaco contenían solo medio de crecimiento. Las células se regresaron al incubador. Noventa y seis horas después de la adición del fármaco, las células se fijaron con 4 % paraformaldehído durante 20 minutos y se tiñeron con Hoechst a 1 $\mu\text{g/mL}$. Se tomaron imágenes de las placas en un generador de imágenes automático Cytation 5 (BioTek) y las células se contaron mediante el uso de CellProfiler (<http://cellprofiler.org>). El porcentaje de retraso de crecimiento celular se calculó y los datos se graficaron mediante el uso de GraphPad Prism.

La FIG. 1A muestra un gráfico del retraso del crecimiento de células colorrectales HCT116 *in vitro* después de cuatro días de incubación con las concentraciones indicadas de Compuesto 2 o MMAE no conjugada.

La FIG. 1B muestra un gráfico del retraso del crecimiento de células de próstata PC3 *in vitro* después de cuatro días de incubación con las concentraciones indicadas de Compuesto 2 o MMAE no conjugada.

La FIG. 1C muestra una gráfica del retraso del crecimiento de células de NSCLC NCI-H1975 *in vitro* después de cuatro días de incubación con las concentraciones indicadas de Compuesto 2 o MMAE no conjugada.

La FIG. 1D muestra una gráfica del retraso del crecimiento de células de NSCLC NCI-H292 *in vitro* después de cuatro días de incubación con las concentraciones indicadas de Compuesto 2 o MMAE no conjugada.

La siguiente tabla muestra la inhibición del crecimiento (IC_{50}) de 4 días de las células colorrectales HCT116 después del tratamiento con el compuesto ilustrativo indicado.

N.º de ejemplo	IC_{50} (nM)
1	2,0
2	1,9
3	2,8
4	3,0
5	10,4
6	7,8
7	12,1
8	ND
9	ND
10	1,1
11	6,3
12	1,4
13	1,6
14	ND
15	ND
16	1,7
17	4,3

18	5,6
19	4,2
20	0,7
21	ND
22	ND
23	ND
24	ND
25	165
26	155
27	158
28	297
29	322
30	750
31	733
32	ND
33	291
34	285
35	2825
36	1107
37	291
38	ND
39	ND

ND = no determinado.

Ejemplo B: Ensayo funcional de detención del ciclo celular in vitro en células cancerosas

Incubación de células con MMAE y Compuesto 2 y tinción con yoduro de propidio

Se sembraron células HCT116 en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos a razón de 500.000 células por pocillo en 2 mL de DMEM y se incubaron durante la noche en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se añadieron 200 µL de diluciones de MMAE y Compuesto 2 que se prepararon a concentraciones de 10X en DMEM + DMSO al 4 % a los pocillos apropiados de las placas de 6 pocillos y las placas se incubaron durante 24 horas. Después de la exposición de las células HCT116 a MMAE o al Compuesto 2, las células se recogieron para tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. Se recogieron medios de cada pocillo y se transfirieron

a tubos de centrifuga cónicos de 15 mL para recoger las células no adherentes. Se añadió PBS (1 mL) a los pocillos de lavado y luego se transfirió a los tubos de 15 mL. Se añadió Tryp-LE (1 mL) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 5 minutos en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 % hasta que las células se despegaron de la superficie del pocillo. A cada pocillo se añadió una solución de DMEM + suero bovino fetal al 10 % (1 mL). Se trituraron los pocillos y las células se transfirieron a tubos. Se añadió a los pocillos una solución de DMEM + suero bovino fetal al 10 % (1 mL) para asegurar la recolección de células. Estas se transfirieron nuevamente a los tubos de 15 mL. Los recuentos celulares y la viabilidad de cada muestra se evaluaron mediante exclusión con azul de tripano en un contador de células Bio-Rad TC20. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS a 1×10^6 células/mL para la tinción con yoduro de propidio.

Análisis de células teñidas con yoduro de propidio mediante citometría de flujo

Condiciones de tinción celular

Yoduro de propidio	Concentración final – 300 µg/mL
RNasa	Concentración final - 50µg/mL

Se transfirió una alícuota (1 mL) de cada suspensión celular a una placa de polipropileno de pocillo profundo. La placa se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 330 µL de PBS frío. Se añadió lentamente un volumen de 670 µL de etanol frío a los lados de cada pocillo. Las células se trituraron suavemente para lograr un etanol uniforme al 67 % para la fijación celular en hielo durante 3 horas antes de la tinción. Después de la fijación, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm y se decantó el etanol:PBS. Las células se resuspendieron en 200 µL de una solución de RNasa a 300 µg/mL y yoduro de propidio a 50 µg/mL en PBS. La placa se selló y se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 37 °C o durante la noche a temperatura ambiente, después de lo cual las células se resuspendieron y se transfirieron a una placa de polipropileno de pequeño volumen para citometría de flujo. Las células teñidas con yoduro de propidio se analizaron mediante el uso de un citómetro de flujo BD Acuri. Para cada muestra se crearon tres lotes:

La FIG. 2A muestra un análisis del ciclo celular de células colorrectales HCT116 *in vitro* después de 24 h de incubación con las dosis indicadas de MMAE no conjugada.

La FIG. 2B muestra un análisis del ciclo celular de células colorrectales HCT116 *in vitro* después de 24 h de incubación con las dosis indicadas de Compuesto 2.

Las células muestran acumulación sensible a la dosis en G2/M, con una IC₅₀ de 2,6 nM para MMAE y una IC₅₀ de 19,6 nM para el Compuesto 2.

Ejemplo C: Farmacocinética en plasma del Compuesto 2 en un modelo de rata

Dosificación de Animales

Ratas hembra Sprague Dawley se sometieron a la canulación de la vena yugular y a la inserción de un botón de acceso vascular (VAB, Instech Labs n.º Cat. VABR1B/22) en Envigo Labs antes del envío. Se usaron tapas magnéticas de aluminio (Instech Labs n.º Cat. n.º Cat. VABRC) para proteger el orificio de acceso para los catéteres yugulares, lo que permitió que los animales se alojaran 2 por jaula en un lecho de mazorcas de maíz durante 4-5 días antes del estudio. A las ratas se les administró una dosis intravenosa única de 10 mg/kg de Compuesto 2 preparado en un vehículo de 5 % manitol en amortiguador de citrato. A los 2 minutos, 30 minutos, 1, 2 horas, 4 horas, 7 horas y 24 horas después de la administración del compuesto, se recogió sangre (250 µL) en microtainers llenos de K2EDTA de ratas alimentadas. El plasma se aisló por centrifugación y se transfirieron alícuotas de 100 µL a las placas de polipropileno de 96 pocillos en hielo seco. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento para su cuantificación mediante LC-MS/MS.

Determinación mediante LC-MS/MS de la concentración de conjugado en plasma

Se añadió un volumen de 20 µL de cada muestra (blancos dobles (D-BLK), blancos (BLK), patrones (STD), controles de calidad (QC) o muestra de matriz) a una placa de precipitación de proteínas de 96 pocillos de 1 mL limpia que contenía 20 µL de ácido fosfórico al 4 % en agua. Las muestras fortificadas se agitaron a 700 rpm durante 2 minutos y posteriormente se centrifugaron durante 1 minuto a 1500 rpm para consolidar todo el líquido en el fondo de la placa. Se añadió un volumen de 20 µL de patrón interno de trabajo (WIS) a cada muestra de matriz seguido de 180 µL de acetonitrilo:metanol:ácido fórmico (500:500:1, v:v:v). Las muestras se agitaron a 700 rpm durante 2 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 ° C. Se transfirió un volumen de 50 µL de sobrenadante a una placa de recolección de polipropileno de 96 pocillos LoBind limpia de 0,700 mL, seguido de la adición de 100 µL de agua:acetonitrilo:ácido fórmico (900:100:1, v:v:v). Las muestras finales se agitaron a 700 rpm durante 2 minutos y se inyectaron 5 µL en el sistema LC-MS/MS para su análisis.

Determinación mediante LC-MS/MS de la concentración de MMAE en plasma

Se añadió un volumen de 25 µL de cada muestra de matriz a los pocillos de una placa de polipropileno de 96 pocillos, seguido de 150 µL de amortiguador de formiato de amonio (pH 6,9) y 25 µL de patrón interno de trabajo (WIS). Para los controles en blanco doble, el WIS se sustituyó por 25 µL de agua:acetonitrilo:ácido fórmico (500:500:1, v:v:v). Las muestras fortificadas se centrifugaron a 700 rpm durante 2 minutos. Trabajando en un colector de presión negativa, se añadió un volumen de 200 µL de muestra de matriz fortificada a una placa de extracción líquida soportada y se permitió que las muestras se filtraran a través de la frit de la placa bajo una presión negativa de 650-700 torr durante hasta 1 minuto. Se dejó que las muestras se absorbieran completamente en la placa durante 5 minutos. Antes de la elución, se colocó una placa TrueTaper de 96 pocillos de 2 mL dentro del colector de vacío para usarla como placa de recolección. Se añadió un volumen de 1000 µL de MTBE a la placa de muestra original y se dejó que el solvente fluyera por gravedad durante 5 minutos. Se aplicó una presión negativa de ~650 torr durante 10-30 secciones o hasta que la muestra se hubiera evacuado por completo de los pocillos. Las eluciones recogidas se evaporaron bajo una corriente calentada de nitrógeno a 40 °C. Las muestras se reconstituyeron en 100 µL de acetonitrilo:agua:formiato de amonio 200 mM (90:5:5, v:v:v) y se cubrieron con una tapa de silicona. Las muestras finales se centrifugaron a 900 rpm durante 2 minutos y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El análisis se realizó inyectando una muestra de 10 µL en un sistema de LC-MS/MS.

La FIG. 3 muestra un diagrama de la concentración en plasma del Compuesto 2 y MMAE liberada después de una dosis IV única de 10 mg/kg del Compuesto 2 en la rata (los datos se expresan como media $\pm$ SD). Como se muestra en la FIG. 3, 0,02 % de la ojiva MMAE se liberó después de 24 horas en circulación. La FIG. 3 demuestra que el Compuesto 2 es estable en plasma durante al menos 24 h.

Ejemplo D: Farmacocinética en tejido del Compuesto 2 en un modelo de ratón

Dosificación de Animales

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables (Innovive). Las células de cáncer HCT116 humanas derivadas de carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 µL. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 300 mm³, a los ratones se les administró una única inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de MMAE o 3 mg/kg del Compuesto 2 preparado en un vehículo de manitol al 5 % en citrato. Se recogieron muestras

de tumor, músculo cuádriceps y médula ósea de ratones anestesiados y alimentados a las 4, 24 y 48 horas después de la administración del compuesto. Las concentraciones de MMAE en tejidos se determinaron mediante LCMS.

Determinación mediante LC-MS/MS de la concentración de MMAE en tejido y plasma

MMAE en plasma

Se añadió un volumen de 75 µL de acetonitrilo:ácido fórmico (1000:1, v:v) que contenía un patrón interno (MMAE-D8) a los pocillos de una placa de precipitación de proteínas de 96 pocillos colocada sobre una placa de polipropileno LoBind de 96 pocillos de 0,700 mL. Los pocillos de muestra en blanco doble y remanente recibieron 75 µL de acetonitrilo:ácido fórmico (1000:1, v:v) sin patrón interno. Se añadió un volumen de 25 µL de cada muestra de matriz a los pocillos de la placa que contenían el patrón interno. Las muestras fortificadas se centrifugaron a 700 rpm durante 1 minuto y se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos a 4 °C. Se descartó la placa de precipitación de proteínas. Se añadió un volumen de 50 µL de fase móvil A (acetonitrilo:agua:formiato de amonio 200 mM (90:5:5, v:v:v)) a la placa de recolección de polipropileno de 96 pocillos que se cubrió con una estera de silicona. Las muestras finales se centrifugaron a 700 rpm durante 2 minutos y el análisis se realizó inyectando una muestra de 2 µL en un sistema de LC-MS/MS.

MMAE tumoral y muscular

Las muestras de tejido descongeladas mantenidas en hielo húmedo se ajustaron a 100 mg/mL con PBS basándose en el peso del tejido. Las muestras se homogeneizaron en una máquina Precellys Evolution a 7200 rpm durante 2 ciclos de 30 segundos con una pausa de 10 segundos entre cada ciclo. Los homogeneizados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios Eppendorf LoBind de 2 mL. Se añadió un volumen de 100 µL de homogeneizado a una placa limpia de polipropileno de 96 pocillos de 2 mL, seguido de 75 µL de amortiguador de formiato de amonio, pH 6,9 y 25 µL de patrón interno de trabajo (WIS). Los controles en blanco doble recibieron 75 µL de agua:acetonitrilo:ácido fórmico (1:1:0,001, v:v:v) sin patrón interno. Las muestras fortificadas se cubrieron con una esterilla de silicona y se centrifugaron a 700 rpm durante 2 minutos. Trabajando en un colector de presión negativa, se añadieron 200 µL de muestras de matriz fortificada a una placa de extracción líquida soportada y se permitió que las muestras se filtraran a través de la fritada de la placa con una presión negativa de ~650-700 torr durante hasta 1 minuto. Se dejó que las muestras se absorbieran completamente en la placa SLE durante 5 minutos. Antes de la elución de la muestra, se colocó una placa de recolección

TrueTaper de 96 pocillos de 2 mL dentro del colector de vacío como recipiente de recolección. Las muestras se evaporaron bajo una corriente calentada de nitrógeno a 40 ° C y se reconstituyeron en 150 µL de acetonitrilo:agua:formiato de amonio 200 mM (90:5:5, v:v:v). La placa de recolección se cubrió con una esterilla de silicona y se centrifugó a 900 rpm durante 2 minutos. Las muestras finales se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y el análisis se realizó inyectando una muestra de 2 µL en un sistema de LC-MS/MS.

MMAE en médula ósea

Los gránulos de muestra de médula ósea descongelados mantenidos en hielo húmedo se ajustaron a una concentración final de $1,0 \times 10^7$ con amortiguador RIPA enfriado con hielo. Las muestras se homogeneizaron en una máquina Precellys Evolution a 7200 rpm durante 2 ciclos de 30 segundos con una pausa de 10 segundos entre cada ciclo. Los homogeneizados celulares de médula ósea se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios Eppendorf LoBind de 2 mL. Se añadió un volumen de 200 µL de homogeneizado celular de médula ósea a los pocillos de una placa limpia de polipropileno de 96 pocillos de 2 mL, seguido de 175 µL de amortiguador de formiato de amonio, pH 6,9 y 25 µL de patrón interno de trabajo (WIS). Los controles en blanco doble recibieron 175 µL de agua:acetonitrilo (1:1, v:v) sin patrón interno. Las muestras fortificadas se cubrieron con una esterilla de silicona y se centrifugaron a 700 rpm durante 2 minutos. Trabajando en un colector de presión negativa, se añadieron 400 µL de muestras de matriz fortificada a una placa de extracción líquida soportada y se permitió que las muestras se filtraran a través de la frita de la placa con una presión negativa de ~650-700 torr durante hasta 1 minuto. Se dejó que las muestras se absorbieran completamente en la placa SLE durante 5 minutos. Antes de la elución de la muestra, se colocó una placa de recolección TrueTaper de 96 pocillos de 2 mL dentro del colector de vacío como recipiente de recolección. La elución se logró aplicando 900 µL de MTBE:acetato de etilo (1:1, v:v) al sistema y permitiendo que el solvente fluyera por gravedad durante 5 minutos. Se aplicó una presión negativa de ~650 torr durante 10-30 segundos o hasta que los pocillos estuvieran completamente evacuados. El proceso de elución se repitió. Las muestras se evaporaron bajo una corriente calentada de nitrógeno a 40 ° C y se reconstituyeron en 25 µL de agua:acetonitrilo:ácido fórmico (900:100:1, v:v:v). La placa de recolección se cubrió con una esterilla de silicona y se centrifugó a 900 rpm durante 2 minutos. Las muestras finales se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y el análisis se realizó inyectando 2 µL en un sistema de LC-MS/MS.

La FIG. 4A muestra una gráfica de los niveles de MMAE no conjugada en tumores de ratón determinados por LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de MMAE o 3 mg/kg del Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116.

La FIG. 4B muestra una gráfica de los niveles de MMAE no conjugada en el músculo de ratón determinados por LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de MMAE o 3 mg/kg del Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116.

La FIG. 4C muestra una gráfica de los niveles de MMAE no conjugada en la médula ósea de ratón determinados por LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de MMAE o 3 mg/kg del Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116.

La dosificación de la ojiva de MMAE no conjugada da como resultado una distribución indiscriminada de MMAE en todos los tejidos. Por el contrario, la dosificación del Compuesto 2 da como resultado la administración tumoral selectiva de la ojiva de MMAE, con administración eficaz de MMAE al tumor, pero no a los tejidos sanos.

Ejemplo E: Eficacia del Compuesto 1 en un modelo de xenoinjerto colorrectal HCT116

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables. Las células HCT116 humanas derivadas de carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 μ L. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo, 0,25 mg/kg de MMAE o 40 mg/kg del Compuesto 1 (equivalente a 7 mg/kg de MMAE no conjugada). Las dosis se prepararon diluyendo 0,1 mg/ μ L de soluciones madre de DMSO en 5 % manitol en amortiguador de citrato y se administraron en dos dosis a un volumen de 12 mL/kg (300 μ L por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibre y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: $\text{Volumen} = \pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, el tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o pérdida de >20 % del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de varios grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (manitol al 5 % en amortiguador de citrato)	N/A	QDx2	i.p.	8
2	MMAE	0,25 mg/kg	QDx2	i.p.	8
3	Compuesto 1	40 mg/kg	QDx2	i.p.	8

La FIG. 5A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 0,25 mg/kg de MMAE o 40 mg/kg del Compuesto 1 (equivalente a 7 mg/kg de MMAE) en ratones lampiños que portaban tumores de flanco colorrectal negativos para HER2 HCT116. Los animales recibieron una dosis una vez al día por vía intraperitoneal durante un total de dos días.

La FIG. 5B muestra una gráfica del cambio porcentual en el peso corporal de ratones lampiños que portaban tumores colorrectales negativos para HER2 HCT116, a los que se les administraron 0,25 mg/kg de MMAE o 40 mg/kg del Compuesto 1 (equivalente a 7 mg/kg de MMAE).

Los animales a los que se les administró MMAE no conjugada experimentaron una rápida disminución en el peso corporal y se retiraron del estudio el día 6. En contraste, los animales a los que se les administró el Compuesto 1 no experimentaron cambios en el peso corporal. Estos datos demuestran que el Compuesto 1 presenta una potente actividad antitumoral y seguridad en un modelo de cáncer colorrectal preclínico.

Ejemplo F: Eficacia del Compuesto 2 en un modelo de xenoinjerto de próstata PC3 (va con la Fig. 6)

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables. Las células PC3 humanas derivadas de carcinoma de próstata se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 μ L. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis

intraperitoneales (IP) de vehículo o 20 mg/kg del Compuesto 2. Las dosis se prepararon diluyendo 0,1 mg/μL de soluciones madre de DMSO en 5 % manitol en amortiguador de citrato y se administraron QDx2/semana durante 3 semanas a un volumen de 12 mL/kg (300 μL por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: $\text{Volumen} = \pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, el tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o pérdida de >20 % del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de varios grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (manitol al 5 % en amortiguador de citrato)	N/A	QDx2/sem. x 3 sem.	i.p.	5
2	Compuesto 2	20 mg/kg	QDx2/sem. x 3 sem.	i.p.	5

La FIG. 6A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 20 mg/kg del Compuesto 2 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de adenocarcinoma de próstata PC3. Los animales recibieron una dosis una vez al día dos veces por semana por vía intraperitoneal durante tres semanas.

La FIG. 6B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en este estudio. Los datos se expresan como media ± SEM.

Estos datos demuestran que el Compuesto 2 presenta una potente actividad antitumoral y seguridad en un modelo de cáncer de próstata preclínico. Los animales a los que se les administró el Compuesto 2 no experimentaron cambios en el peso corporal.

Ejemplo G: Eficacia del compuesto 2 en un modelo de xenoinjerto de pulmón de no microcítico NCI-H1975

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables. Las células NCI-H1975 humanas derivadas de cáncer de pulmón no microcítico se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente

en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de 5×10^6 células en 100 μL . Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm^3 , los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo, 10 o 20 mg/kg del Compuesto 2. Las dosis se prepararon diluyendo 0,1 mg/ μL de soluciones madre de DMSO en 5 % manitol en amortiguador de citrato y se administraron QDx2/semana durante 3 semanas a un volumen de 12 mL/kg (300 μL por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: $\text{Volumen} = \pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, el tamaño del tumor que excede 2000 mm^3 o pérdida de >20 % del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de varios grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (manitol al 5 % en amortiguador de citrato)	N/A	QDx2/sem. x 3 sem.	i.p.	5
2	Compuesto 2	10 mg/kg	QDx2/sem. x 3 sem.	i.p.	5
2	Compuesto 2	20 mg/kg	QDx2/sem. x 3 sem.	i.p.	5

La FIG. 7A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 10 o 20 mg/kg del Compuesto 2 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de cáncer de pulmón no microcítico NCI-H1975. Los animales recibieron una dosis una vez al día dos veces por semana por vía intraperitoneal durante tres semanas.

La FIG. 7B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en este estudio. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

Estos datos demuestran que el Compuesto 2 presenta una potente actividad antitumoral y seguridad en un modelo de cáncer de pulmonar no microcítico preclínico. Los animales a los que se les administró el Compuesto 2 no experimentaron cambios en el peso corporal.

Ejemplo H: Seguridad del Compuesto 2 en ratones lampiños

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 3 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo, 10 o 20 mg/kg del Compuesto 2. Las dosis se prepararon diluyendo 0,1 mg/μL de soluciones madre de DMSO en 5 % manitol en amortiguador de citrato y se administraron a diario por cuatro días consecutivos a un volumen de 12 mL/kg (300 μL por 25 g de ratón). La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de varios grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (manitol al 5 % en amortiguador de citrato)	N/A	QDx4	i.p.	3
2	Compuesto 1	10 mg/kg	QDx4	i.p.	3
3	Compuesto 2	10 mg/kg	QDx4	i.p.	3

La FIG. 8 muestra una gráfica de los pesos corporales de ratones lampiños a los que se les administraron 10 mg/kg de Compuesto 1 y Compuesto 2 una vez al día durante cuatro días consecutivos.

Los animales a los que se les administró el Compuesto 1 y el Compuesto 2 no mostraron cambios en el peso corporal, lo que demuestra la seguridad de estos conjugados en el ratón.

Ejemplo I: Farmacocinética en tejido del Compuesto 13 y del Compuesto 7 en un modelo de ratón

Dosificación de Animales

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables (Innovive). Las células cancerosas HCT116 humanas derivadas de carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 μL. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 300 mm³, a los ratones

se les administró una inyección intraperitoneal única de 10 mg/kg del Compuesto 13 o Compuesto 7 preparado en un vehículo de 5 % manitol en citrato. El tumor se recogió de ratones anestesiados y alimentados a las 2, 4, 8 y 24 horas después de la administración del compuesto. Las concentraciones de MMAE en el tumor se determinaron mediante LCMS y las concentraciones de péptidos se determinaron mediante ELISA.

Determinación mediante LC-MS/MS de la concentración de MMAE en tejido

Las muestras de tejido descongeladas mantenidas en hielo húmedo se ajustaron a 100 mg/mL con PBS basándose en el peso del tejido. Las muestras se homogeneizaron en una máquina Precellys Evolution a 7200 rpm durante 2 ciclos de 30 segundos con una pausa de 10 segundos entre cada ciclo. Los homogeneizados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios Eppendorf LoBind de 2 mL. Se añadió un volumen de 100 µL de homogeneizado a una placa limpia de polipropileno de 96 pocillos de 2 mL, seguido de 75 µL de amortiguador de formiato de amonio, pH 6,9 y 25 µL de patrón interno de trabajo (WIS). Los controles en blanco doble recibieron 75 µL de agua:acetonitrilo:ácido fórmico (1:1:0,001, v:v:v) sin patrón interno. Las muestras fortificadas se cubrieron con una esterilla de silicona y se centrifugaron a 700 rpm durante 2 minutos. Trabajando en un colector de presión negativa, se añadieron 200 µL de muestras de matriz fortificada a una placa de extracción líquida soportada y se permitió que las muestras se filtraran a través de la frita de la placa con una presión negativa de ~650-700 torr durante hasta 1 minuto. Se dejó que las muestras se absorbieran completamente en la placa SLE durante 5 minutos. Antes de la elución de la muestra, se colocó una placa de recolección TrueTaper de 96 pocillos de 2 mL dentro del colector de vacío como recipiente de recolección. Las muestras se evaporaron bajo una corriente calentada de nitrógeno a 40 °C y se reconstituyeron en 150 µL de acetonitrilo:agua:formiato de amonio 200 mM (90:5:5, v:v:v). La placa de recolección se cubrió con una esterilla de silicona y se centrifugó a 900 rpm durante 2 minutos. Las muestras finales se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y el análisis se realizó inyectando 2 µL en un sistema de LC-MS/MS.

Medición de ELISA de Concentraciones en Tejido de Péptidos Totales

Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 100 µL/pocillo de péptido marcado con BSA 0,1 µM preparado en amortiguador de carbonato-bicarbonato 0,2 M, pH 9,4 y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 4x con un amortiguador de lavado de ELISA (PBS + 0,05 % Tween 20), se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con amortiguador de bloqueo (PBS + 5 % leche en polvo + 0,05 % Tween 20) (300 µL/pocillo) y

se lavaron de nuevo 4x con amortiguador de lavado de ELISA. Al mismo tiempo, se preincubaron 2x patrones de Compuesto 7/Compuesto 13 (en la matriz de tejido respectiva) u homogeneizados de tumor de muestra diluidos con diluyente de anticuerpos (PBS + leche en polvo al 2 % + Tween 20 al 0,05 %) con 1-10 ng/mL de un anticuerpo primario específico para el péptido Pv1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras preincubadas se añadieron a placas de ensayo pre-recubiertas y pre-bloqueadas a 100 μ L/pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 μ L/pocillo de un anticuerpo HRP de IgG anti-ratón de cabra secundario (1:5,000 en diluyente de anticuerpo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 μ L/pocillo de sustrato SuperSignal a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 minuto. La luminiscencia se leyó de la placa en un lector de placas BioTek Cytation 5.

La FIG. 9A muestra una gráfica de las concentraciones de péptidos en el tumor después de una única dosis IP de 10 mg/kg del Compuesto 7 o del Compuesto 13 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como medias $\pm$ SD). La FIG. 9B muestra una gráfica de las concentraciones de MMAE en el tumor después de una única dosis IP de 10 mg/kg del Compuesto 7 o del Compuesto 13 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como medias $\pm$ SD). Los datos demuestran que, si bien ambos conjugados se insertan de manera similar en el tumor, el Compuesto 13 es más lábil y libera entre 30-40X más oivas en el tumor en relación con el Compuesto 7.

Ejemplo J: Eficacia del Compuesto 13 en un modelo de xenoinjerto colorrectal HT-29

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables. Las células HT-29 humanas derivadas de cáncer colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 μ L. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo o 5 mg/kg del Compuesto 13. Las dosis se prepararon diluyendo 0,1 mg/ μ L de soluciones madre de DMSO en 5 % manitol en amortiguador de citrato y se administraron en los días 0-3, 5 y 16-19 a un volumen de 12 mL/kg (300 μ L por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para

el volumen del elipsoide: $\text{Volumen} = \pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, el tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o pérdida de >20 % del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de varios grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (manitol al 5 % en amortiguador de citrato)	N/A	Días 0-3, 5, 16-19	i.p.	8
2	Compuesto 13	5 mg/kg	Días 0-3, 5, 16-19	i.p.	8

La FIG. 10A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 5 mg/kg del Compuesto 13 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de cáncer colorrectal HT-29. Los animales recibieron una dosis una vez al día por vía intraperitoneal los días 0-3, 5 y 16-19.

La FIG. 10B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en este estudio. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

Los animales a los que se les administró el Compuesto 13 no experimentaron cambios en el peso corporal. Estos datos demuestran que el Compuesto 13 presenta una potente actividad antitumoral y seguridad en un modelo de cáncer colorrectal preclínico.

Ejemplo K: Eficacia del Compuesto 7 en un modelo de xenoinjerto colorrectal HT-29

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables. Las células HT-29 humanas derivadas de cáncer colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 μ L. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis intraperitoneales (IP) de vehículo, 40 o 80 mg/kg del Compuesto 7. Las dosis se prepararon diluyendo 0,1

mg/ μ L de soluciones madre de DMSO en 5 % manitol en amortiguador de citrato y se administraron QDx4/semana durante 2 semanas a un volumen de 12 mL/kg (300 μ L por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: Volumen = $\pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, el tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o pérdida de >20 % del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de varios grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (manitol al 5 % en amortiguador de citrato)	N/A	QDx4/sem. x 2 sem.	i.p.	8
2	Compuesto 7	40 mg/kg	QDx4/sem. x 2 sem.	i.p.	8
3	Compuesto 7	80 mg/kg	QDx4/sem. x 2 sem.	i.p.	8

La FIG. 11A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 40 y 80 mg/kg del Compuesto 7 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de cáncer colorrectal HT-29. Los animales recibieron una dosis una vez al día por vía intraparenteral durante cuatro días consecutivos a la semana durante dos semanas.

La FIG. 11B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en este estudio. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

Estos datos demuestran que el Compuesto 7 presenta eficacia y seguridad en el modelo HT-29 en dosis más altas en relación con el Compuesto 13, lo que concuerda con los diferentes perfiles de liberación de los dos conjugados.

Ejemplo L: Farmacocinética en tejido del Compuesto 13, Compuesto 1 y Compuesto 2 en un modelo de ratón

Dosificación de Animales

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de

jaulas desechables (Innovive). Las células de cáncer HCT116 humanas derivadas de carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 μL . Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 300 mm^3 , a los ratones se les administró una inyección intraperitoneal única de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 1 o Compuesto 2 preparado en un vehículo de 5 % manitol en citrato. El tumor se recogió a las 4 y 24 horas después de la administración del compuesto. Las concentraciones de MMAE en el tumor se determinaron mediante LCMS y las concentraciones de péptidos se determinaron mediante ELISA.

Determinación mediante LC-MS/MS de la concentración de MMAE en tejido

Las muestras de tejido descongeladas mantenidas en hielo húmedo se ajustaron a 100 mg/mL con PBS basándose en el peso del tejido. Las muestras se homogeneizaron en una máquina Precellys Evolution a 7200 rpm durante 2 ciclos de 30 segundos con una pausa de 10 segundos entre cada ciclo. Los homogeneizados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios Eppendorf LoBind de 2 mL. Se añadió un volumen de 100 μL de homogeneizado a una placa limpia de polipropileno de 96 pocillos de 2 mL, seguido de 75 μL de amortiguador de formiato de amonio, pH 6,9 y 25 μL de patrón interno de trabajo (WIS). Los controles en blanco doble recibieron 75 μL de agua:acetonitrilo:ácido fórmico (1:1:0,001, v:v:v) sin patrón interno. Las muestras fortificadas se cubrieron con una esterilla de silicona y se centrifugaron a 700 rpm durante 2 minutos. Trabajando en un colector de presión negativa, se añadieron 200 μL de muestras de matriz fortificada a una placa de extracción líquida soportada y se permitió que las muestras se filtraran a través de la fritta de la placa con una presión negativa de ~650-700 torr durante hasta 1 minuto. Se dejó que las muestras se absorbieran completamente en la placa SLE durante 5 minutos. Antes de la elución de la muestra, se colocó una placa de recolección TrueTaper de 96 pocillos de 2 mL dentro del colector de vacío como recipiente de recolección. Las muestras se evaporaron bajo una corriente calentada de nitrógeno a 40 °C y se reconstituyeron en 150 μL de acetonitrilo:agua:formiato de amonio 200 mM (90:5:5, v:v:v). La placa de recolección se cubrió con una esterilla de silicona y se centrifugó a 900 rpm durante 2 minutos. Las muestras finales se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y el análisis se realizó inyectando 2 μL en un sistema de LC-MS/MS.

Medición de ELISA de Concentraciones en Tejido de Péptidos Totales

Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 100 μL /pocillo de péptido marcado con BSA 0,1

μ M preparado en amortiguador de carbonato-bicarbonato 0,2 M, pH 9,4 y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 4x con un amortiguador de lavado de ELISA (PBS + 0,05 % Tween 20), se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con amortiguador de bloqueo (PBS + 5 % leche en polvo + 0,05 % Tween 20) (300 μ L/pocillo) y se lavaron de nuevo 4x con amortiguador de lavado de ELISA. Al mismo tiempo, se preincubaron 2x patrones de conjugado de auristatina (en la matriz de tejido respectiva) u homogeneizados de tumor de muestra diluidos con diluyente de anticuerpos (PBS + leche en polvo al 2 % + Tween 20 al 0,05 %) con 1-10 ng/mL de un anticuerpo primario específico para el péptido Pv1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras preincubadas se añadieron a placas de ensayo pre-recubiertas y pre-bloqueadas a 100 μ L/pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 μ L/pocillo de un anticuerpo HRP de IgG anti-ratón de cabra secundario (1:5,000 en diluyente de anticuerpo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 μ L/pocillo de sustrato SuperSignal a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 minuto. La luminiscencia se leyó de la placa en un lector de placas BioTek Cytation 5.

La FIG. 12A muestra una gráfica de las concentraciones de péptidos en el tumor después de una única dosis intraperitoneal de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 1 o Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como medias $\pm$ SD).

La FIG. 12B muestra una gráfica de las concentraciones de MMAE en el tumor después de una única dosis intraperitoneal de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 1 o Compuesto 2 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como medias $\pm$ SD).

Los datos demuestran que, si bien los conjugados se insertan de manera similar en el tumor, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 liberan niveles intermedios de MMAE en relación con el Compuesto 13.

Ejemplo M: Farmacocinética en tejido del Compuesto 13, Compuesto 7, Compuesto 5 y Compuesto 6 en un modelo de ratón

Dosificación de Animales

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables (Innovive). Las células de cáncer HCT116 humanas derivadas de

carcinoma colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 μL . Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen mínimo de 300 mm^3 , a los ratones se les administró una inyección intraperitoneal única de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 7, Compuesto 5 o Compuesto 6 preparado en un vehículo de 5 % manitol en citrato. El tumor se recogió a las 4 y 24 horas después de la administración del compuesto. Las concentraciones de MMAE en el tumor se determinaron mediante LCMS y las concentraciones de péptidos se determinaron mediante ELISA.

Determinación mediante LC-MS/MS de la concentración de MMAE en tejido

Las muestras de tejido descongeladas mantenidas en hielo húmedo se ajustaron a 100 mg/mL con PBS basándose en el peso del tejido. Las muestras se homogeneizaron en una máquina Precellys Evolution a 7200 rpm durante 2 ciclos de 30 segundos con una pausa de 10 segundos entre cada ciclo. Los homogeneizados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios Eppendorf LoBind de 2 mL. Se añadió un volumen de 100 μL de homogeneizado a una placa limpia de polipropileno de 96 pocillos de 2 mL, seguido de 75 μL de amortiguador de formiato de amonio, pH 6,9 y 25 μL de patrón interno de trabajo (WIS). Los controles en blanco doble recibieron 75 μL de agua:acetonitrilo:ácido fórmico (1:1:0,001, v:v:v) sin patrón interno. Las muestras fortificadas se cubrieron con una esterilla de silicona y se centrifugaron a 700 rpm durante 2 minutos. Trabajando en un colector de presión negativa, se añadieron 200 μL de muestras de matriz fortificada a una placa de extracción líquida soportada y se permitió que las muestras se filtraran a través de la frit de la placa con una presión negativa de ~650-700 torr durante hasta 1 minuto. Se dejó que las muestras se absorbieran completamente en la placa SLE durante 5 minutos. Antes de la elución de la muestra, se colocó una placa de recolección TrueTaper de 96 pocillos de 2 mL dentro del colector de vacío como recipiente de recolección. Las muestras se evaporaron bajo una corriente calentada de nitrógeno a 40 °C y se reconstituyeron en 150 μL de acetonitrilo:agua:formiato de amonio 200 mM (90:5:5, v:v:v). La placa de recolección se cubrió con una esterilla de silicona y se centrifugó a 900 rpm durante 2 minutos. Las muestras finales se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y el análisis se realizó inyectando una muestra de 2 μL en un sistema de LC-MS/MS.

Medición de ELISA de Concentraciones en Tejido de Péptidos Totales

Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 100 μL /pocillo de péptido marcado con BSA 0,1 μM preparado en amortiguador de carbonato-bicarbonato 0,2 M, pH 9,4 y se incubaron

durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 4x con un amortiguador de lavado de ELISA (PBS + 0,05 % Tween 20), se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con amortiguador de bloqueo (PBS + 5 % leche en polvo + 0,05 % Tween 20) (300 µL/pocillo) y se lavaron de nuevo 4x con amortiguador de lavado de ELISA. Al mismo tiempo, se preincubaron 2x patrones de conjugado de auristatina (en la matriz de tejido respectiva) u homogeneizados de tumor de muestra diluidos con diluyente de anticuerpos (PBS + leche en polvo al 2 % + Tween 20 al 0,05 %) con 1-10 ng/mL de un anticuerpo primario específico para el péptido Pv1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras preincubadas se añadieron a placas de ensayo pre-recubiertas y pre-bloqueadas a 100 µL/pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 µL/pocillo de un anticuerpo HRP de IgG anti-ratón de cabra secundario (1:5,000 en diluyente de anticuerpo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x con amortiguador de lavado de ELISA y se incubaron con 100 µL/pocillo de sustrato SuperSignal a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 minuto. La luminiscencia se leyó de la placa en un lector de placas BioTek Cytation 5.

La FIG. 13A muestra una gráfica de los niveles de péptidos en tumor de ratón determinados mediante ELISA y LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 7, Compuesto 5 o Compuesto 6 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como media ± SD).

La FIG. 13B muestra una gráfica de los niveles de MMAE no conjugada en tumor de ratón determinados mediante ELISA y LCMS después de una única inyección intraperitoneal de 10 mg/kg del Compuesto 13, Compuesto 7, Compuesto 5 o Compuesto 6 en ratones hembra lampiños portadores de tumor colorrectal HCT116 (los datos se expresan como media ± SD). Los datos demuestran que, si bien los conjugados se insertan de manera similar en el tumor, liberan una ojiva en el tumor con una amplia gama de cinética.

Ejemplo N: Eficacia del Compuesto 5 en un modelo de xenoinjerto colorrectal HCT116

Se obtuvieron ratones *Foxn^{nu}* hembra atímicos lampiños de seis semanas de edad de Taconic Labs (n.º de Cat. NCRNU-F) y se alojaron 5 por jaula en lecho Alpha-Dri en un sistema de jaulas desechables. Las células HCT116 humanas derivadas de cáncer colorrectal se diluyeron 1:1 en Matrigel libre de rojo fenol y se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de cada ratón a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células en 100 µL. Cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm³, los ratones se aleatorizaron en grupos y se trataron como se detalla en la tabla a continuación. A los ratones se les administraron dosis

intraperitoneales (IP) de vehículo, 1, 5 o 10 mg/kg del Compuesto 5. Las dosis se prepararon diluyendo 0,1 mg/ μ L de soluciones madre de DMSO en 5 % manitol en amortiguador de citrato y se administraron QDx2/semana durante 3 semanas a un volumen de 12 mL/kg (300 μ L por 25 g de ratón). Los tumores de xenoinjerto se midieron por calibradores y el volumen se calculó usando la ecuación para el volumen del elipsoide: Volumen = $\pi/6 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$. Los animales se retiraron del estudio debido a la muerte, el tamaño del tumor que excede 2000 mm³ o pérdida de >20 % del peso corporal. La siguiente tabla muestra el programa de dosificación de varios grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Programa de Dosificación	Ruta de Administración	Numero de Ratones
1	Vehículo (manitol al 5 % en amortiguador de citrato)	N/A	QDx4	i.p.	8
2	Compuesto 5	1 mg/kg	QDx4	i.p.	8
3	Compuesto 5	5 mg/kg	QDx4	i.p.	8
4	Compuesto 5	10 mg/kg	QDx4	i.p.	8

La FIG. 14A muestra una gráfica del volumen tumoral medio resultante de la dosificación de 1, 5 y 10 mg/kg del Compuesto 5 en ratones lampiños que portaban tumores de flanco de cáncer colorrectal HCT116. Los animales recibieron una dosis una vez al día por vía intraparenteral durante cuatro días consecutivos.

La FIG. 14B muestra el cambio porcentual en el peso corporal de los animales en este estudio. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

Estos datos demuestran que el Compuesto 5 presenta eficacia sensible a la dosis en el modelo HCT116.

Varias modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. También se pretende que tales modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Cada referencia, que incluye, sin limitación, todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones, citadas en la presente solicitud, se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.