

CONJUGADOS DE ANTICUERPOS Y FÁRMACOS

1. CAMPO

[0001] En el presente documento se proporcionan proteínas novedosas, por ejemplo, anticuerpos, conjugados de fármacos que comprenden grupos solubilizantes hidrófilos y/o conectores que comprenden grupos solubilizantes hidrófilos, y métodos para tratar enfermedades, trastornos y afecciones que comprenden administrar los conjugados de proteínas y fármacos que comprenden grupos solubilizantes hidrófilos y/o conectores de estos.

2. ANTECEDENTES

[0002] Los conjugados de anticuerpos y fármacos (ADC) son anticuerpos que están unidos operativamente a una micromolécula biológicamente activa, también conocida como toxina o carga activa. Los ADC entregan una potente carga activa de forma selectiva a las células que expresan la diana, lo que genera una potencial reducción de los efectos secundarios y/o la toxicidad colaterales y un índice terapéutico mejorado. La naturaleza lipófila de muchas cargas activas (es decir, fármacos) puede afectar negativamente las propiedades del ADC en la medida en que las cargas activas no se entregan de manera eficiente a las células diana. La baja biodisponibilidad de las cargas lipófilas puede reducir las ventanas terapéuticas para el tratamiento con ADC. Además, la naturaleza hidrófoba de las cargas activas puede presentar desafíos para su conjugación con anticuerpos, una reacción que se realiza en condiciones acuosas. Por lo tanto, existe una necesidad constante de desarrollar conectores hidrófilos para conjugados de proteínas, por ejemplo, ADC, que permitirían la viabilidad de conjugar cargas lipófilas, mejorar la modulación de dianas biológicas, mejorar la biodisponibilidad y mejorar la ventana terapéutica.

[0003] Las terapias con anticuerpos monoclonales (mAb) están ganando impulso como tratamientos complementarios y de primera línea para el cáncer. Los éxitos de las terapias con mAb como AVASTIN™ (anti-VEGF) para el cáncer de colon, RITUXAN™ (Rituximab; anti-CD20) para el linfoma no hodgkiniano y HERCEPTIN™ (anti-Her2) para el cáncer de mama han demostrado que los anticuerpos no conjugados pueden mejorar la supervivencia del paciente sin la incidencia de un aumento significativo de la toxicidad.

[0004] Los anticuerpos monoclonales pueden conjugarse con un agente terapéutico para formar un conjugado de anticuerpo y fármaco. Por ejemplo, el anticuerpo HERCEPTIN™ mencionado anteriormente se conjugó con una carga activa de maitansina para formar el ADC KADCYLA™. Los ADC pueden mostrar una mayor eficacia, en comparación con un anticuerpo no conjugado. El enlace del anticuerpo al fármaco puede ser directo o indirecto a través de un

conector. Los conectores pueden ser escindibles o no escindibles. Uno de los componentes que se cree que es importante para desarrollar ADC eficaces y bien tolerados es la composición y la estabilidad del conector. Para algunos tipos de ADC, el conector proporciona convenientemente estabilidad sérica, pero libera selectivamente el fármaco dentro de la célula diana.

5 **[0005]** La fijación de un conector a un mAb puede lograrse de diversas maneras, tales como a través de lisinas de superficie, acoplamiento reductor a carbohidratos oxidados y a través de residuos de cisteína liberados mediante la reducción de enlaces disulfuro entre cadenas. Se han descrito en la bibliografía diversos sistemas de enlace de ADC, incluidos enlaces basados en hidrazona, disulfuro y péptidos. Algunos enlaces basados en hidrazona y disulfuro pueden ser
10 lábiles en la circulación, lo que da como resultado la liberación no deseada del fármaco fuera del tejido diana. Se cree que esta liberación prematura del fármaco puede provocar toxicidad sistémica o toxicidad específica de órganos y/o una eficacia terapéutica inferior a la óptima. Las estrategias de conector basadas en péptidos pueden proporcionar conectores de mayor estabilidad; sin embargo, el aumento de hidrofobicidad asociada de algunos conectores puede
15 conducir a la agregación, particularmente con fármacos fuertemente hidrófobos. Tal agregación puede provocar varios efectos no deseados, tales como la precipitación del ADC, dificultad en la administración y recaptación no específica de los ADC en tejidos inespecíficos, lo que potencialmente afecta la toxicidad colateral y reduce la eficacia.

[0006] Exatecan es un fármaco que es un análogo estructural de la camptotecina con
20 actividad antineoplásica. Véase Abou-Alfa *et al.*, "Randomized Phase III Study of Exatecan and Gemcitabine Compared with Gemcitabine Alone in Untreated Advanced Pancreatic Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, 24 (27): 4441–7, 20 de septiembre de 2006. La monometilauristatina E (MMAE) es un agente antineoplásico sintético. Debido a su toxicidad no puede usarse como fármaco en sí misma. La MMAE es en realidad desmetilauristatina E; es decir, el grupo amino
25 aminoterminal tiene solo un sustituyente metilo en lugar de dos como en la propia auristatina E. Véase Dosio *et al.*, "Immunotoxins and Anticancer Drug Conjugate Assemblies: The Role of the Linkage between Components," *Toxins*. 3 (12): 848–883, 2011.

[0007] En el ámbito de tratamientos de micromoléculas, se han desarrollado estrategias para proporcionar profármacos de una entidad química activa. Tales profármacos se administran en
30 forma relativamente inactiva (o significativamente menos activa). Una vez administrado, el profármaco se metaboliza in vivo en el compuesto activo. Tales estrategias de profármacos pueden aumentar la selectividad del fármaco por su diana prevista y reducir los efectos adversos.

[0008] Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una administración dirigida de toxinas,

que dé como resultado la eliminación de células dirigidas y al mismo tiempo reduzca la toxicidad para las células no diana.

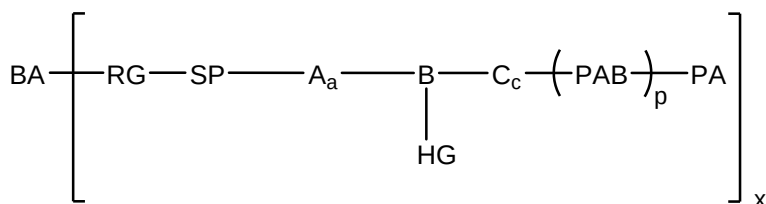
[0009] Además, algún anticuerpo, tal como Patritumab, presenta una agregación observable visualmente durante el intercambio rápido de amortiguador. Su temperatura de agregación (Tagg), detectada mediante dispersión de luz dinámica (DLS), y su tendencia de autoasociación detectada mediante el ensayo AC-SINS son ambas peores que las de un panel de mAb de buen comportamiento. La tendencia de agregación de patritumab da como resultado la agregación de los ADC correspondientes.

[0010] Por lo tanto, existe una necesidad médica insatisfecha de crear ADC con sistemas de conectores que proporcionen un alto nivel de estabilidad sérica del conector y una mayor solubilidad, lo que permite la conjugación eficiente de fármacos hidrófobos y la administración intracelular eficaz de fármacos.

3. BREVE COMPENDIO

[0011] Se proporcionan en el presente documento ADC con sistemas de conectores que proporcionan un alto nivel de estabilidad sérica del conector y una mayor solubilidad, lo que permite la conjugación eficiente de fármacos hidrófobos y la administración intracelular eficaz de fármacos.

[0012] En una modalidad, el ADC es un compuesto de la Fórmula (I):



(I),

o una sal, tautómero, solvato, estereoisómero, enantiómero, isotopólogo o profármaco farmacéuticamente aceptable de este, en donde las variables se definen como en el presente documento. En una modalidad, el ADC comprende uno o más residuos hidrófilos.

[0013] En otra modalidad, el ADC es un compuesto de la Fórmula (Ia):

o una sal, tautómero, solvato, estereoisómero, enantiómero, isotopólogo o profármaco farmacéuticamente aceptable de este, en donde las variables se definen como en el presente documento.

$$\left[\text{BA} - \text{RG} - \text{SP} - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3)_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_2\text{OH}) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{PA} \right]_x$$

o una sal, tautómero, solvato, estereoisómero, enantiómero, isotópologo o profármaco farmacéuticamente aceptable de este, en donde las variables se definen como en el presente documento.

[0015] En otra modalidad, en el presente documento se establece un método para tratar una enfermedad, afección o trastorno en un paciente que lo necesita, que incluye administrar al paciente un compuesto establecido en el presente documento. También se proporciona el uso de un compuesto descrito en el presente documento para tratar una enfermedad, afección o trastorno establecido en el presente documento. Además, se proporciona el uso de un compuesto

descrito en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, afección o trastorno establecido en el presente documento. En algunas modalidades, el compuesto es un conjugado de anticuerpo y fármaco.

[0016] En otra modalidad, se establece en el presente documento un método para preparar un conjugado de anticuerpo y fármaco que incluye la etapa de poner en contacto un agente aglutinante con un compuesto de carga activa y conector en condiciones adecuadas para formar un enlace entre el agente aglutinante y el compuesto de carga activa y conector.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0017] La Figura 1 ilustra el modo de liberación en tándem de los ADC.

10 **[0018]** La Figura 2, la Figura 3, la Figura 4 y la Figura 5 ilustran que, con el diseño del conector de liberación en tándem, las muertes celulares de ADC-C10, ADC-C11, ADC-C13 y ADC-C14 parecen ser similares a las de ADC-C1 en las estirpes celulares H358, H441, H1048 y MDA-MB-453, lo que indica una liberación eficiente de la carga activa dentro de las células.

15 **[0019]** La Figura 6, la Figura 7, la Figura 8 y la Figura 9 ilustran que, con el diseño del conector de liberación en tándem, las muertes celulares de ADC-C3, ADC-C4, ADC-C5 y ADC-C6 parecen ser similares a las de ADC-C1 en las estirpes celulares H358, H441, H1048 y MDA-MB-453, lo que indica una liberación eficiente de la carga activa dentro de las células.

20 **[0020]** La Figura 10, la Figura 11, la Figura 12 y la Figura 13 ilustran que, con el diseño del conector de liberación en tándem, las muertes celulares de ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 parecen ser similares a las de ADC-C1 en las estirpes celulares H358, H441, H1048 y MDA-MB-453, lo que indica una liberación eficiente de la carga activa dentro de las células.

[0021] La Figura 14 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C10, ADC-C11, ADC-C13 y ADC-C14 en tratamiento con lisosomas.

25 **[0022]** La Figura 15 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C10, ADC-C11, ADC-C13 y ADC-C14 en tratamiento con catepsina B.

[0023] La Figura 16 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C3, ADC-C4, ADC-C5 y ADC-C6 en tratamiento con lisosomas.

[0024] La Figura 17 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C3, ADC-C4, ADC-C5 y ADC-C6 en tratamiento con catepsina B.

30 **[0025]** La Figura 18 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 en tratamiento con lisosomas.

[0026] La Figura 19 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 en tratamiento con catepsina B.

[0027] La Figura 20 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C10, ADC-C11, ADC-C13 y ADC-C14 en tratamiento con plasma humano, que muestra una velocidad de liberación de carga activa comparable y aceptable.

5 [0028] La Figura 21 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C3, ADC-C4, ADC-C5 y ADC-C6 en tratamiento con plasma humano, que muestra una velocidad de liberación de carga activa comparable y aceptable.

[0029] La Figura 22 ilustra el perfil de liberación de carga activa de ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 en tratamiento con plasma humano, que muestra una velocidad de liberación de carga activa comparable y aceptable.

10 5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0030] En el presente documento se proporcionan compuestos, composiciones, ADC y métodos útiles para tratar una amplia variedad de cánceres humanos, incluidos, entre otros, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, carcinoma broncopulmonar no microcítico (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de vías respiratorias y digestivas altas, cáncer de páncreas y
15 cáncer de cuello uterino. En una modalidad, se proporcionan en el presente documento compuestos, composiciones, ADC y métodos útiles para tratar una amplia variedad de cánceres humanos.

[0031] Dentro de la presente descripción, se entiende que la descripción no se limita a métodos particulares y/o condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y
20 condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir modalidades particulares y no pretende ser taxativa.

[0032] Si bien se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o analizar la presente invención,
25 a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones diferentes de patentes que se mencionan en la presente memoria descriptiva se incorporan al presente documento en su totalidad por referencia.

5.1. Definiciones

[0033] Cuando se hace referencia a los compuestos proporcionados en el presente
30 documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente les atribuye el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En el caso de que exista una pluralidad

de definiciones para un término proporcionado en el presente documento, estas Definiciones prevalecerán a menos que se indique lo contrario.

[0034] Como se usan en el presente documento, y en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, los artículos indefinidos “un” y “una” y el artículo definido “el/la” incluyen referentes tanto plurales como singulares, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0035] Como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique lo contrario, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando se usan en relación con cantidades o porcentaje en peso de ingredientes de una composición, significan una cantidad o porcentaje en peso que es reconocido por un experto en la técnica para proporcionar un efecto farmacológico equivalente al obtenido a partir de la cantidad especificada, o porcentaje en peso. En ciertas modalidades, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando se usan en este contexto, contemplan una cantidad o porcentaje en peso dentro del 30 %, dentro del 20 %, dentro del 15 %, dentro del 10 % o dentro del 5 % de la cantidad especificada o porcentaje en peso.

[0036] Como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique lo contrario, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando se usan en conexión con un valor numérico o rango de valores que se proporciona para caracterizar una forma sólida particular, por ejemplo, una temperatura o rango de temperatura específico, tal como, por ejemplo, que describe una temperatura de fusión, deshidratación, desolvatación o transición vítrea; un cambio de masa, tal como, por ejemplo, un cambio de masa en función de la temperatura o la humedad; un contenido de disolvente o agua, en términos de, por ejemplo, masa o porcentaje; o una posición de pico, tal como, por ejemplo, en análisis mediante, por ejemplo, espectroscopia IR o Raman o XRPD; indicar que el valor o rango de valores puede desviarse en un grado considerado razonable para un experto en la técnica sin dejar de describir la forma sólida. Las técnicas para caracterizar formas cristalinas y sólidos amorfos incluyen, entre otras, análisis gravimétrico térmico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X en polvo (XRPD), difracción de rayos X de monocristal, espectroscopia de vibración, por ejemplo, espectroscopia infrarroja (IR) y Raman, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) de estado sólido y solución, microscopía óptica, microscopía óptica de etapa caliente, microscopía electrónica de barrido (SEM), cristalografía electrónica y análisis cuantitativo, análisis del tamaño de partículas (PSA), análisis de área superficial, estudios de solubilidad y estudios de disolución. En ciertas modalidades, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando se usan en este contexto, indican que el valor numérico o rango de valores puede variar dentro del

30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 % o 0,25 % del valor o rango de valores mencionado. Por ejemplo, en algunas modalidades, el valor de una posición de pico de XRPD puede variar hasta $\pm 0,2^\circ 2\theta$ (o $\pm 0,2$ grados 2θ) sin dejar de describir el pico de XRPD particular.

5 **[0037]** Un grupo "alquilo" es una cadena lineal saturada, parcialmente saturada o insaturada o un hidrocarburo no cíclico ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, usualmente de 1 a 8 carbonos o, en algunas modalidades, de 1 a 6, 1 a 4, o 2 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo representativos incluyen –metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo y -n-hexilo; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen –isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -*tert*-butilo, 2-
10 metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo y similares. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, entre otros, vinilo, alilo, $\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_3)$, $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_3)$ y $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, entre otros. Un grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. En ciertas modalidades, cuando se dice que los grupos alquilo descritos en el presente
15 documento están "sustituidos", pueden estar sustituidos con cualquier sustituyente o sustituyentes como los que se encuentran en los compuestos y modalidades ejemplares descritos en el presente documento, así como halógeno (cloro, yodo, bromo o flúor); hidroxilo; alcoxi; alcoxialquilo; amino; alquilamino; carboxi; nitro; ciano; tiol; tioéter; imina; imida; amidina; guanidina; enamina; aminocarbonilo; acilamino; fosfonato; fosfina; tiocarbonilo; sulfonilo; sulfona;
20 sulfonamida; cetona; aldehído; éster; urea; uretano; oxima; hidroxilamina; alcoxiamina; aralcoxiamina; N-óxido; hidrazina; hidrazida; hidrazona; azida; isocianato; isotiocianato; cianato; tiocianato; $\text{B}(\text{OH})_2$ u $\text{O}(\text{alquil})\text{aminocarbonilo}$.

[0038] Un grupo "alquenilo" es un hidrocarburo no cíclico de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, usualmente, de 2 a 8 átomos de carbono, y que incluye al
25 menos un doble enlace carbono-carbono. Los alquenos (C_2C_8) de cadena lineal y ramificada representativos incluyen -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, 2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, -1-hexenilo, 2-hexenilo, -3-hexenilo, -1-heptenilo, -2-heptenilo, -3-heptenilo, -1-octenilo, -2-octenilo, 3-octenilo y similares. El doble enlace de un grupo alquenilo puede estar conjugado o no conjugado con otro grupo
30 insaturado. Un grupo alquenilo puede estar sustituido o no sustituido.

[0039] Un grupo "cicloalquilo" es un grupo alquilo cíclico saturado o parcialmente saturado de 3 a 10 átomos de carbono que tiene un único anillo cíclico o múltiples anillos condensados o unidos por puentes que pueden estar opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos alquilo. En

algunas modalidades, el grupo cicloalquilo tiene de 3 a 8 miembros en el anillo, mientras que en otras modalidades el número de átomos de carbono del anillo varía de 3 a 5, de 3 a 6 o de 3 a 7. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de anillo único tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, 1-metilciclopropilo, 2-metilciclopentilo, 2-metilciclooctilo y similares, o estructuras de anillos múltiples o con puentes como adamantilo y similares. Ejemplos de grupos cicloalquilo insaturados incluyen ciclohexenilo, ciclopentenilo, ciclohexadienilo, butadienilo, pentadienilo, hexadienilo, entre otros. Un grupo cicloalquilo puede estar sustituido o no sustituido. Dichos grupos cicloalquilo sustituidos incluyen, a modo de ejemplo, ciclohexanona y similares.

10 **[0040]** Un grupo "arilo" es un grupo carbocíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, naftilo o antrilo). En algunas modalidades, los grupos arilo contienen de 6 a 14 carbonos, y en otras, de 6 a 12 o incluso de 6 a 10 átomos de carbono en las porciones de anillo de los grupos. Arilos particulares incluyen fenilo, bifenilo, naftilo y similares. Un grupo arilo puede estar sustituido o no
15 sustituido. La frase "grupos arilo" también incluye grupos que contienen anillos fusionados, tales como sistemas de anillos aromáticos-alifáticos fusionados (por ejemplo, indanilo, tetrahidronaftilo y similares).

[0041] Un grupo "heteroarilo" es un sistema de anillo arilo que tiene uno de cuatro heteroátomos como átomos de anillo en un sistema de anillo heteroaromático, en donde el resto
20 de los átomos son átomos de carbono. En algunas modalidades, los grupos heteroarilo contienen de 5 a 6 átomos en el anillo, y en otros, de 6 a 9 o incluso de 6 a 10 átomos en las porciones de anillo de los grupos. Los heteroátomos adecuados incluyen oxígeno, azufre y nitrógeno. En ciertas modalidades, el sistema de anillo heteroarilo es monocíclico o bicíclico. Los ejemplos no limitantes incluyen, entre otros, grupos tales como grupos pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, triazolilo,
25 tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, pirrolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, tiofenilo, benzotiofenilo, furanilo, benzofuranilo (por ejemplo, isobenzofuran-1,3-diimina), indolilo, azaindolilo (por ejemplo, pirrolopiridilo o 1H-pirrol[2,3-b]piridilo), indazolilo, bencimidazolilo (por ejemplo, 1H-benzo[d]imidazolilo), imidazopiridilo (por ejemplo, azabencimidazolilo, 3H-imidazo[4,5-b]piridilo o 1H-imidazo[4,5-b]piridilo), pirazolopiridilo, triazolopiridilo, benzotriazolilo,
30 benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, isoxazolopiridilo, tianaftalenilo, purinilo, xantinilo, adeninilo, guaninilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, quinoxalinilo y quinazolinilo.

[0042] Un "heterociclilo" es un cicloalquilo aromático (también conocido como heteroarilo) o no aromático en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo se reemplazan

independientemente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. En algunas modalidades, los grupos heterociclilo incluyen de 3 a 10 miembros del anillo, mientras que otros grupos tales tienen de 3 a 5, de 3 a 6 o de 3 a 8 miembros del anillo. Los heterociclos también pueden estar unidos a otros grupos en cualquier átomo del anillo (es decir, en cualquier átomo de carbono o heteroátomo del anillo heterocíclico). Un grupo heterociclilo puede estar sustituido o no sustituido. Los grupos heterociclilo abarcan sistemas de anillos insaturados, parcialmente saturados y saturados, tales como, por ejemplo, grupos imidazolilo, imidazolinilo e imidazolidinilo. La frase heterociclilo incluye especies de anillos fusionados, incluidas aquellas que comprenden grupos no aromáticos y aromáticos fusionados, tales como, por ejemplo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxinilo y benzo[1,3]dioxolilo. La frase también incluye sistemas de anillos policíclicos con puentes que contienen un heteroátomo tal como, entre otros, quinuclidilo. Los ejemplos representativos de un grupo heterociclilo incluyen, entre otros, grupos aziridinilo, azetidínilo, pirrolidilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrofurano, dioxolilo, furano, tiofenilo, pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, pirazolilo, pirazolinilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiazolinilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidropirano (por ejemplo, tetrahidro-2H-pirano), tetrahidrotiopirano, oxatiano, dioxilo, ditiano, pirano, piridilo, pirimidilo, piridazinilo, pirazinilo, triazinilo, dihidropiridilo, dihidroditiinilo, dihidroditionilo, homopiperazinilo, quinuclidilo, indolilo, indolinilo, isoindolilo, azaindolilo (pirrolopiridilo), indazolilo, indolizínilo, benzotriazolilo, bencimidazolilo, benzofurano, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxadiazolilo, benzoxazinilo, benzoditiinilo, benzoxatiinilo, benzotiacinilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[1,3]dioxolilo, pirazolopiridilo, imidazopiridilo (azabencimidazolilo, por ejemplo, 1H-imidazo[4,5-b]piridilo o 1H-imidazo[4,5-b]piridin-2(3H)-onilo), triazolopiridilo, isoxazolopiridilo, purinilo, xantinilo, adeninilo, guaninilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinolizínilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, pteridinilo, tianaftalenilo, dihidrobenzotiazinilo, dihidrobenzofurano, dihidroindolilo, dihidrobenzodioxinilo, tetrahidroindolilo, tetrahidroindazolilo, tetrahidrobencimidazolilo, tetrahidrobenzotriazolilo, tetrahidropirrolopiridilo, tetrahidropirazolopiridilo, tetrahidroimidazopiridilo, tetrahidrotriazolopiridilo y tetrahidroquinolinilo. Los grupos heterociclilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez, tales como, entre otros, grupos piridilo o morfolinilo, que están sustituidos en 2, 3, 4, 5 o 6, o disustituidos con varios sustituyentes como los que se enumeran a continuación.

[0043] Un grupo "cicloalquilalquilo" es un radical de la fórmula: -alquil-cicloalquilo, en donde

alquilo y cicloalquilo son como se definen anteriormente. Los grupos cicloalquilalquilo sustituidos pueden estar sustituidos en la porción alquilo, cicloalquilo o tanto en la porción alquilo como cicloalquilo del grupo. Los grupos cicloalquilalquilo representativos incluyen, entre otros, ciclopentilmetilo, ciclopentiletilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo y ciclohexilpropilo. Los grupos cicloalquilalquilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez.

[0044] Un grupo "aralquilo" es un radical de la fórmula: -alquil-arilo, en donde alquilo y arilo se definen anteriormente. Los grupos aralquilo sustituidos pueden estar sustituidos en la porción alquilo, cicloalquilo o tanto en la porción alquilo como en la cicloalquilo del grupo. Los grupos aralquilo representativos incluyen, entre otros, grupos bencilo y fenetilo y grupos (cicloalquilaryl)alquilo fusionados tales como 4-etil-indanilo.

[0045] Un grupo "heterociclilalquilo" es un radical de la fórmula: -alquil-heterociclilo, en donde alquilo y heterociclilo se definen anteriormente. Los grupos heterociclilalquilo sustituidos pueden estar sustituidos en la porción alquilo, heterociclilo o tanto en la porción alquilo como en la heterociclilo del grupo. Los grupos heterociclilalquilo representativos incluyen, entre otros, 4-etil-morfolinilo, 4-propilmorfolinilo, furan-2-ilmetilo, furan-3-ilmetilo, piridin-3-ilmetilo, (tetrahydro-2H-piran-4-il)metilo, (tetrahydro-2H-piran-4-il)etilo, tetrahydrofuran-2-ilmetilo, tetrahydrofuran-2-etilo e indol-2-ilpropilo.

[0046] Un "halógeno" es cloro, yodo, bromo o flúor.

[0047] Un grupo "hidroxialquilo" es un grupo alquilo como se describió anteriormente sustituido con uno o más grupos hidroxilo.

[0048] Un grupo "alcoxi" es O(alquilo), en donde alquilo se define anteriormente.

[0049] Un grupo "alcoxialquilo" es (alquil)O(alquilo), en donde alquilo se define anteriormente.

[0050] Un grupo "amina" es un radical de la fórmula: NH_2 .

[0051] Un grupo "hidroxilamina" es un radical de la fórmula: $\text{N(R}^\#\text{)OH}$ o NHOH , en donde $\text{R}^\#$ es un grupo alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo sustituido o no sustituido como se define en el presente documento.

[0052] Un grupo "alcoxiamina" es un radical de la fórmula: $\text{-N(R}^\#\text{)O-alquilo}$ o -NHO-alquilo , en donde $\text{R}^\#$ es como se definió anteriormente.

[0053] Un grupo "aralcoxiamina" es un radical de la fórmula: $\text{N(R}^\#\text{)O-arilo}$ o NHO-arilo , en donde $\text{R}^\#$ es como se definió anteriormente.

[0054] Un grupo "alquilamina" es un radical de la fórmula: NH-alquilo o N(alquilo)_2 , en donde

cada alquilo es independientemente como se define anteriormente.

[0055] Un grupo "aminocarbonilo" es un radical de la fórmula: $-C(=O)N(R^{\#})_2$, $-C(=O)NH(R^{\#})$ o $-C(=O)NH_2$, en donde cada $R^{\#}$ es como se definió anteriormente.

[0056] Un grupo "acilamino" es un radical de la fórmula: $NHC(=O)(R^{\#})$ o $N(\text{alquil})C(=O)(R^{\#})$,
5 en donde cada alquilo y $R^{\#}$ son independientemente como se definen anteriormente.

[0057] Un grupo "O(alquil)aminocarbonilo" es un radical de la fórmula: $-O(\text{alquil})C(=O)N(R^{\#})_2$, $-O(\text{alquil})C(=O)NH(R^{\#})$ u $-O(\text{alquil})C(=O)NH_2$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se definió anteriormente.

[0058] Un grupo "N-óxido" es un radical de la fórmula: $-N^+-O^-$.

10 **[0059]** Un grupo "carboxi" es un radical de la fórmula: $C(=O)OH$.

[0060] Un grupo "cetona" es un radical de la fórmula: $C(=O)(R^{\#})$, en donde $R^{\#}$ es como se definió anteriormente.

[0061] Un grupo "aldehído" es un radical de la fórmula: $-CH(=O)$.

[0062] Un grupo "éster" es un radical de la fórmula: $C(=O)O(R^{\#})$ u $OC(=O)(R^{\#})$, en donde $R^{\#}$
15 es como se definió anteriormente.

[0063] Un grupo "urea" es un radical de la fórmula: $-N(\text{alquil})C(=O)N(R^{\#})_2$, $-N(\text{alquil})C(=O)NH(R^{\#})$, $-N(\text{alquil})C(=O)NH_2$, $-NHC(=O)N(R^{\#})_2$, $-NHC(=O)NH(R^{\#})$ o $NHC(=O)NH_2$, en donde cada alquilo y $R^{\#}$ son independientemente como se define anteriormente.

[0064] Un grupo "imina" es un radical de la fórmula: $-N=C(R^{\#})_2$ o $-C(R^{\#})=N(R^{\#})$, en donde
20 cada $R^{\#}$ es independientemente como se define anteriormente.

[0065] Un grupo "imida" es un radical de la fórmula: $-C(=O)N(R^{\#})C(=O)(R^{\#})$ o $N((C=O)(R^{\#}))_2$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se define anteriormente.

[0066] Un grupo "uretano" es un radical de la fórmula: $-OC(=O)N(R^{\#})_2$, $-OC(=O)NH(R^{\#})$, $-N(R^{\#})C(=O)O(R^{\#})$ o $-NHC(=O)O(R^{\#})$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se definió
25 anteriormente.

[0067] Un grupo "amidina" es un radical de la fórmula: $-C(=N(R^{\#}))N(R^{\#})_2$, $-C(=N(R^{\#}))NH(R^{\#})$, $-C(=N(R^{\#}))NH_2$, $-C(=NH)N(R^{\#})_2$, $-C(=NH)NH(R^{\#})$, $-C(=NH)NH_2$, $-N=C(R^{\#})N(R^{\#})_2$, $-N=C(R^{\#})NH(R^{\#})$, $-N=C(R^{\#})NH_2$, $-N(R^{\#})C(R^{\#})=N(R^{\#})$, $-NHC(R^{\#})=N(R^{\#})$, $-N(R^{\#})C(R^{\#})=NH$, o $-NHC(R^{\#})=NH$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se definió anteriormente.

30 **[0068]** Un grupo "guanidina" es un radical de la fórmula: $-N(R^{\#})C(=N(R^{\#}))N(R^{\#})_2$, $-NHC(=N(R^{\#}))N(R^{\#})_2$, $-N(R^{\#})C(=NH)N(R^{\#})_2$, $-N(R^{\#})C(=N(R^{\#}))NH(R^{\#})$, $-N(R^{\#})C(=N(R^{\#}))NH_2$, $-NHC(=NH)N(R^{\#})_2$, $-NHC(=N(R^{\#}))NH(R^{\#})$, $-NHC(=N(R^{\#}))NH_2$, $-NHC(=NH)NH(R^{\#})$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-N=C(N(R^{\#})_2)_2$, $-N=C(NH(R^{\#}))_2$ o $-N=C(NH_2)_2$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se

definió anteriormente.

[0069] Un grupo "enamina" es un radical de la fórmula: $-N(R^{\#})C(R^{\#})=C(R^{\#})_2$, $-NHC(R^{\#})=C(R^{\#})_2$, $-C(N(R^{\#})_2)=C(R^{\#})_2$, $-C(NH(R^{\#}))=C(R^{\#})_2$, $-C(NH_2)=C(R^{\#})_2$, $-C(R^{\#})=C(R^{\#})(N(R^{\#})_2)$, $C(R^{\#})=C(R^{\#})(NH(R^{\#}))$ o $-C(R^{\#})=C(R^{\#})(NH_2)$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se

5 definió anteriormente.

[0070] Un grupo "oxima" es un radical de la fórmula: $-C(=NO(R^{\#}))(R^{\#})$, $-C(=NOH)(R^{\#})$, $-CH(=NO(R^{\#}))$ o $-CH(=NOH)$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se definió anteriormente.

[0071] Un grupo "hidrazida" es un radical de la fórmula: $-C(=O)N(R^{\#})N(R^{\#})_2$, $-C(=O)NHN(R^{\#})_2$, $-C(=O)N(R^{\#})NH(R^{\#})$, $-C(=O)N(R^{\#})NH_2$, $-C(=O)NHNH(R^{\#})_2$ o $-C(=O)NHNH_2$, en donde cada $R^{\#}$ es independiente como se definió anteriormente.

[0072] Un grupo "hidrazina" es un radical de la fórmula: $-N(R^{\#})N(R^{\#})_2$, $-NHN(R^{\#})_2$, $-N(R^{\#})NH(R^{\#})$, $-N(R^{\#})NH_2$, $-NHNH(R^{\#})_2$ o $-NHNH_2$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se definió anteriormente.

[0073] Un grupo "hidrazona" es un radical de la fórmula: $-C(=N-N(R^{\#})_2)(R^{\#})_2$, $-C(=NNH(R^{\#}))(R^{\#})_2$, $-C(=N-NH_2)(R^{\#})_2$, $-N(R^{\#})(N=C(R^{\#})_2)$ o $-NH(N=C(R^{\#})_2)$, en donde cada $R^{\#}$ es independientemente como se definió anteriormente.

[0074] Un grupo "azida" es un radical de la fórmula: $-N_3$.

[0075] Un grupo "isocianato" es un radical de la fórmula: $N=C=O$.

[0076] Un grupo "isotiocianato" es un radical de la fórmula: $N=C=S$.

[0077] Un grupo "cianato" es un radical de la fórmula: OCN .

[0078] Un grupo "tiocianato" es un radical de la fórmula: SCN .

[0079] Un grupo "tioéter" es un radical de la fórmula: $-S(R^{\#})$, en donde $R^{\#}$ es como se definió anteriormente.

[0080] Un grupo "tiocarbonilo" es un radical de la fórmula: $-C(=S)(R^{\#})$, en donde $R^{\#}$ es como se definió anteriormente.

[0081] Un grupo "sulfinilo" es un radical de la fórmula: $-S(=O)(R^{\#})$, en donde $R^{\#}$ es como se definió anteriormente.

[0082] Un grupo "sulfona" es un radical de la fórmula: $-S(=O)_2(R^{\#})$, en donde $R^{\#}$ es como se definió anteriormente.

[0083] Un grupo "sulfonilamino" es un radical de la fórmula: $-NH SO_2(R^{\#})$ o $-N(\text{alquilo})SO_2(R^{\#})$, en donde cada alquilo y $R^{\#}$ se definen anteriormente.

[0084] Un grupo "sulfonamida" es un radical de la fórmula: $-S(=O)_2N(R^{\#})_2$ o $-S(=O)_2NH(R^{\#})$ o

$-S(=O)_2NH_2$, en donde cada $R^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

[0085] Un grupo "fosfonato" es un radical de la fórmula: $-P(=O)(O(R^\#))_2$, $-P(=O)(OH)_2$, $-OP(=O)(O(R^\#))(R^\#)$ u $-OP(=O)(OH)(R^\#)$, en donde cada $R^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

5 **[0086]** Un grupo "fosfina" es un radical de la fórmula: $-P(R^\#)_2$, en donde cada $R^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

[0087] Cuando se dice que los grupos descritos en el presente documento, con excepción del grupo alquilo, están "sustituidos", pueden estar sustituidos con cualquier sustituyente o sustituyentes apropiados. Ejemplos ilustrativos de sustituyentes son los que se encuentran en los

10 ejemplos de compuestos y modalidades que se describen en el presente documento, así como halógeno (cloro, yodo, bromo o flúor); alquilo; hidroxilo; alcoxi; alcoxialquilo; amino; alquilamino; carboxi; nitro; ciano; tiol; tioéter; imina; imida; amidina; guanidina; enamina; aminocarbonilo; acilamino; fosfonato; fosfina; tiocarbonilo; sulfinilo; sulfona; sulfonamida; cetona; aldehído; éster; urea; uretano; oxima; hidroxilamina; alcoxiamina; aralcoxiamina; N-óxido; hidracina; hidrazida;

15 hidrazona; azida; isocianato; isotiocianato; cianato; tiocianato; oxígeno ($=O$); $B(OH)_2$, $O(\text{alquil})\text{aminocarbonilo}$; cicloalquilo, que puede ser monocíclico o policíclico fusionado o no fusionado (por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo), o un heterociclilo, que puede ser monocíclico o policíclico fusionado o no fusionado (por ejemplo, pirrolidilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo o tiazinilo); arilo o heteroarilo monocíclico o policíclico fusionado o no

20 fusionado (por ejemplo, fenilo, naftilo, pirrolilo, indolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, piridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, acridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidinilo, bencimidazolilo, benzotiofenilo o benzofuranil) ariloxi; aralquiloxi; heterocicliloxi; y heterociclilalcoxi.

[0088] Como se usa en el presente documento, el término "sal o sales farmacéuticamente

25 aceptables" se refiere a una sal preparada a partir de un ácido o base no tóxico farmacéuticamente aceptable que incluye un ácido y base inorgánicos y un ácido y base orgánicos.

[0089] Como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término "solvato" significa un compuesto, o una sal de este, que incluye además una cantidad

30 estequiométrica o no estequiométrica de un disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. En una modalidad, el solvato es un hidrato.

[0090] Como se usa en el presente documento, y a menos que se indique lo contrario, el término "hidrato" significa un compuesto, o una sal de este, que también incluye una cantidad

estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

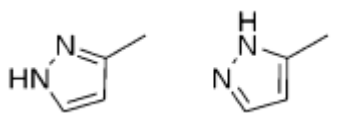
[0091] Como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término "profármaco" significa un derivado de compuesto que puede hidrolizarse, oxidarse o reaccionar de otro modo en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar un compuesto activo, particularmente un compuesto. Los ejemplos de profármacos incluyen, entre otros, derivados y metabolitos de un compuesto que incluyen restos biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables y análogos de fosfato biohidrolizables. En ciertas modalidades, los profármacos de compuestos con grupos funcionales carboxilo son los ésteres de alquilo de cadena corta del ácido carboxílico. Los ésteres de carboxilato se forman convenientemente esterificando cualquiera de los restos de ácido carboxílico presentes en la molécula. Los profármacos normalmente se pueden preparar mediante métodos conocidos, como los descritos por *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* 6.^a ed. (Donald J. Abraham *ed.*, 2001, Wiley) y *Design and Application of Prodrugs* (H. Bundgaard *ed.*, 1985, Harwood Academic Publishers Gmhf).

[0092] Como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término "estereoisómero" o "estereoisómero puro" significa un estereoisómero de un compuesto que está sustancialmente libre de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por ejemplo, una composición estereoméricamente pura con un centro quiral se encontrará sustancialmente libre del enantiómero opuesto del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro con dos centros quirales se encontrará sustancialmente libre de los otros diastereómeros del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro típico comprende más de alrededor del 80 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de alrededor del 20 % en peso de otros estereoisómeros del compuesto, más de alrededor del 90 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de alrededor del 10 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, más de alrededor del 95 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de alrededor del 5 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o más de alrededor del 97 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de alrededor del 3 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto. Los compuestos pueden tener centros quirales y pueden presentarse como racematos, enantiómeros o diastereómeros individuales y mezclas de estos. Todas estas formas isoméricas están incluidas en las modalidades descritas en el presente documento, incluidas sus mezclas. El uso de formas estereoméricamente puras de dichos compuestos, así como el uso de mezclas de esas formas, están abarcados por las modalidades

descritas en el presente documento. Por ejemplo, en los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar mezclas que comprenden cantidades iguales o desiguales de los enantiómeros de un compuesto particular. Estos isómeros pueden sintetizarse o resolverse asimétricamente mediante el uso de técnicas estándar como columnas quirales o agentes de resolución quirales. Veáse, por ejemplo, Jacques, J., et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (WileyInterscience, Nueva York, 1981); Wilen, S. H., et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGrawHill, NY, 1962); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

- 10 **[0093]** También cabe señalar que los compuestos pueden incluir isómeros E y Z, o una mezcla de estos, e isómeros en cis y trans o una mezcla de estos. En ciertas modalidades, los compuestos se aíslan como isómero en cis o trans. En otras modalidades, los compuestos son una mezcla de los isómeros en cis y trans.

- 15 **[0094]** “Tautómeros” hace referencia a formas isoméricas de un compuesto que están en equilibrio entre sí. Las concentraciones de las formas isoméricas dependerán del entorno en el que se encuentre el compuesto y pueden diferir dependiendo, por ejemplo, de si el compuesto es un sólido o se encuentra en una solución orgánica o acuosa. Por ejemplo, en solución acuosa, los pirazoles pueden presentar las siguientes formas isoméricas, que se indican como tautómeros entre sí:



- [0095]** Como comprenderá fácilmente un experto en la técnica, una amplia variedad de grupos funcionales y otras estructuras pueden presentar tautomerismo y todos los tautómeros de los compuestos están dentro del alcance de la presente invención.

- 25 **[0096]** También cabe señalar que los compuestos pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más átomos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I), azufre-35 (^{35}S), o carbono-14 (^{14}C), o pueden estar enriquecido isotópicamente, como con deuterio (^2H), carbono-13 (^{13}C) o nitrógeno-15 (^{15}N). Como se usa en el presente documento, un “isotópologo” es un compuesto enriquecido isotópicamente. La expresión “enriquecido de forma isotópica” hace
30 referencia a un átomo con una composición isotópica diferente a la composición isotópica natural de ese átomo. “Enriquecido de forma isotópica” también puede hacer referencia a un compuesto

con al menos una posición atómica que tiene una composición isotópica diferente a la composición isotópica natural de ese átomo. La expresión “composición isotópica” hace referencia a la cantidad de cada isótopo presente para un átomo específico. Los compuestos radiomarcados y enriquecidos de forma isotópica son útiles como agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes terapéuticos contra cáncer e inflamación, reactivos de investigación, por ejemplo, reactivos de ensayos de unión y agentes de diagnóstico, por ejemplo, agentes de imagenología in vivo. Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos, como se describen en el presente documento, ya sean radioactivas o no, se encuentren comprendidas dentro del alcance de las modalidades que se proporcionan en el presente documento. En algunas modalidades, se proporcionan isotopólogos de los compuestos, por ejemplo, los isotopólogos son compuestos enriquecidos en deuterio, carbono 13 o nitrógeno 15.

[0097] Cabe señalar que si existe una discrepancia entre una estructura representada y un nombre para esa estructura, se entenderá que la estructura representada tendrá mayor peso.

[0098] El término “cantidad eficaz” en relación con un compuesto significa una cantidad capaz de aliviar, total o parcialmente, los síntomas, o de retardar o detener además la progresión o el empeoramiento de esos síntomas. Como será evidente para los expertos en la técnica, es de esperar que la cantidad eficaz de un compuesto descrito en el presente documento pueda variar dependiendo de la gravedad de la indicación que se esté tratando.

[0099] Como se usa en el presente documento, “alquinilo” se refiere a un resto radical de hidrocarburo monovalente que contiene al menos dos átomos de carbono y uno o más enlaces triples carbono-carbono. El alquinilo está opcionalmente sustituido y puede ser lineal, ramificado o cíclico. El alquinilo incluye, de modo no taxativo, aquellos radicales que tienen 2-20 átomos de carbono, es decir, alquinilo C_{2-20} ; 2-12 átomos de carbono, es decir, alquinilo C_{2-12} ; 2-8 átomos de carbono, es decir, alquinilo C_{2-8} ; 2-6 átomos de carbono, es decir, alquinilo C_{2-6} ; y 2-4 átomos de carbono, es decir, alquinilo C_{2-4} . Los ejemplos de restos alquinilo incluyen, de modo no taxativo, etinilo, propinilo y butinilo.

[0100] Como se usa en el presente documento, “haloalquilo” se refiere a alquilo, como se definió anteriormente, en donde el alquilo incluye al menos un sustituyente seleccionado entre un halógeno, por ejemplo, flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I). Los ejemplos de haloalquilo incluyen, de modo no taxativo, $-CF_3$, $-CH_2CF_3$, $-CCl_2F$ y $-CCl_3$.

[0101] Como se usa en el presente documento, “haloalcoxi” se refiere a alcoxi, como se definió anteriormente, en donde el alcoxi incluye al menos un sustituyente seleccionado de un halógeno, por ejemplo, F, Cl, Br, o I.

[0102] Como se usa en el presente documento, "arilalquilo" se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto alquilo, en donde el compuesto alquilo está sustituido con un sustituyente aromático, es decir, el compuesto aromático incluye un enlace simple a un grupo alquilo y en donde el radical es localizado en el grupo alquilo. Un grupo arilalquilo se une a la estructura química ilustrada a través del grupo alquilo. Un arilalquilo puede estar representado por la estructura, por ejemplo, B-CH₂-, B-CH₂-CH₂-, B-CH₂-CH₂-CH₂-, B-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, B-CH(CH₃)-CH₂-CH₂-, B-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, en donde B es un resto aromático, por ejemplo, fenilo. El arilalquilo está opcionalmente sustituido, es decir, el grupo arilo y/o el grupo alquilo pueden estar sustituidos como se describe en el presente documento. Los ejemplos de arilalquilo incluyen, de modo no taxativo, bencilo.

[0103] Como se usa en el presente documento, "alquilarilo" se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto arilo, en donde el compuesto arilo está sustituido con un sustituyente alquilo, es decir, el compuesto arilo incluye un enlace simple a un grupo alquilo y en donde el radical es localizado en el grupo arilo. Un grupo alquilarilo se une a la estructura química ilustrada a través del grupo arilo. Un alquilarilo se puede representar mediante la estructura, por ejemplo, -B-CH₃, -B-CH₂-CH₃, -B-CH₂-CH₂-CH₃, -B-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃, -B-CH(CH₃)-CH₂-CH₃, -B-CH₂-CH(CH₃)-CH₃, en donde B es un resto aromático, por ejemplo, fenilo. El alquilarilo está opcionalmente sustituido, es decir, el grupo arilo y/o el grupo alquilo pueden estar sustituidos como se describe en el presente documento. Los ejemplos de alquilarilo incluyen, de modo no taxativo, toluilo.

[0104] Como se usa en el presente documento, "ariloxi" se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos del anillo son átomos de carbono y en donde el anillo está sustituido con un radical oxígeno, es decir, el compuesto aromático incluye un enlace simple a un átomo de oxígeno y en donde el radical está localizado en el átomo de oxígeno, por ejemplo, C₆H₅-O-, para fenoxi. Los sustituyentes ariloxi se unen al compuesto que sustituyen a través de este átomo de oxígeno. El ariloxi está opcionalmente sustituido. Ariloxi incluye, pero no se limita a, aquellos radicales que tienen de 6 a 20 átomos de carbono en el anillo, es decir, ariloxi C₆₋₂₀; de 6 a 15 átomos de carbono en el anillo, es decir, ariloxi C₆₋₁₅, y de 6 a 10 átomos de carbono en el anillo, es decir, ariloxi C₆₋₁₀. Los ejemplos de restos ariloxi incluyen, entre otros, fenoxi, naftoxi y antroxí.

[0105] Como se usa en el presente documento, el término "residuo" se refiere al resto químico dentro de un compuesto que queda después de una reacción química. Por ejemplo, el término "residuo aminoácido" o "residuo de N-alquilaminoácido" se refiere al producto de un acoplamiento

de amida o de un acoplamiento de péptido de un aminoácido o un N-alquilaminoácido a un compañero de acoplamiento adecuado; en donde, por ejemplo, se expulsa una molécula de agua después del acoplamiento amida o peptídico del aminoácido o del N-alquilaminoácido, lo que da como resultado el producto que tiene el residuo de aminoácido o el residuo de N-alquilaminoácido incorporado en este.

[0106] Como se usa en el presente documento, "azúcar" o "grupo de azúcar" o "residuo de azúcar" se refiere a un resto de carbohidrato que puede comprender unidades (tosa) de 3 carbonos, unidades (tetrosa) de 4 carbonos, unidades (pentosas) de 5 carbonos, unidades (hexosa) de 6 carbonos, unidades (heptosa) de 7 carbonos, o combinaciones de estas, y puede ser un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un tetrasacárido, un pentasacárido, un oligosacárido o cualquier otro polisacárido. En algunos casos, un "azúcar" o "grupo de azúcar" o "residuo de azúcar" comprende furanosas (por ejemplo, ribofuranosa, fructofuranosa) o piranosas (por ejemplo, glucopiranosas, galactopiranosas), o una combinación de estas. En algunos casos, un "azúcar" o "grupo de azúcar" o "residuo de azúcar" comprende aldosas o cetosas, o una combinación de estas. Los ejemplos no taxativos de monosacáridos incluyen ribosa, desoxirribosa, xilosa, arabinosa, glucosa, manosa, galactosa y fructosa. Ejemplos no limitantes de disacáridos incluyen sacarosa, maltosa, lactosa, lactulosa y trehalosa. Otros "azúcares", "grupos de azúcar" o "residuos de azúcar" incluyen polisacáridos y/u oligosacáridos, incluidos, entre otros, amilosa, amilopectina, glucógeno, inulina y celulosa. En algunos casos, un "azúcar", "grupo de azúcar" o "residuo de azúcar" es un aminoazúcar. En algunos casos, un "azúcar" o "grupo de azúcar" o "residuo de azúcar" es un residuo de glucamina (1-amino-1-deoxi-D-glucitol) enlazado al resto de la molécula a través de su grupo amino para formar un enlace de amida con el resto de la molécula (es decir, una glucamida).

[0107] Como se usa en el presente documento, "agente aglutinante" se refiere a cualquier molécula, por ejemplo, anticuerpo, capaz de unirse con especificidad a un compañero de unión dado, por ejemplo, antígeno.

[0108] Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a un compuesto orgánico que contiene grupos funcionales amina (—NH_2) y carboxilo (—COOH), junto con una cadena lateral (grupo R), que es específica de cada aminoácido. Los aminoácidos pueden ser proteinogénicos o no proteinogénicos. Por "proteinogénico" se entiende que el aminoácido es uno de los veinte aminoácidos naturales que se encuentran en las proteínas. Los aminoácidos proteinógenos incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina,

prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Por "no proteinógeno" se entiende que el aminoácido no se encuentra naturalmente en la proteína o no es producido directamente por la maquinaria celular (por ejemplo, es el producto de una modificación postraducciona). Ejemplos no limitantes de aminoácidos no proteinógenos incluyen ácido gamma-aminobutírico (GABA), taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico), teanina (L-γ-glutamiletilamida), hidroxiprolina, beta-alanina, ornitina y citrulina.

[0109] Como se usa en el presente documento, "péptido", en sus diversas formas gramaticales, se define en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos u otros peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas mediante enlaces peptídicos o mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter y similares. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales, proteinógenos o no proteinógenos, o sintéticos, lo que incluye glicina y los isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Si la cadena peptídica es corta, por ejemplo, dos, tres o más aminoácidos, comúnmente se denomina oligopéptido. Si la cadena peptídica es más larga, el péptido normalmente se denomina polipéptido o proteína. La definición abarca proteínas de longitud completa, análogos, mutantes y fragmentos de estos. Los términos también incluyen modificaciones postexpresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, como en la molécula están presentes grupos amino y carboxilo ionizables, se puede obtener un péptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Un péptido puede obtenerse directamente del organismo fuente o puede producirse de forma recombinante o sintética.

[0110] La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se puede numerar usando cualquier esquema de numeración conocido, incluidos los descritos por Kabat et al., (esquema de numeración Kabat); Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948 (esquema de numeración Chothia); MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745 (esquema de numeración Contacto); Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77 (esquema de numeración "IMGT"); y Honegager y Pluckthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70 (esquema de numeración "AHO"). A menos que se especifique lo contrario, el esquema de numeración usado en el presente documento es el esquema de numeración de Kabat. Sin embargo, no se pretende que la selección de un esquema de numeración implique diferencias en secuencias cuando no las hay, y un experto en la técnica puede confirmar fácilmente la posición de una secuencia examinando la secuencia de aminoácidos de uno o más anticuerpos. A menos que se indique lo contrario, el "esquema de

numeración de la UE" se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de un anticuerpo (por ejemplo, como se informa en Kabat et al., supra).

[0111] Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-HER2" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor HER2, por ejemplo, trastuzumab. En una modalidad, el trastuzumab se puede preparar y usar como se describe en US6407213 y US5821337, cuya descripción completa se incorpora en el presente documento por referencia.

[0112] Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-HER3" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor HER3, por ejemplo, patritumab. En una modalidad, patritumab se puede preparar y usar como se describe en US7705130, cuya descripción completa se incorpora en el presente documento por referencia.

[0113] Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-PTK7" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor PTK7, por ejemplo, cofetuzumab. En una modalidad, cofetuzumab se puede preparar y usar como se describe en US9777070, cuya descripción completa se incorpora en el presente documento por referencia.

[0114] Como se usa en el presente documento, el término "lfinatamab" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor B7H3. En una modalidad, lfinatamab se puede preparar y usar como se describe en US10117952 o WO2022102695, cuya descripción completa se incorpora en el presente documento por referencia.

[0115] Los términos "cáncer" y "canceroso" describen o hacen referencia a la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma broncopulmonar no microcítico (NSCLC), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, carcinoma uterino o de endometrio, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de vías respiratorias y digestivas altas.

[0116] Como se usa en el presente documento, el término "actividad destructora de células" se refiere a la actividad que disminuye o reduce la viabilidad celular de la estirpe celular analizada.

[0117] En las reivindicaciones que siguen y en la descripción anterior de la invención, excepto cuando el contexto requiera lo contrario debido al lenguaje expreso o implicación necesaria, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se usa en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas pero no excluir la presencia o adición de características adicionales en diversas modalidades de la invención.

[0118] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente les atribuye un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si bien se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o analizar la presente invención, a continuación se describen métodos, materiales y dispositivos preferidos.

5.2. Conjugados

[0119] En algunos otros ejemplos, se expone en el presente documento un ADC, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que comprende: una proteína unida a al menos un resto de carga activa y unida a al menos un resto hidrófilo mediante un conector covalente, en donde dicho conector covalente está unido directa o indirectamente a cada una de la proteína, el resto de carga activa y el resto hidrófilo. En algunas modalidades, la proteína es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.

[0120] Como se ilustra en el presente documento, en algunos ejemplos, el agente aglutinante está unido directamente a un conector covalente, tal como un conector expuesto en el presente documento. Esto significa que el agente aglutinante está a una posición de enlace de distancia del conector covalente establecido en el presente documento. En algunos de estos ejemplos, el conector covalente también está unido directamente a un resto de carga activa. Esto significa que el conector covalente está a una posición de enlace de una carga activa tal como, entre otras, Dxd, MMAE o un estereoisómero de estos, o cualquier carga activa establecida en el presente documento. En algunos de estos ejemplos, el conector covalente también se enlaza directamente a un resto hidrófilo. Esto significa que el conector covalente está a una posición de enlace de distancia de un residuo hidrófilo, tal como los residuos hidrófilos expuestos en el presente documento. En algunos de estos ejemplos, el conector covalente es un conector covalente establecido en el presente documento.

[0121] En otros ejemplos, el agente aglutinante está unido indirectamente a un conector covalente. Esto significa que el agente aglutinante está a más de una posición de enlace del conector covalente.

[0122] Esto también significa que el agente aglutinante está unido a través de otro resto al conector covalente. Por ejemplo, el agente aglutinante puede estar unido a un grupo maleimida que está unido a un grupo polietilenglicol que está unido al conector covalente. En algunos de estos ejemplos, el conector covalente también se enlaza directamente a un resto de carga activa. Esto significa que el conector covalente se encuentra a más de una posición de enlace de distancia de una carga activa, tal como, entre otros, Dxd, MMAE, o un estereoisómero de esta, o cualquier carga activa establecida en el presente documento. Esto también significa que el conector covalente se enlaza a través de otro resto a la carga activa. Por ejemplo, el conector covalente puede estar enlazado a un dipéptido, tal como, entre otros, Val-Ala o Val-Cit, que puede estar enlazado a PAB que puede estar enlazado a la carga activa. En algunos de estos ejemplos, el conector covalente también se enlaza indirectamente a un resto hidrófilo. Esto significa que el conector covalente se encuentra a más de una posición de enlace de distancia de un resto hidrófilo, tal como los residuos hidrófilos establecidos en el presente documento. Esto también significa que el conector covalente está enlazado a través de otro resto al resto hidrófilo.

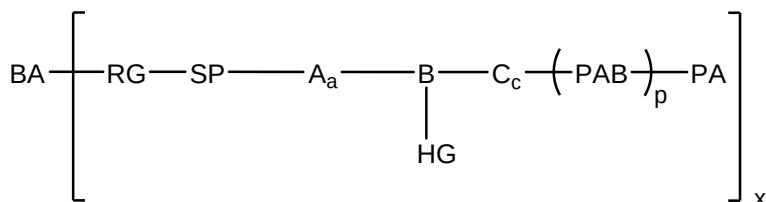
[0123] En ciertos casos, el residuo hidrófilo comprende un grupo hidrófilo terminal. En algunos casos, el residuo hidrófilo comprende al menos un residuo de azúcar. En algunos casos, el residuo hidrófilo comprende un residuo de azúcar. En algunos casos, el residuo hidrófilo comprende un residuo de azúcar terminal. En casos adicionales, el residuo hidrófilo comprende más de un residuo de azúcar. En algunos casos, el residuo hidrófilo comprende más de un residuo de azúcar terminal.

[0124] En otra modalidad, la carga activa proporcionada en el presente documento es un grupo funcional cromóforo, para el cual el compuesto proporcionado en el presente documento se puede usar para detectar, monitorear o estudiar la interacción de la molécula de unión celular con una célula diana. Los grupos funcionales cromóforos son grupos funcionales que tienen la capacidad de absorber un tipo de luz, tal como luz ultravioleta, luz fluorescente, luz infrarroja, luz infrarroja cercana, luz visual. Un grupo funcional cromatóforo es un grupo funcional seleccionado de una clase o subclase de xantóforos, eritróforos, iridóforos, leucóforos, melanóforos y cianóforos; una clase o subclase de moléculas fluoróforas que son compuestos químicos fluorescentes que reemiten luz sobre luz; una clase o subclase de moléculas de fototransducción visual; una clase o subclase de moléculas fotóforas; una clase o subclase de moléculas de

luminiscencia; y una clase o subclase de compuestos de luciferina.

5.2.1. Aspecto 1

[0125] En el presente documento se describen compuestos de acuerdo con la Fórmula (I):



5 (I)

o una sal, tautómero, solvato, estereoisómero, enantiómero, isotopólogo o profármaco farmacéuticamente aceptable de este,

en donde BA es un agente aglutinante seleccionado de un anticuerpo humanizado, quimérico o humano o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo;

10 RG es un residuo de grupo reactivo; SP es un residuo de grupo espaciador; cada uno de A, B y C es independientemente, en cada caso, un residuo de aminoácido; HG es un residuo hidrófilo o hidrógeno; los subíndices a, c y p son independientemente, en cada caso, 0 o 1; PA es un residuo de carga activa; el subíndice x es de 1 a 15; y PAB representa -NH-CH₂-O-.

[0126] En un ejemplo, BA es un anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo anti-HER2 o anti-HER3 humanizado, quimérico o humano o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-HER2 o anti-HER3. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[0127] En un ejemplo, BA es un anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano o un fragmento de unión al antígeno de lfinatamab, cofetuzumab, patritumab o trastuzumab. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano o un fragmento de unión al antígeno de lfinatamab. En un ejemplo, el anticuerpo es lfinatamab, cofetuzumab, patritumab o trastuzumab o un fragmento de unión al antígeno de lfinatamab, cofetuzumab, patritumab o trastuzumab. En un ejemplo, el anticuerpo es lfinatamab o un fragmento de unión al antígeno de lfinatamab.

[0128] En ciertas modalidades, el anticuerpo como se describe en el presente documento se une a uno o más receptores seleccionados del grupo que consiste en: HER2, HER3, CD7, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD30, CD33, CD37, CD38, CD46, CD70, CD71, CD74, CD79b, CD123, CD138, CD142, CD166, CD205, CD228, CCR2, CA6, p-Cadherin, CEA, CEACAM5,

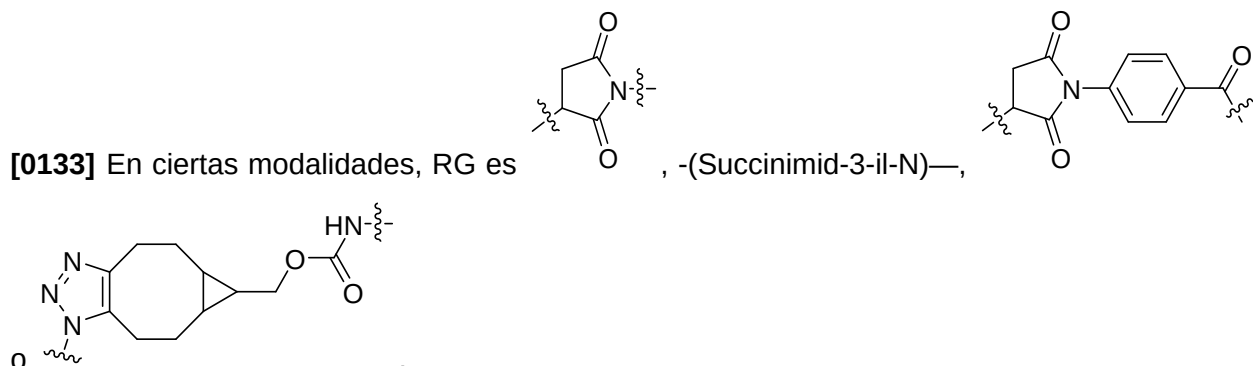
C4.4a, DLL3, EGFR, EGFRVIII, ENPP3, EphA2, EphrinA, FLOR1, FGFR2, GCC, cKIT, LIV1, LY6E, MSLN, MUC16, NaPi2b, Nectin4, gpNMB, PSMA, SLITRK6, STEAP1, TROP2, 5T4, SSEA4, GloboH, Gb5, STn, Tn, B7H3, BCMA, MUC1, cMet, ROR1 MSLN, FRa, CLDN18.2, CLDN6, PTK7 y Axl. En ciertas modalidades, el anticuerpo como se describe en el presente documento se une a uno o más receptores seleccionados del grupo que consiste en: B7H3, MUC1, FGFR2b, CLL1, CCR7, GPC1 y GPC3.

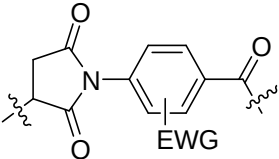
[0129] En ciertas modalidades, el anticuerpo como se describe en el presente documento se une a receptores de CEA. En ciertas modalidades, el anticuerpo como se describe en el presente documento se une a uno o más receptores seleccionados del grupo que consiste en: receptores CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20 y CEACAM21.

[0130] En ciertas modalidades, el anticuerpo como se describe en el presente documento se une a receptores de CEACAM5.

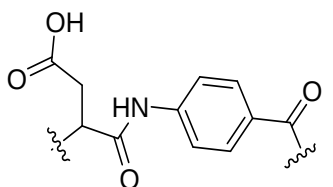
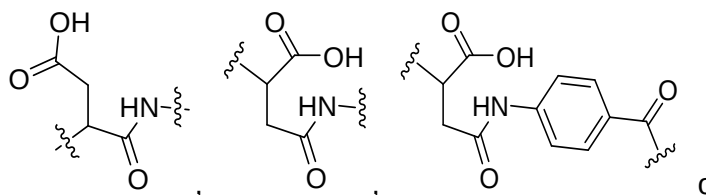
[0131] En ciertas modalidades, el anticuerpo como se describe en el presente documento se une a receptores de CEACAM6.

[0132] En ciertas modalidades, el anticuerpo como se describe en el presente documento es un anticuerpo biespecífico.

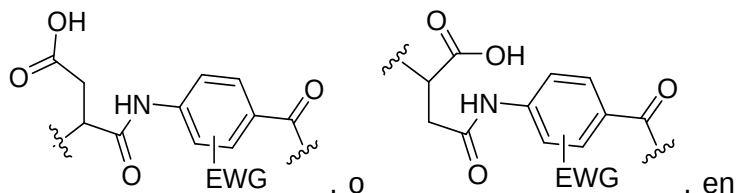


[0134] En ciertas modalidades, RG es , en donde EWG es un grupo electrófilo seleccionado de -CN, halógeno, -CF₃, -C(=O)OR¹ y -C(=O)R¹, y R¹ es alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido.

[0135] En ciertas modalidades, RG es



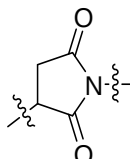
[0136] En ciertas modalidades, RG es



donde EWG es un grupo electrófilo seleccionado de -CN, halógeno, -CF₃, -C(=O)OR¹ y -C(=O)R¹, y R¹ es alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido.

[0137] En ciertas modalidades, SP es -(CH₂)_n-C(=O)-, -CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)_n-C(=O)-, -(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-C(=O)-, -CH[-(CH₂)_n-COOH]-C(=O)-, -CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)_n-C(=O)-NH-(CH₂)_n-C(=O)-, o -C(=O)-(CH₂)_n-C(=O)-, en donde cada uno de n representa independientemente un número entero de 1 a 8.

[0138] En ciertas modalidades, SP es -(CH₂)_n-C(=O)-, o -CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)_n-C(=O)-; y cada uno de n representa independientemente un número entero de 5 o 2.

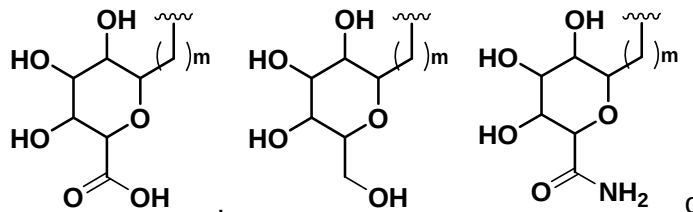


[0139] En ciertas modalidades, RG es ; SP es -(CH₂)_n-C(=O)-; y n es un número entero de 1, 2, 3, 4 o 5; preferentemente n es un número entero de 1 o 2.

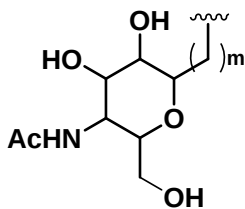
[0140] En ciertas modalidades, HG se selecciona del grupo que consiste en un sacárido, éster de fosfato, éster de sulfato, un fosfodiéster y un fosfonato.

[0141] En ciertas modalidades, el sacárido se selecciona del grupo que consiste en β-D-galactosa, N-acetil-P-D-galactosamina, N-acetil-α-D-galactosamina, N-acetil-P-D-glucosamina, ácido β-D-glucurónico, ácido α-L-idurónico, α-D-galactosa, α-D-glucosa, β-D-glucosa, α-D-

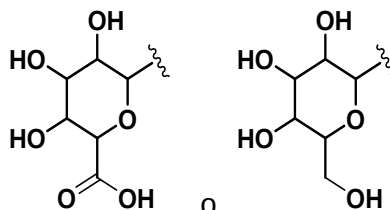
manosa, β -D-manosa, α -L-fucosa, β -D-xilosa, un ácido neuramínico o cualquier análogo o modificación de este, o modificación de sulfato, fosfato, carboxilo, amino u O-acetilo de este; preferentemente β -D-galactosa y ácido b-glucurónico.



[0142] En ciertas modalidades, HG es



5 , o un estereoisómero, enantiómero, isotópologo o profármaco de este, en donde cada m es independientemente 0 o 1.



[0143] En ciertas modalidades, HG es , o un estereoisómero, enantiómero, isotópologo o profármaco de este.

10 [0144] En ciertas modalidades, cada PA representa independientemente un grupo funcional cromóforo.

[0145] En ciertas modalidades, cada grupo funcional cromóforo es independientemente un grupo funcional seleccionado de una clase o subclase de xantóforos, eritróforos, iridóforos, leucóforos, melanóforos y cianóforos; una clase o subclase de moléculas fluoróforas que son compuestos químicos fluorescentes que reemiten luz sobre luz; una clase o subclase de moléculas de fototransducción visual; una clase o subclase de moléculas fotóforas; una clase o subclase de moléculas de luminiscencia; y una clase o subclase de compuestos de luciferina.

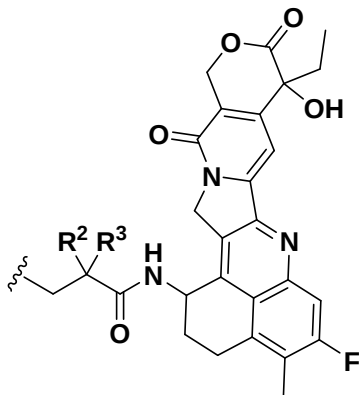
15 [0146] En ciertas modalidades, cada PA es independientemente un agente citotóxico, en donde el agente citotóxico contiene al menos un grupo hidroxilo. Los ejemplos del agente citotóxico incluyen, entre otros, 10-Desacetil-7-xilosil paclitaxel, 17-AAG, 17-AEP-GA, 17-AH-Geldanamicina, 17-DMAP-GA, 17-GMB-APA-GA, 4-metil-Ahtea-Puwainaficina F, 9-Hidroxielipticina, clorhidrato, Actinomicina X2, Aeroplisinina 1, Aeruginosina 865, Agroquelina A, Agroquelina B, alfa-Amanitina, alfa-Amanitina, origen de fermentación fúngica, Ansamitocina P-

3, Ansatrienina B, Afidicolina, Apoptolidina, Auristatina E, Auristatina F, AZD4547, base libre, AZD8055, base libre, Bafilomicina A1, beta-Amanitina, Boc-Nme-Val-Val-Dil-Dap-OH, Boc-Val-Dil-Dap-Doe, Boc-Val-Dil-Dap-OH, Boc-Val-Dil-Dap-Phe-Ome, Caliqueamicina, Campatecina, Quetocina, Quetoglobosina, Quetoglobosina C13, Clamidocina, Cinerubina B, Colchicina, 5 Combretastatina-A4, Compuesto CL0485, Cordicepina, Criptoficina, Cucurbitacina B, Cucurbitacina E, Curvulina, Ciclopamina, base libre, D8-MMAE, Daun02, Daunorrubicina, HCl de Daunorrubicina, clorhidrato de daunorrubicina, DGN462, DL-Ditiotreitol/DTT, DL-Ditiotreitol/DTT, grado biotecnológico, DL-Ditiotreitol/DTT, grado puro, DM1, DM4, Dolastatina 10, Dolastatina 15, DOXO-EMCH, Doxorubicina, clorhidrato de Doxorubicina, Duocarmicina DM, Duocarmicina MA, 10 Duocarmicina TM, Englerina A, Epotilona A, Epotilona B, épsilon-Amanitina, Ferulenol, Fumagilina, gamma-Amanitina, Geldanamicina, Glucopiericidina A, Gramicidina A, Herboxidieno, HL-100-AL1-R01 (H-3137), Higrolidina, Hipotemicina, Ilimaquinona, Isatropolona A, Isofistularina-3, Ixabepilona, base libre, JW 55, Lactacistina, Luisol A, Maitansina DM3, Maitansinoide AP-3, Maitansinol, Mechercharmicina A, Mensacarcina, Metotrexato, Microcolina B, Microcistina LR, 15 MMAD, clorhidrato de MMAD, MMAF, clorhidrato de MMAF, monometilauristatina E, éster de metilo de monometilauristatina F, Muscotoxina A, Mioseverina, Mitoxina B, N-acetil Caliqueamicina g1, Nemorubicina, Nocuolina A, Okilactomicina, Oligomicina B, Paclitaxel, PF-06380101, Falacidina, Faloidina, Fitoesfingosina, Piericidina A, Pironetina, PNU-159682, Podofilotoxina, Policetomicina, Ácido pseudolárico B, Pseurotina A, Puwainaficina F, Dímero de pirrolobenzodiazepina, Quinaldopeptina, Raquelmicina, Rebecamicina, Ro 5-3335, Safracina B, Sandramicina, Sanguinarina, Saporina, Seco-duocarmicina SA, Sinefungina, Taltobulina, clorhidrato de Taltobulina, trifluoroacetato de Taltobulina, Telomestatina, Tiocolchicina, Tolitoxina, Tripolina A, Triptolida, HCl de Tubastatina A, Tubulisina A, Tubulisina IM-1, Tubulisina IM-2, Tubulisina IM-3 y Tubulisina M. En ciertas modalidades, cada PA es un agente citotóxico diseñado 20 para inducir la muerte de la célula diana después de ser internalizado en la célula tumoral y liberado. En ciertas modalidades, cada PA es un agente citotóxico diseñado para inducir la muerte de la célula diana después de ser internalizado en la célula tumoral. En ciertas modalidades, cada PA es un fármaco de micromolécula con alta toxicidad sistémica.

[0147] En ciertas modalidades, cada PA se selecciona independientemente del grupo que 30 consiste en Monometilauristatina E (MMAE), Monometilauristatina F (MMAF), Monometilauristatina D (MMAD), Mertansina (Maitansinoide DM1/DM4), Paclitaxel, Docetaxel, Epotilona B, Epotilona A, CYT997, fosfato de tiramina de Auristatina, aminoquinolina de Auristatina, Halocombstatinas, Caliqueamicina theta, 7-Etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38),

Pirrolobenzodiazepina (PBD), Pancratistatina, Ciclofosfato, Cribrostatina-6, Kitastatina, Turbostatina 1-4, Halocombstatinas, Eribulina, Hemiasterlina, PNU y silstatinas.

[0148] En ciertas modalidades, cada PA representa independientemente la fórmula (VI):



5 (VI),

en donde cada uno de R^2 y R^3 es independientemente hidrógeno, halógeno o alquilo C_{1-4} sustituido o no sustituido.

[0149] En una modalidad, R^2 y R^3 son hidrógeno.

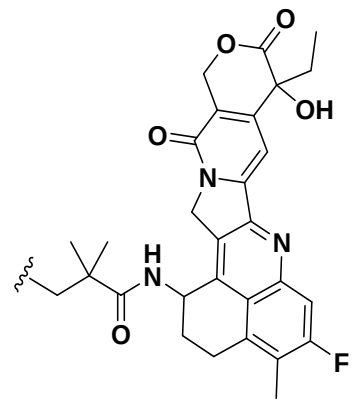
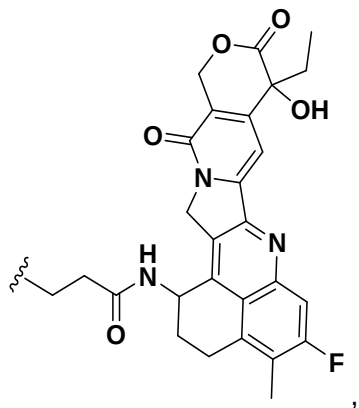
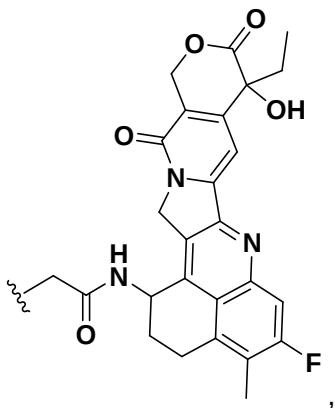
[0150] En una modalidad, R^2 y R^3 son metilo.

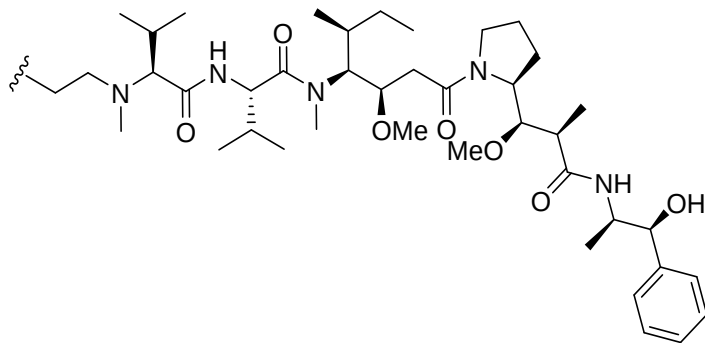
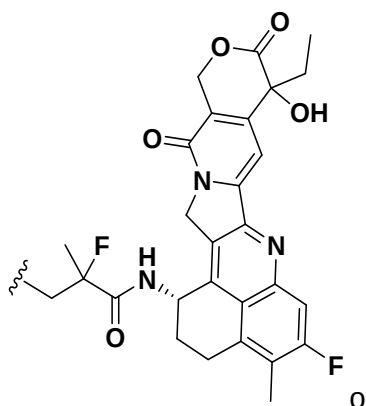
10 **[0151]** En una modalidad, R^2 es metilo y R^3 es F.

[0152] En una modalidad, el carbono al que se conectan R^2 y R^3 está en la configuración S.

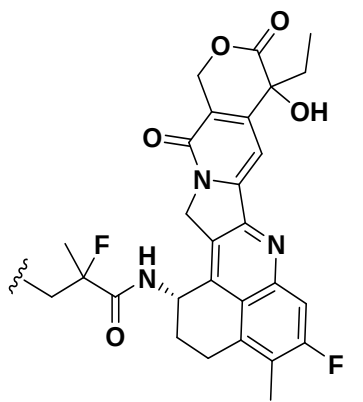
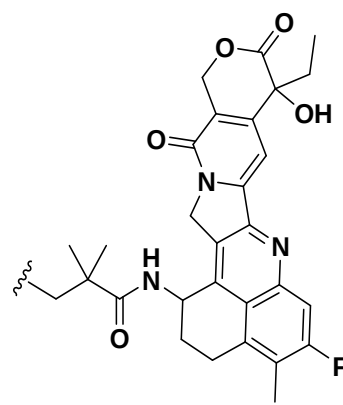
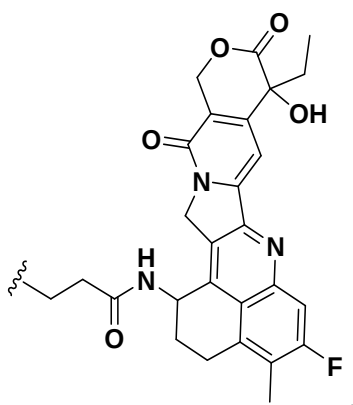
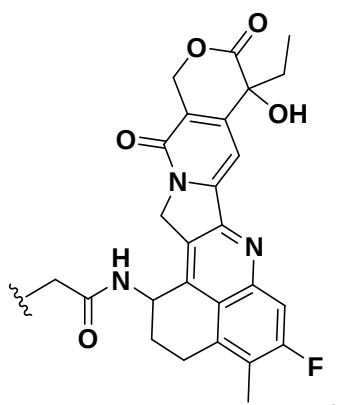
[0153] En una modalidad, el carbono al que se conectan R^2 y R^3 está en la configuración R.

[0154] En ciertas modalidades, cada PA representa independientemente





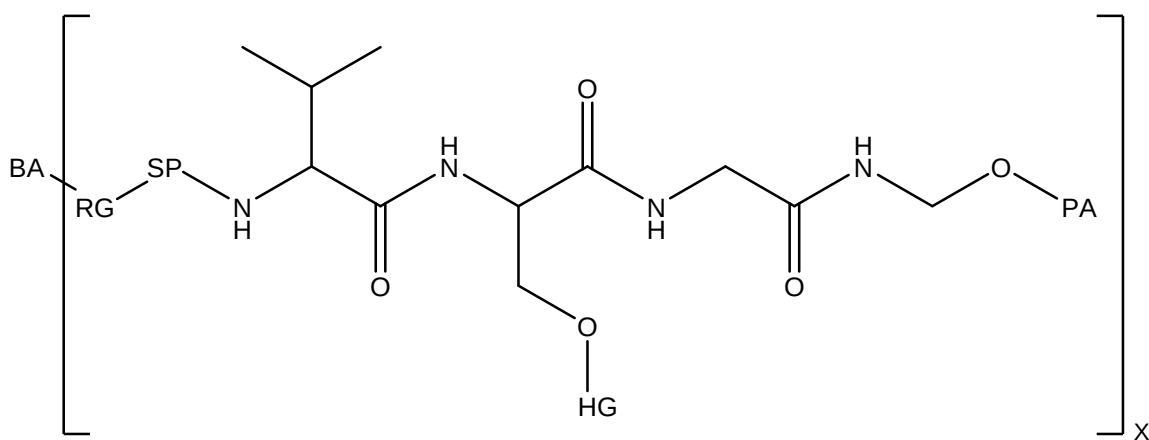
[0155] En ciertas modalidades, cada PA representa independientemente



- 5 [0156] En una modalidad, el subíndice x es de 2 a 12. En una modalidad, el subíndice x es de 4 a 12. En una modalidad, el subíndice x es de 6 a 12. En una modalidad, el subíndice x es de 8 a 12. En una modalidad, el subíndice x es de 9 a 11.

5.2.2. Aspecto 2

[0157] Se describen en el presente documento compuestos de acuerdo con la Fórmula (Ia):



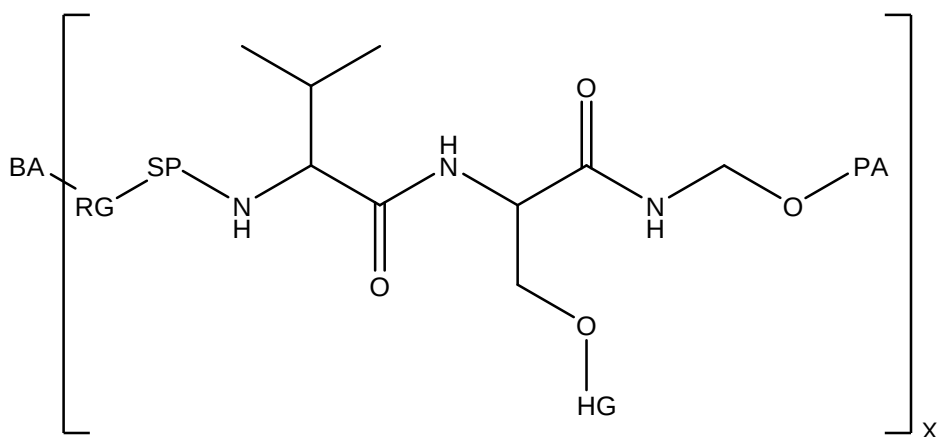
(Ia)

o una sal, tautómero, solvato, estereoisómero, enantiómero, isotópologo o profármaco farmacéuticamente aceptable de este.

- 5 **[0158]** En ciertas modalidades, los BA, RG, SP, HG, PA y x son como se proporcionan en el presente documento.

5.2.3. Aspecto 3

[0159] Se describen en el presente documento compuestos de acuerdo con la Fórmula (Ib):



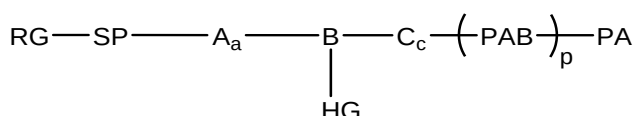
10 (Ib)

o una sal, tautómero, solvato, estereoisómero, enantiómero, isotópologo o profármaco farmacéuticamente aceptable de este.

[0160] En ciertas modalidades, los BA, RG, SP, HG, PA y x son como se proporcionan en el presente documento.

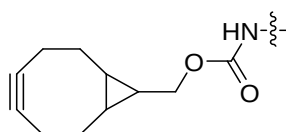
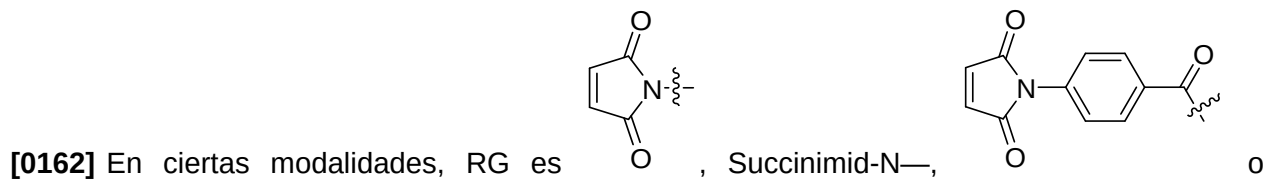
15 5.2.4. Aspecto 4

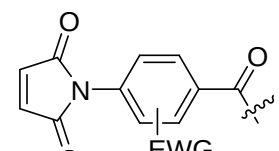
[0161] Se describen en el presente documento compuestos de acuerdo con la Fórmula (II):

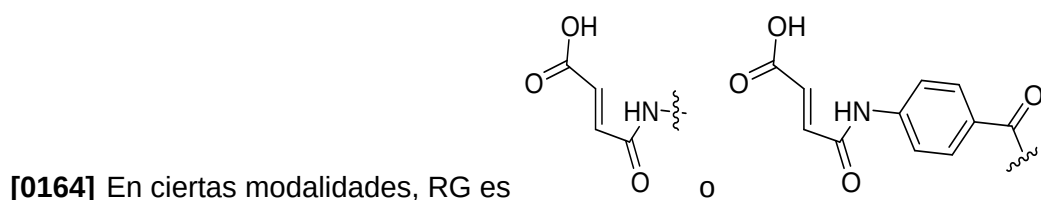


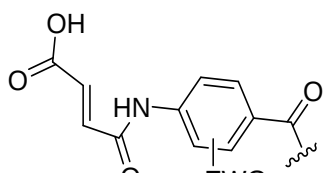
(II)

- 5 o una sal, tautómero, solvato, estereoisómero, enantiómero, isotópologo o profármaco farmacéuticamente aceptable de este.



- 10 [0163] En ciertas modalidades, RG es , en donde EWG es un grupo electróretirado seleccionado del grupo que consiste en -CN, halógeno, -CF₃, -C(=O)OR¹ y -C(=O)R¹, y R¹ es alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido.

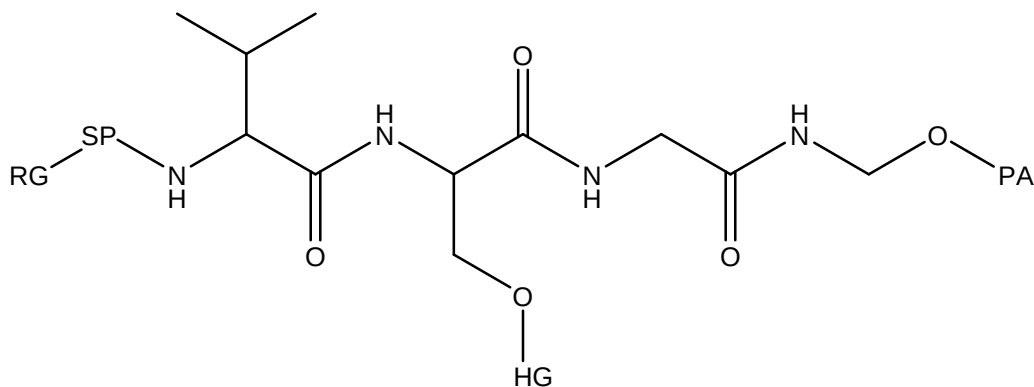


- 15 [0165] En ciertas modalidades, RG es , en donde EWG es un grupo electróretirado seleccionado de -CN, halógeno, -CF₃, -C(=O)OR¹ y -C(=O)R¹, y R¹ es alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido.

[0166] En ciertas modalidades, los SP, A, B, C, HG, PAB, PA, a, c y p son como se proporcionan en el presente documento.

5.2.5. Aspecto 5

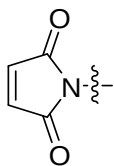
[0167] Se describen en el presente documento compuestos de acuerdo con la Fórmula (IIa):



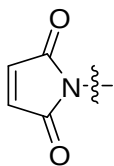
5

(IIa)

o una sal, tautómero, solvato, estereoisómero, enantiómero, isotopólogo o profármaco farmacéuticamente aceptable de este.



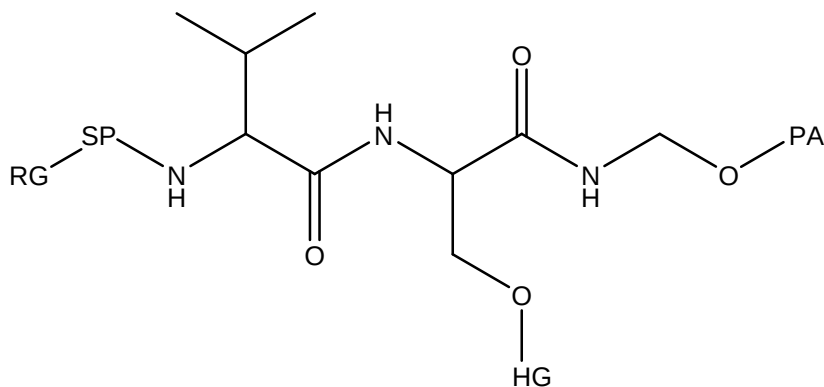
10

[0168] En ciertas modalidades, R_G es ; SP es $-(CH_2)_n-C(=O)-$; y n es un número entero de 1, 2, 3, 4 o 5; preferentemente n es un número entero de 1 o 2.

[0169] En ciertas modalidades, los R_G, SP, HG y PA son como se proporcionan en el presente documento.

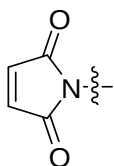
5.2.6. Aspecto 6

[0170] Se describen en el presente documento compuestos de acuerdo con la Fórmula (IIb):



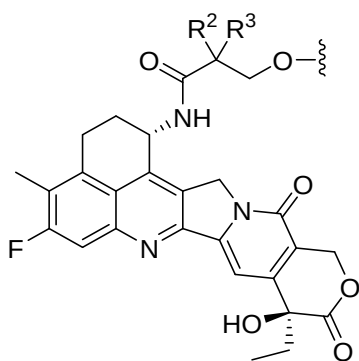
15

(IIb)



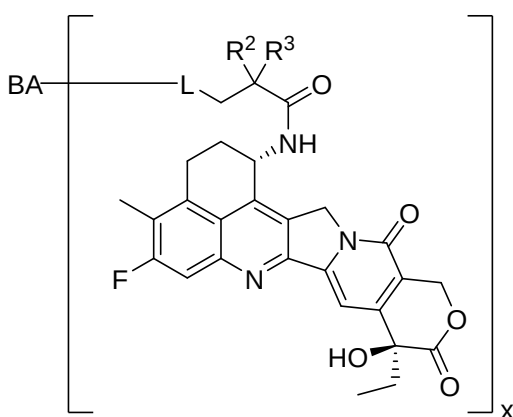
5 **[0172]** En ciertas modalidades, los RG, SP, HG y PA son como se proporcionan en el presente documento.

[0173] Se describe en el presente documento un conjugado de ligando y fármaco o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este, en donde el conjugado de ligando y fármaco comprende una estructura de la fórmula (III):



cada uno de R² y R³ es, independientemente, hidrógeno, halógeno o alquilo.

15 **[0174]** En algunas modalidades, el conjugado de ligando y fármaco comprende una estructura de la fórmula (E2):



(IIIa),

en donde

BA es un agente aglutinante seleccionado de un anticuerpo humanizado, quimérico o humano o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo;

L es un conector covalente como se describe en el presente documento; y

x es como se proporciona en el presente documento.

[0175] En algunas modalidades, el anticuerpo es lfinatamab, patritumab, cofetuzumab o trastuzumab. En una modalidad, el anticuerpo es lfinatamab.

[0176] En una modalidad, R^2 y R^3 son hidrógeno.

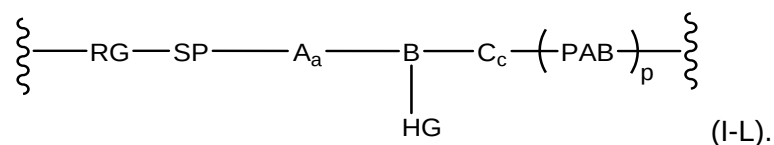
[0177] En una modalidad, R^2 y R^3 son metilo.

[0178] En una modalidad, R^2 es metilo y R^3 es F.

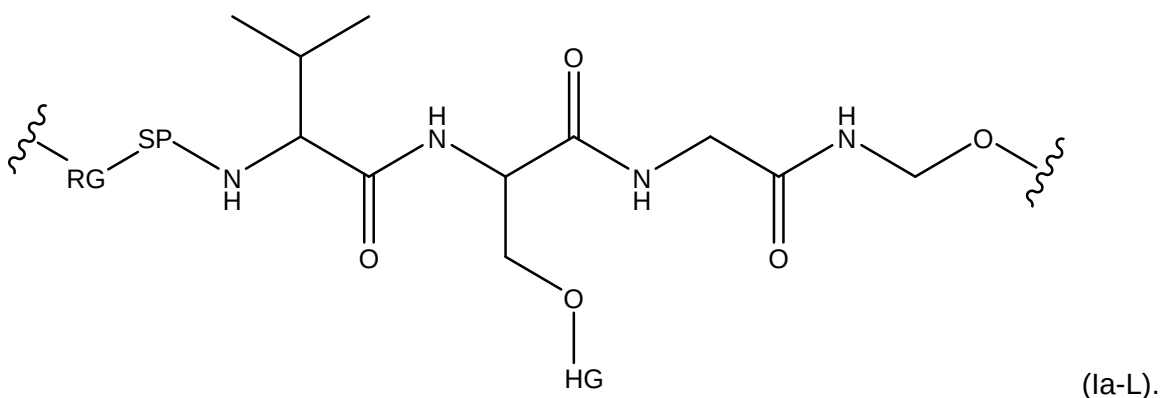
[0179] En una modalidad, el carbono al que se conectan R^2 y R^3 está en la configuración S.

[0180] En una modalidad, el carbono al que se conectan R^2 y R^3 está en la configuración R.

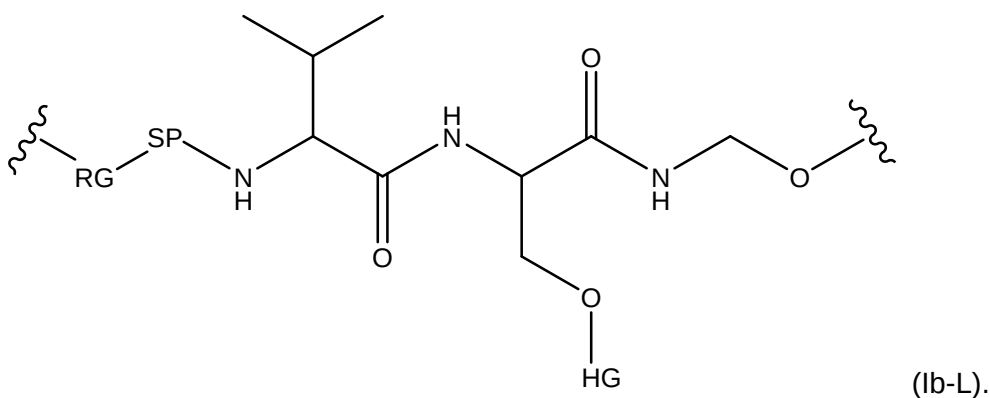
[0181] En una modalidad, el conector covalente, L, tiene la estructura de la Fórmula (I-L):



[0182] En una modalidad, el conector covalente, L, tiene la estructura de la Fórmula (Ia-L):



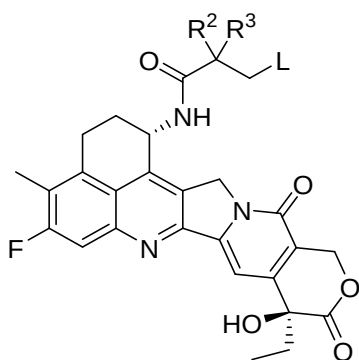
[0183] En una modalidad, el conector covalente, L, tiene la estructura de la Fórmula (Ib-L):



[0184] En ciertas modalidades, los RG, SP, HG, PAB, A, B, C, a, c y p son como se proporcionan en el presente documento.

5.2.8. Aspecto 18

[0185] Se describe en el presente documento un compuesto que tiene la fórmula (IV):



(IV),

- 10 o un solvato, estereoisómero o derivado farmacéuticamente aceptable de este, en donde L es un conector covalente como se describe en el presente documento; cada uno de R^2 y R^3 es, independientemente, hidrógeno, halógeno o alquilo.

[0186] En una modalidad, R^2 y R^3 son hidrógeno.

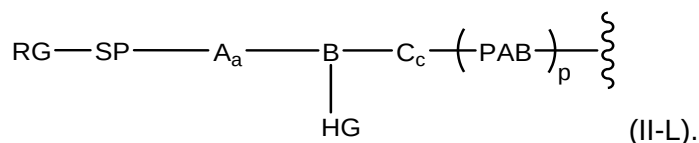
[0187] En una modalidad, R^2 y R^3 son metilo.

[0188] En una modalidad, R^2 es metilo y R^3 es F.

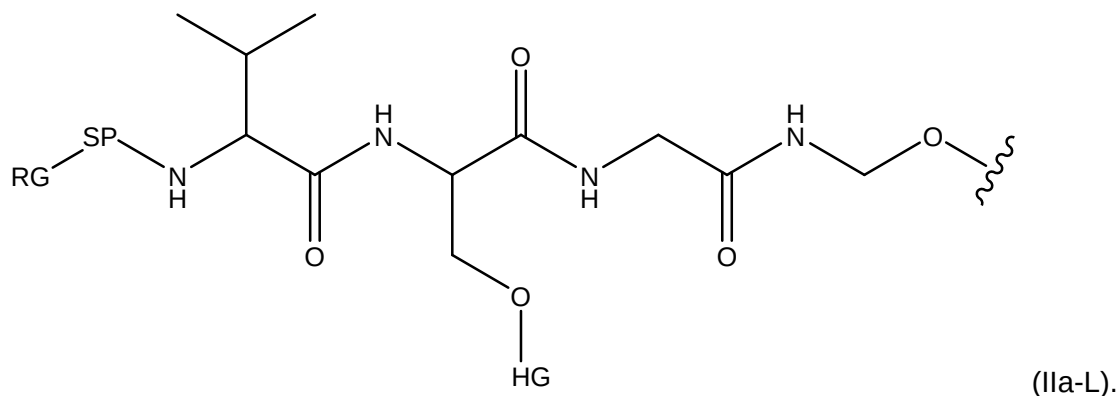
[0189] En una modalidad, el carbono al que se conectan R^2 y R^3 está en la configuración S.

5 [0190] En una modalidad, el carbono al que se conectan R^2 y R^3 está en la configuración R.

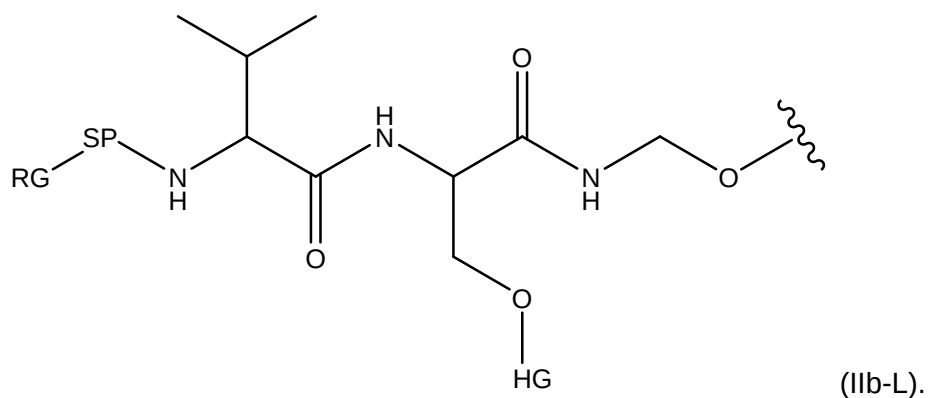
[0191] En una modalidad, el conector covalente, L, tiene la estructura de la Fórmula (II-L):



[0192] En una modalidad, el conector covalente, L, tiene la estructura de la Fórmula (IIa-L):



10 [0193] En una modalidad, el conector covalente, L, tiene la estructura de la Fórmula (IIb-L):

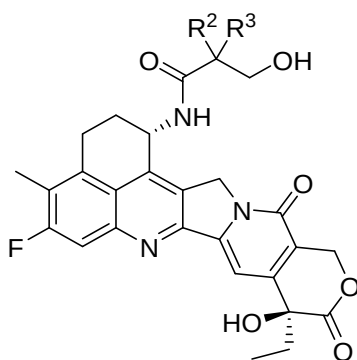


[0194] En ciertas modalidades, los RG, SP, HG, PAB, A, B, C, a, c y p son como se proporcionan en el presente documento.

5.3. Carga activa

15 [0195] Se proporciona en el presente documento un compuesto, o un solvato, estereoisómero o derivado farmacéuticamente aceptable de este, en donde el compuesto es un compuesto

de la fórmula (V):



(V),

o un solvato, estereoisómero o derivado farmacéuticamente aceptable de este, en donde

5 cada uno de R^2 y R^3 es, independientemente, hidrógeno, halógeno o alquilo.

[0196] En una modalidad, R^2 y R^3 son hidrógeno.

[0197] En una modalidad, R^2 y R^3 son metilo.

[0198] En una modalidad, R^2 es metilo y R^3 es F.

[0199] En una modalidad, el carbono al que se conectan R^2 y R^3 está en la configuración S.

10 **[0200]** En una modalidad, el carbono al que se conectan R^2 y R^3 está en la configuración R.

5.4. Métodos o procesos de elaboración de los conjugados

[0201] En algunas modalidades, se establece en el presente documento un método para preparar un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende la etapa de poner en contacto un agente aglutinante con un compuesto de carga activa y conector en condiciones adecuadas para formar un enlace entre el agente aglutinante y el compuesto de carga activa y conector. También se proporciona un método para preparar un compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib) en condiciones adecuadas para formar un enlace entre el agente aglutinante y el compuesto de carga activa y conector.

[0202] En ciertas modalidades, el anticuerpo se hace reaccionar o se trata con un conector-carga activa reactivo para formar un conjugado de carga activa y anticuerpo. La reacción puede desarrollarse en condiciones consideradas adecuadas por los expertos en la técnica. En ciertas modalidades, el anticuerpo se pone en contacto con el compuesto de conector y carga activa reactivo en condiciones adecuadas para formar un enlace entre el anticuerpo y el compuesto de conector y carga activa. Las condiciones de reacción adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

[0203] En los Ejemplos a continuación se proporcionan ejemplos de tales reacciones.

[0204] En algunas modalidades, se establece en el presente documento un método para elaborar un conjugado que comprende tratar o poner en contacto un compuesto con un agente aglutinante en condiciones de acoplamiento, en donde el compuesto comprende un conector reactivo enlazado a al menos un resto de carga activa y, en donde el compuesto que reacciona con un agente aglutinante es un compuesto de la Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb) o una sal, solvato, estereoisómero o derivado farmacéuticamente aceptable de este.

5.5. Composiciones farmacéuticas

[0205] En el presente documento se proporciona una composición farmacéutica, un compuesto expuesto en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5.6. Métodos de uso

[0206] En algunas modalidades, en el presente documento se establece un método para tratar una enfermedad o trastorno en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente un compuesto o composición farmacéutica establecido en el presente documento. En algunas modalidades, el compuesto administrado es un conjugado de anticuerpo y fármaco establecido en el presente documento.

[0207] En algunas modalidades, en el presente documento se establece un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno proliferativo, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno inmunológico, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno inflamatorio, una enfermedad dermatológica, una enfermedad metabólica, una enfermedad cardiovascular y una enfermedad gastrointestinal que comprende administrar al sujeto una cantidad de tratamiento eficaz de un compuesto o composición farmacéutica establecida en el presente documento. En algunas modalidades, el compuesto administrado es un conjugado de anticuerpo y fármaco establecido en el presente documento.

[0208] En algunas modalidades, se establece en el presente documento un método para tratar una enfermedad proliferativa, una enfermedad metabólica, inflamación o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una cantidad de tratamiento eficaz de un compuesto o una composición farmacéutica establecido en el presente documento. En algunas modalidades, se establece en el presente documento un método para tratar una enfermedad proliferativa en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una cantidad de tratamiento eficaz de un compuesto o una composición farmacéutica establecido en el presente documento. En algunas modalidades, el compuesto administrado es un conjugado de

anticuerpo y fármaco establecido en el presente documento.

[0209] En algunas modalidades, se establece en el presente documento un método para tratar una enfermedad metabólica en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una cantidad de tratamiento eficaz de un compuesto o una composición farmacéutica establecido en el presente documento. En algunas modalidades, el compuesto administrado es un conjugado de anticuerpo y fármaco establecido en el presente documento.

[0210] En algunas modalidades, en el presente documento se establece un método para tratar inflamación en un sujeto que comprende la administración al sujeto de un compuesto o composición farmacéutica establecido en el presente documento. En algunas modalidades, el compuesto administrado es un conjugado de anticuerpo y fármaco establecido en el presente documento.

[0211] En algunas modalidades, se establece en el presente documento un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una cantidad de tratamiento eficaz de un compuesto o una composición farmacéutica establecido en el presente documento. En algunas modalidades, el compuesto administrado es un conjugado de anticuerpo y fármaco establecido en el presente documento.

[0212] Si bien se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o analizar la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones diferentes de patentes que se mencionan en la presente memoria descriptiva se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia.

6. EJEMPLOS

[0001] Los ejemplos a continuación pretenden ser puramente ejemplares y no deben considerarse limitantes de ninguna manera. A menos que se especifique lo contrario, los métodos experimentales en los Ejemplos descritos a continuación son métodos convencionales. A menos que se especifique lo contrario, todos los reactivos y materiales están disponibles comercialmente. Todos los disolventes y productos químicos empleados son de grado analítico o de pureza química. Todos los disolventes se redestilan antes de su uso. Todos los disolventes anhidros se preparan según métodos estándar o métodos de referencia. El gel de sílice (100-200 mallas) para cromatografía en columna y gel de sílice (GF254) para cromatografía en capa fina (TLC) están disponibles comercialmente en Tsingdao Haiyang Chemical Co., Ltd. o Yantai Chemical Co., Ltd. de China; todos se eluyeron con éter de petróleo (60-90 °C)/acetato de etilo (v/v) y se visualizaron con yodo o la solución de ácido molibdfosfórico en etanol, a menos que se

especifique lo contrario. Todos los disolventes de extracción, a menos que se especifique lo contrario, se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Los espectros de ¹H NMR se registraron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Varian 400MR Bruck-400 con TMS (tetrametilsilano) como patrón interno. Las constantes de acoplamiento se proporcionan en 5 hercios. Los picos se informaron como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), quinteto (p), sexteto (h), septeto (hept), multiplete (m) o una combinación de estos; br significa amplio. Los datos de LC/MS se registraron mediante el uso de un espectrómetro de masas con trampa de iones y cromatografía ultrarrápida líquida de alto rendimiento Agilent1100,1200 (trampa LC-MSD) 10 equipado con un detector de matriz de diodos (DAD) detectado a 214 nm y 254 nm, y una trampa de iones (fuente ESI). Todos los nombres de los compuestos, excepto los reactivos, se generaron mediante ChemDraw® 18.0.

[0213] Con fines de brevedad, se usan determinadas abreviaturas en el presente documento. Un ejemplo es la abreviatura de una sola letra para representar residuos de aminoácidos. Los aminoácidos y sus abreviaturas de tres letras o de una letra correspondientes son los siguientes:

15 **[0214]** Lista de abreviaturas de aminoácidos

alanina	Ala	(A)
arginina	Arg	(R)
asparagina	Asn	(N)
ácido aspártico	Asp	(D)
cisteína	Cys	(C)
ácido glutámico	Glu	(E)
glutamina	Gln	(Q)
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)

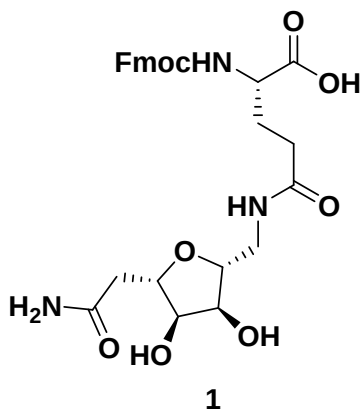
[0215] En los siguientes ejemplos, se usan las siguientes abreviaturas.

[0216] Lista de abreviaturas

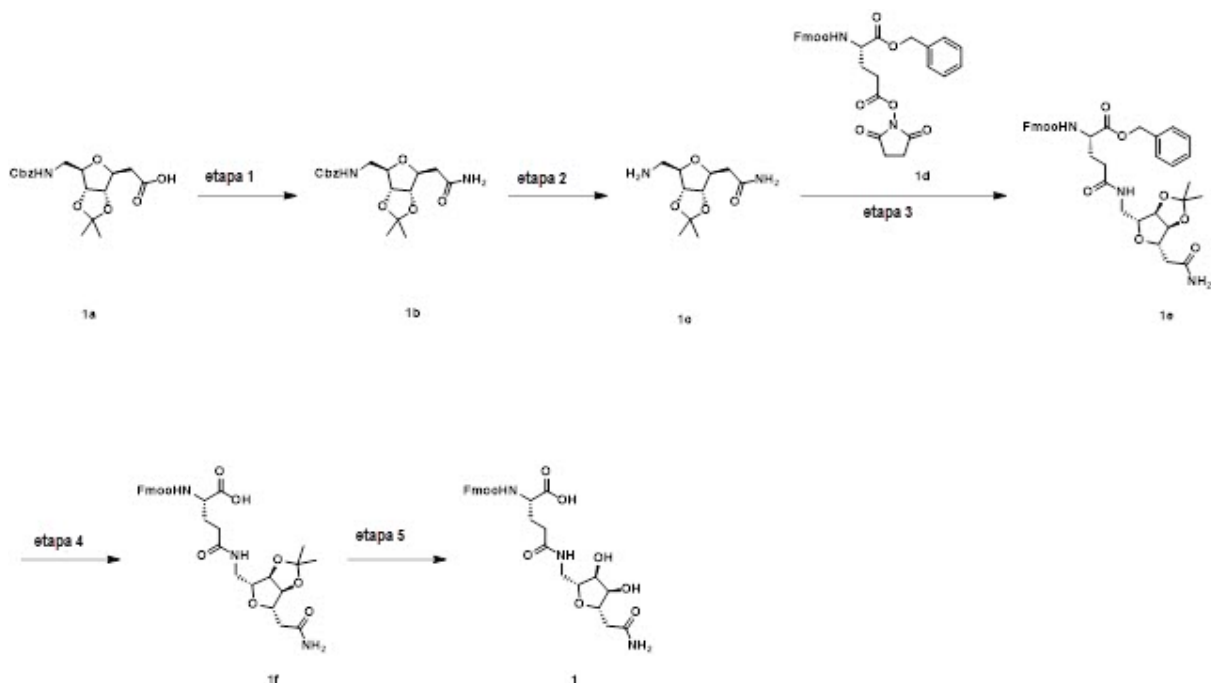
TEA	triethylamina
THF	tetrahydrofurano
MeOH	Metanol
TEMPO	2,2,6,6-Tetrametilpiperidina 1-oxilo
PhI(OAc) ₂	Diacetoxiyodo)benceno
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	N,N-Dimetilformamida
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
LiOH	Hidróxido de litio
HCl	Ácido clorhídrico
PNP	Bis(4-nitrofenil)carbonato
TFA	Ácido trifluoroacético
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
Mel	Yoduro de metilo
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
EtOAc	Acetato de etilo
MeONa	Metóxido de sodio
HPLC preparativa	Cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa
TBSCl	t-Butildimetilclorosilano
Cu(OAc) ₂	Acetato cúprico anhidro
Pb(OAc) ₄	tetraacetato de plomo
TSTU	Tetrafluoruro de 2-succinimido-1,1,3,3-tetra-metiluronio
Et ₂ N	Dietilamina

r.t.	temperatura ambiente
MS	espectrometría de masas
ESI	ionización por pulverización de electrones
FA	ácido fórmico
NHS	N-hidroxisuccinimida
MTBE	éter de terc-butilo de metilo
NHS	N-hidroxisuccinimida
Fmoc	Grupo protector 9-fluorenilmetoxycarbonilo
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	diciclohexilcarbodiimida
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Mc-OSu	éster de N-hidroxisuccinimido de maleimidocaproilo
DMSO	dimetilsulfóxido;.
MMAE	monometilauristatina E o N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproina-fenilalanina
AEVB	Auristatina E valeril bencilhidrazona, conector lábil a los ácidos a través del extremo C de AE

[0217] Ejemplo 1



[0218]



[0219] Etapa 1

[0220] (((3aR,4R,6S,6aS)-6-(2-amino-2-oxoetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metil)carbamato de bencilo (**1b**)

5 [0221] A una suspensión de **1a** (2,01 g, 5,47 mmol) en DMF (20 ml) se añadieron PyBOP (3,42 g, 6,57 mmol), HOBt (887 mg, 6,57 mmol), DIPEA (2,12 g, 16,42 mmol) y NH₄Cl (2,93 g, 54,7 mmol). La suspensión marrón resultante se agitó a 50 °C durante la noche. Después de completar la reacción, la mezcla se inactivó con agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (30 ml * 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml * 3), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío para obtener un residuo que se purificó mediante
10 cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH = 100/0 a 90/10) para proporcionar **20a** (1,81 g, 90,6 % de rendimiento) como un sólido amarillo pálido.

[0222] MS (ESI) m/z: 365,4 [M+H]⁺

[0223] Etapa 2

15 [0224] 2-((3aS,4S,6R,6aR)-6-(aminometil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)acetamida (**1c**)

[0225] Se disolvió **1c** (1,80 g, 4,94 mmol) en un disolvente mixto de THF (15 ml) y MeOH (15 ml) seguido de la adición de Pd/C (base húmeda, 10 %, 450 mg). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 3 h. Después de la reacción completa, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado
20 se concentró a presión reducida para proporcionar **1c** como un jarabe gris (1,14 g, crudo). El

producto crudo se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación.

[0226] MS (ESI) m/z: 231,4 [M+H]⁺

[0227] Etapa 3

[0228] N2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-N5-(((3aR,4R,6S,6aS)-6-(2-amino-2-oxoetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metil)-L-glutaminato de bencilo (**1e**)

[0229] A una mezcla de **1c** (900 mg, crudo) y **1d** (2,18 g, 3,91 mmol) (disponible comercialmente en THF (20 ml) se añadió NaHCO₃ acuoso saturado (5 ml). La mezcla se agitó a r.t. durante 1 h. Después de completar la reacción, la mezcla se diluyó con agua (20 ml), se extrajo con EtOAc (20 ml * 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un aceite marrón que se purificó mediante columna flash (DCM/MeOH = 100/0 a 85/15) para proporcionar **1e** como un sólido blanco (2,15 g, 82,1 % de rendimiento).

[0230] MS (ESI) m/z: 672,6 [M+H]⁺

[0231] Etapa 4

[0232] N2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-N5-(((3aR,4R,6S,6aS)-6-(2-amino-2-oxoetil)-2,2-dimetiltetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metil)-L-glutamina (**1f**)

[0233] Se disolvió **1e** (2,10 g, 3,13 mmol) en un disolvente mixto de THF (20 ml) y MeOH (20 ml) seguido de la adición de Pd/C (base húmeda, 10 %, 525 mg). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 3 h. Después de la reacción completa, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener **1f** (1,87 g, crudo) como un sólido blanco que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación.

[0234] MS (ESI) m/z: 582,5 [M+H]⁺

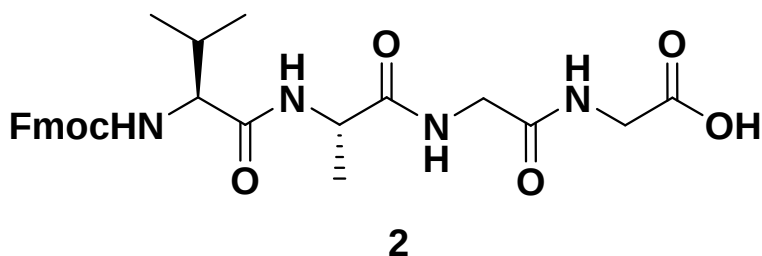
[0235] Etapa 5

[0236] N2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-L-glutamina (**1**)

[0237] Se disolvió **1f** (1,80 g, 3,09 mmol) en DCM (20 ml) y la solución se enfrió a 0 °C antes de añadir un disolvente mixto de TFA/H₂O (20 ml, v/v = 9:1) gota a gota. La mezcla resultante se agitó además a 0 °C durante 1 h. Después de la reacción completa, la mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido trifluoroacético al 0,05 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min)) para proporcionar **1** como un sólido blanco (630 mg, 37,6 %).

[0238] MS (ESI) m/z: 542,5 [M+H]⁺

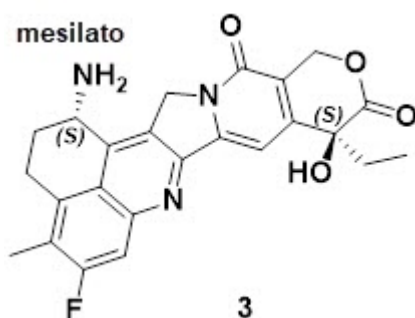
[0239] Ejemplo 2



[0240]

[0241] **2** se sintetizó de acuerdo con un protocolo estándar de síntesis de péptidos en fase sólida (Muriel *et al.*, Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis, *Mol. Biotechnol.*, **2006**, 33, 239–254) mediante el uso de materiales de partida fácilmente disponibles comercialmente.

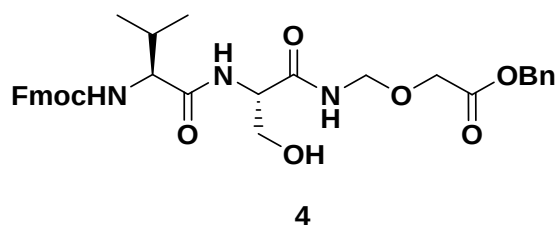
[0242] Ejemplo 3



[0243]

[0244] **3** se adquirió de ShangHai HaoYuan MedChemExpress CO. LTD.

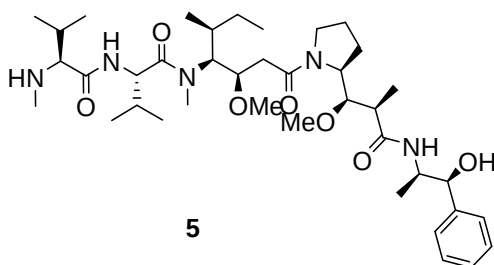
[0245] Ejemplo 4



[0246]

[0247] **4** se sintetizó de acuerdo con los procedimientos informados (Wei *et al.*, Synthesis and Evaluation of Camptothecin Antibody Drug Conjugates, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10, 1386–1392; US 9808537 B2) mediante el uso de materiales de partida fácilmente disponibles comercialmente.

[0248] Ejemplo 5

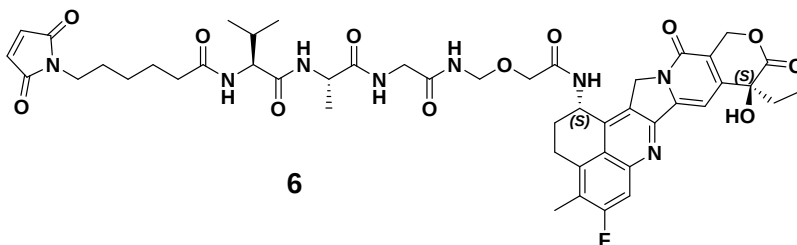


[0249]

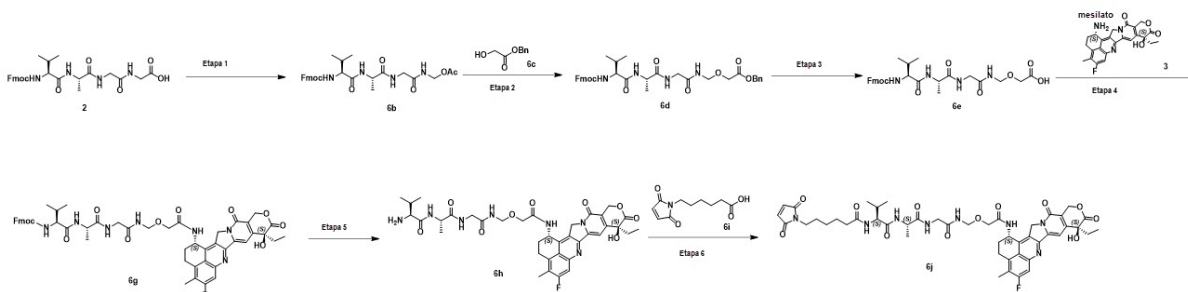
[0250] **5** se adquirió de ShangHai HaoYuan MedChemExpress CO. LTD.

[0251] Los demás reactivos o reactantes fácilmente disponibles comercialmente no están listados ni numerados específicamente.

5 [0252] Ejemplo 6



[0253]



[0254] Etapa 1

[0255] (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-valil-L-alanilglicilglicina (**6b**)

10 [0256] A una mezcla de **2** (1,60 g, 3,05 mmol), $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (221 mg, 1,22 mmol) en DMF (20 ml) se añadieron $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (1,62 g, 3,66 mmol) y HOAc (348 μl , 6,10 mmol). La mezcla negra resultante se purgó con un globo de N_2 3 veces y después se agitó a 70 °C durante 1 h; la mezcla negra se convirtió en una mezcla azul oscuro. Al completar la reacción. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml), después se lavó con salmuera, se secó en Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío para obtener **6b** (1,40 g, 85,2 % de rendimiento) como un sólido blanco.

[0257] MS (ESI) m/z: 561,5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

[0258] Etapa 2

[0259] (5S,8S)-1-(9H-fluoren-9-il)-5-isopropil-8-metil-3,6,9,12-tetraoxo-2,15-dioxa-4,7,10,13-

tetraazaheptadecan-17-oato de bencilo (**6d**)

[0260] A una solución de **6b** (0,60 g, 1,12 mmol) y un tamiz molecular de 4Å en THF (6 ml) se añadieron **6c** (0,56 g, 3,34 mmol) y Sc(OTf)₃ (0,55 g, 1,12 mmol). La suspensión amarilla resultante se agitó a r.t. durante la noche. Al completar la reacción, la mezcla de reacción se filtró y la torta se lavó con THF. Después, las fases de THF combinadas se inactivaron mediante la adición de NaHCO₃ acuoso sat. (50 ml) y se extrajeron con EtOAc (100 ml). Después de la separación, las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH = 100/0 a 85/15) para proporcionar **6d** (600 mg, 83,5 % de rendimiento) como sólido amarillo.

[0261] MS (ESI) m/z: 667,5 [M+Na]⁺

[0262] Etapa 3

[0263] Ácido (5S,8S)-1-(9H-fluoren-9-il)-5-isopropil-8-metil-3,6,9,12-tetraoxo-2,15-dioxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-17-oico (**6e**)

[0264] A una solución de **6d** (215 mg, 0,33 mmol) en MeOH se añadió Pd/C húmedo (20 mg). Después, la mezcla se purgó con globo de H₂ 3 veces, y se agitó a r.t. durante 2 h. Al completar la reacción. La mezcla se filtró a través de un cabezal de filtro de jeringa y el filtrado se concentró al vacío para obtener **6e** (185 mg, crudo) como un sólido blanco.

[0265] MS (ESI) m/z: 578,4 [M+Na]⁺

[0266] Etapa 4

[0267] ((10S,13S)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-10,14-dimetil-1,6,9,12-tetraoxo-3-oxa-5,8,11-triazapentadecan-13-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**6g**)

[0268] A una solución de **6e** (185 mg, 0,33 mmol) en DMF (2 ml) se añadieron HBTU (190 mg, 0,5 mmol) y DIPEA (170 µl, 129 mg, 1 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **3** (195 mg, 0,37 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 µm 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **6g** (150 mg, 46,3 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0269] MS (ESI) m/z: 972,5 [M+H]⁺

[0270] Etapa 5

[0271] (S)-2-amino-N-((S)-1-((2-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-

2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**6h**)

[0272] A una solución de **6g** (30 mg, 0,03 mmol) en DMF (2 ml) se añadió Et₂N (30 µl, 22,59 mg, 0,31 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 1 h. Al completar la reacción. La mezcla se concentró al vacío para obtener **6h** (24 mg, crudo) como un aceite amarillo.

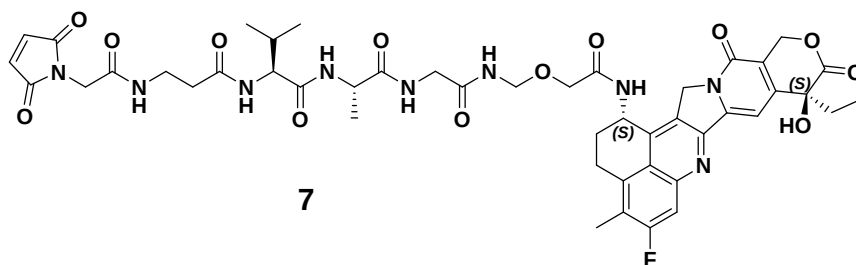
[0273] Etapa 6

[0274] 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((10S,13S)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-10,14-dimetil-1,6,9,12-tetraoxo-3-oxa-5,8,11-triazapentadecan-13-il)hexanamida (**6**)

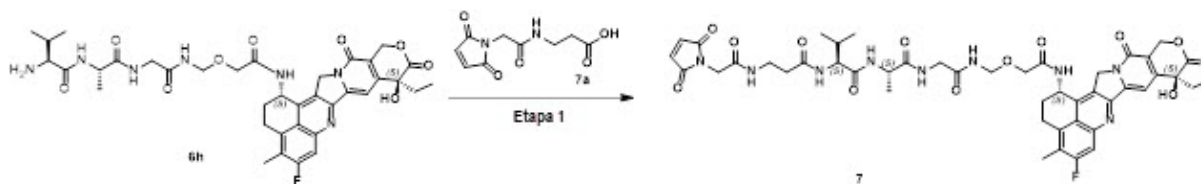
[0275] A una solución de **6i** (13 mg) en DMF (2 ml) se añadieron HBTU (23 mg, 0,06 mmol) y DIPEA (16 µl, 12 mg, 0,09 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **6h** (24 mg). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 µm 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **6** (18 mg, 61,5 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0276] MS (ESI) m/z: 943,6 [M+H]⁺

[0277] Ejemplo 7



[0278]



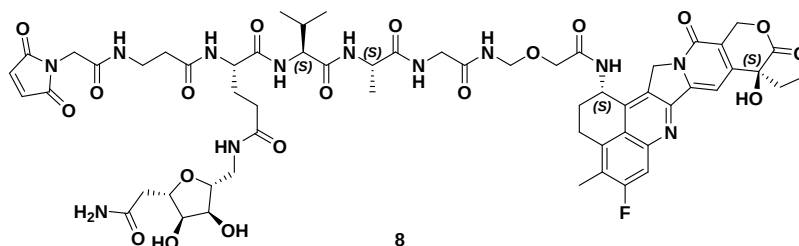
[0279] Etapa 1

[0280] (S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)-N-((S)-1-((2-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**7**)

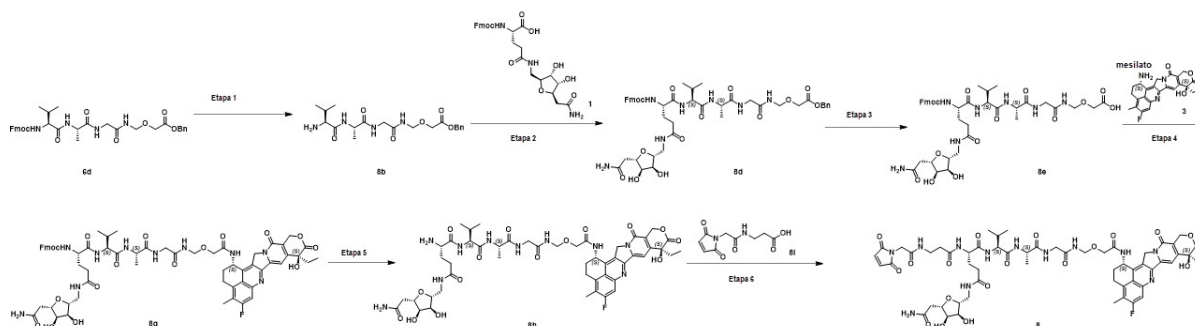
[0281] A una solución de **7a** (19 mg) en DMF (2 ml) se añadieron HBTU (31 mg, 0,08 mmol) y DIPEA (22 μ l, 16 mg, 0,12 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **6h** (30 mg). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **7** (20 mg, 50,7 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0282] MS (ESI) m/z: 958,5 [M+H]⁺

[0283] Ejemplo 8



[0284]



10

[0285] Etapa 1

[0286] (10S,13S)-13-amino-10,14-dimetil-6,9,12-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazapentadecanoato de bencilo (**8b**)

[0287] A una solución de **6d** (600 mg, 0,93 mmol) en DMF (5 ml) se añadió Et₂NH (948 μ l, 681 mg, 9,31 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 1 h. Al completar la reacción. La mezcla se concentró al vacío para obtener **8b** (395 mg, crudo) como un sólido amarillo.

[0288] Etapa 2

[0289] (5S,8S,11S)-5-(3-((((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)-1-(9H-fluoren-9-il)-8-isopropil-11-metil-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,18-dioxa-4,7,10,13,16-pentaazaicosan-20-oato de bencilo (**8d**)

20

[0290] A una solución de **1** (604 mg, 1,12 mmol) en THF (5 ml) se añadieron EDCI (214 mg, 1,12 mmol), HOBT (151 mg, 1,12 mmol) y DIPEA (238 μ l, 180 mg, 1,4 mmol). La solución amarilla

resultante se agitó a r.t. durante 15 min, después se añadió **8b** (395 mg, 0,93 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 16 h. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **8d** (350 mg, 40,8 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0291] MS (ESI) m/z: 968,7 [M+Na]⁺

[0292] Etapa 3

[0293] Ácido (5S,8S,11S)-5-(3-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)-1-(9H-fluoren-9-il)-8-isopropil-11-metil-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,18-dioxa-4,7,10,13,16-pentaazaicosan-20-oico (**8e**)

[0294] A una solución de **8d** (190 mg, 0,33 mmol) en MeOH/THF se añadió Pd/C húmedo (20 mg), después se purgó con globo de H₂ 3 veces y se agitó a r.t. durante 3 h. Al completar la reacción. La mezcla se filtró a través de cabezal de filtro de jeringa Pd/C y el filtrado se concentró al vacío para obtener **8e** (172 mg, crudo) como un sólido blanco.

[0295] Etapa 4

[0296] ((6S,9S,12S)-1-((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)-21-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-9-isopropil-12-metil-3,7,10,13,16,21-hexaoxo-19-oxa-2,8,11,14,17-pentaazahenicosan-6-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**8g**)

[0297] A una solución de **8e** (172 mg, 0,33 mmol) en DMF (2 ml) se añadieron HBTU (109,75 mg, 0,29 mmol) y DIPEA (68,5 ul, 51,95 mg, 0,4 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **3** (128 mg, 0,24 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **8g** (100 mg, 39,1 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0298] MS (ESI) m/z: 1272,51 [M+Na]⁺

[0299] Etapa 5

[0300] (S)-2-amino-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-N1-((10S,13S)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-10,14-dimetil-1,6,9,12-tetraoxo-3-oxa-5,8,11-triazapentadecan-13-il)pentanodiamida (**8h**)

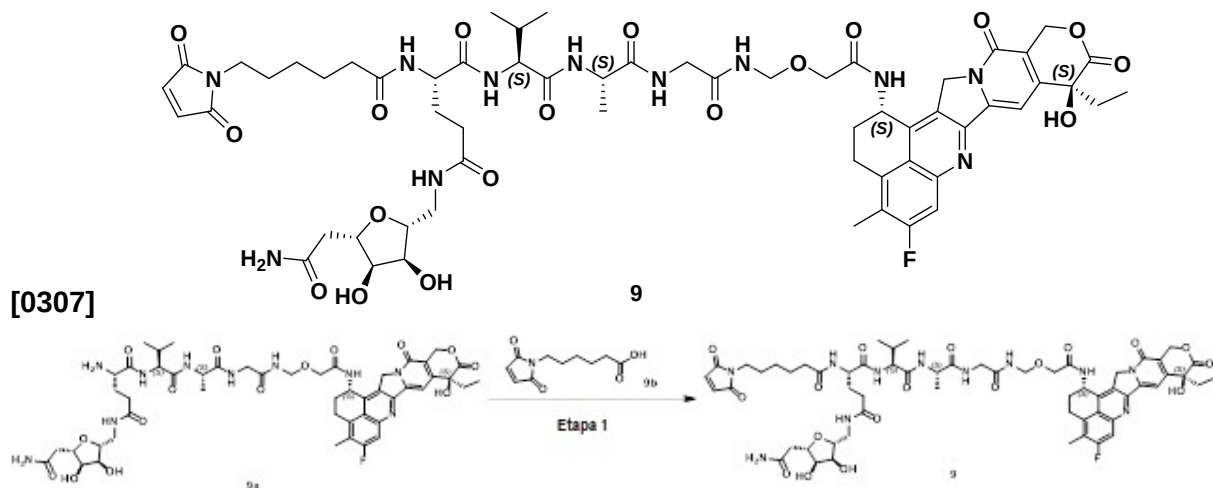
[0301] A una solución de **8g** (30 mg, 0,02 mmol) en DMF (2 ml) se añadió Et₂N (24 µl, 17 mg, 0,24 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 1 h. Al completar la reacción. La mezcla se concentró al vacío para obtener **8h** (25 mg, crudo) como un aceite amarillo.

[0302] Etapa 6

- 5 **[0303]** (S)-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)-N1-(((10S,13S)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-10,14-dimetil-1,6,9,12-tetraoxo-3-oxa-5,8,11-triazapentadecan-13-il)pentanodiamida (**8**)
- 10 **[0304]** A una solución de **8i** (11 mg) en DMF (2 ml) se añadieron HBTU (18 mg, 0,05 mmol) y DIPEA (12 µl, 9,1 mg, 0,07 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **8h** (25 mg). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 µm 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min,
- 15 la fracción se liofilizó para obtener **8** (8,8 mg, 29,7 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0305] MS (ESI) m/z: 1281,8 [M+Na]⁺

[0306] Ejemplo 9

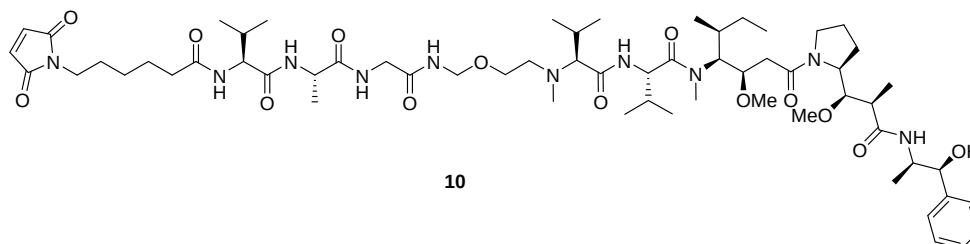


- 20 **[0308]** Etapa 1
- [0309]** (S)-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-N1-(((10S,13S)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-10,14-dimetil-1,6,9,12-tetraoxo-3-oxa-5,8,11-triazapentadecan-13-il)pentanodiamida (**9**)
- 25

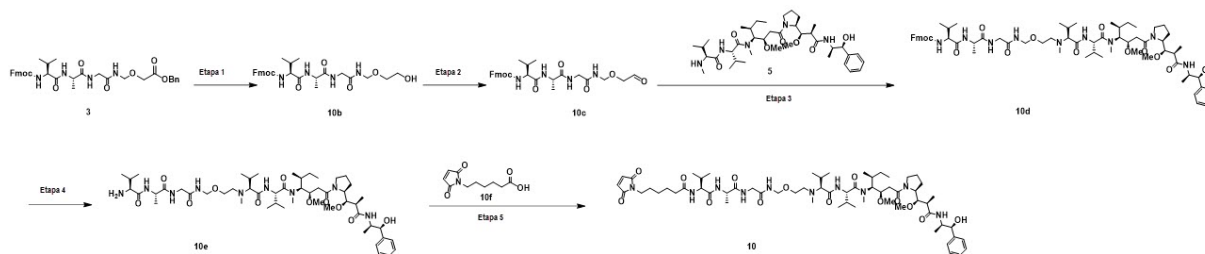
[0310] A una solución de **9b** (13 mg) en DMF (2 ml) se añadieron HBTU (24 mg, 0,06 mmol) y DIPEA (16 μ l, 12 mg, 0,09 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **9a** (40 mg). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **9** (18 mg, 45,8 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0311] MS (ESI) m/z: 1266,8 [M+Na]⁺

[0312] Ejemplo 10



[0313]



10

[0314] Etapa 1

[0315] ((10S,13S)-1-hidroxi-10,14-dimetil-6,9,12-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazapentadecan-13-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**10b**)

[0316] A una solución de **3** (160 mg, 0,25 mmol) en THF anhidro (2 ml) se añadió LiAlH₄ (1 M en THF, 500 μ l, 0,5 mmol) a -78 °C. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 h, después se inactivó con H₂O (100 μ l) y se pasó a través de celite. El filtrado se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: DCM/MeOH = 100/0 a 90/10) para proporcionar **10b** como sólido blanco (120 mg, 89,6 % de rendimiento).

[0317] MS (ESI) m/z: 563,4 [M+Na]⁺

[0318] Etapa 2

[0319] ((10S,13S)-10,14-dimetil-1,6,9,12-tetraoxo-3-oxa-5,8,11-triazapentadecan-13-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**10c**)

[0320] A una solución de **10b** (120 mg, 0,22 mmol) en DMSO anhidro (157 μ l, 172 mg, 2,2

mmol) se añadió cloruro de oxalilo (95 μ l, 140 mg, 1,1 mmol) a -78 °C. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 30 min, seguido de la adición de Et₃N (457 μ l, 334 mg, 3,3 mmol). La mezcla se agitó a -78 °C durante 30 min, después se calentó a r.t. y se diluyó con DCM (10 ml). La solución orgánica se lavó posteriormente con NaHCO₃ sat. (1 ml), H₂O (1 ml) y salmuera (1 ml). La fase orgánica se recogió y se secó con Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para obtener **10c** como un aceite amarillo pálido. El producto crudo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

[0321] MS (ESI) m/z: 561,4 [M+Na]⁺

[0322] Etapa 3

10 [0323] ((3R,4S,7S,10S,21S,24S)-4-((S)-sec-butil)-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-7,10-diisopropil-5,11,21,25-tetrametil-6,9,17,20,23-pentaoxo-2,14-dioxa-5,8,11,16,19,22-hexaazahexacosan-24-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**10d**)

[0324] A una solución de **10c** (20 mg, 0,037 mmol) en MeOH anhidro (1 ml) se añadió **5** (26,56 mg, 0,037 mmol). La mezcla de reacción se agitó a r.t. durante 15 min, seguido de la adición de NaBH₃CN (12 mg, 0,19 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 12 h. Al completar la reacción, la mezcla se inactivó con H₂O y después se purificó mediante HPLC preparativa (TFA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido trifluoroacético al 0,05 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min), la fracción se liofilizó para obtener **10d** (11 mg, 24,5 % de rendimiento) como polvo blanco.

[0325] MS (ESI) m/z: 1242,1 [M+H]⁺

[0326] Etapa 4

[0327] (S)-2-((2S,13S,16S)-16-amino-2-isopropil-3,13,17-trimetil-9,12,15-trioxo-6-oxa-3,8,11,14-tetrazaoctadecanamido)-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-dimetilbutanamida (**10e**)

[0328] A una solución de **10d** (10 mg, 0,008 mmol) en DMF (0,5 ml) se añadió Et₂NH (8,4 μ l, 5,8 mg, 0,08 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 0,5 h. Al completar la reacción, la mezcla se concentró al vacío para obtener **10e** (10 mg) como un sólido amarillo claro, que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

[0329] MS (ESI) m/z: 1018,8 [M+H]⁺

[0330] Etapa 5

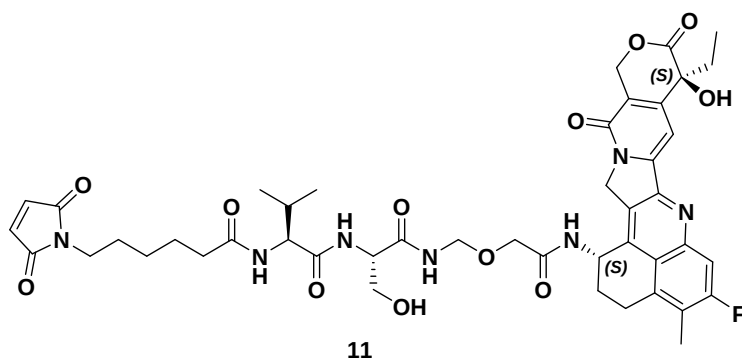
[0331] N-((3R,4S,7S,10S,21S,24S)-4-((S)-sec-butil)-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-

hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-7,10-diisopropil-5,11,21,25-tetrametil-6,9,17,20,23-pentaoxo-2,14-dioxa-5,8,11,16,19,22-hexaazahexacosan-24-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida (**10**)

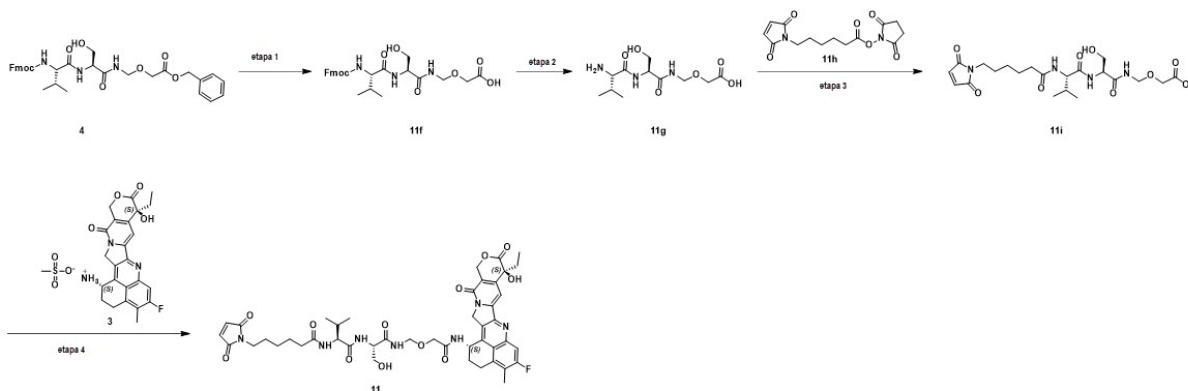
[0332] A una solución de **10e** (8,15 mg, 0,008 mmol) en DMF (0,5 ml) se añadieron HBTU (6,07 mg, 0,016 mmol) y DIPEA (4,19 µl, 3,11 mg, 0,024 mmol), después se añadió **10f** (3,38 mg, 0,016 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 30 min. Al completar la reacción, la mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 µm 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **10** (5 mg, 51,5 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0333] MS (ESI) m/z: 1212,6 [M+H]⁺

[0334] Ejemplo 11



[0335]



[0336] Etapa 1

[0337] Ácido (5*R*,8*S*)-1-(9*H*-fluoren-9-il)-8-(hidroximetil)-5-isopropil-3,6,9-trioxo-2,12-dioxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**11f**)

[0338] A una solución de **4** (100 mg, 0,17 mmol) en MeOH se añadió Pd/C húmedo (10 mg), después se purgó con globo de H₂ 3 veces y se agitó a r.t. durante 2 h. Al completar la reacción.

La mezcla se filtró a través de cabezal de filtro de jeringa Pd/C y el filtrado se concentró al vacío para obtener **11f** (90 mg, crudo) como un sólido blanco.

[0339] MS (ESI) m/z: 536,4 [M+Na]⁺

[0340] Etapa 2

5 [0341] Ácido 2-(((S)-2-((R)-2-amino-3-metilbutanamido)-3-hidroxiopropanamido)metoxi)acético (**11g**)

[0342] A una solución de **11f** (90 mg, 0,175 mmol) en DMF (2 ml) se añadió Et₂N (180 ul, 128 mg, 1,75 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 0,5 h. Al completar la reacción. La mezcla se concentró al vacío para obtener **11g** (57 mg, crudo) como un sólido amarillo.

10 [0343] MS (ESI) m/z: 292,4 [M+H]⁺

[0344] Etapa 3

[0345] Ácido (7*S*,10*R*)-17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-7-(hidroximetil)-10-isopropil-6,9,12-trioxo-3-oxa-5,8,11-triazaheptadecanoico (**11i**)

[0346] A una solución de **11g** (29 mg, 0,098 mmol) y **11h** (45 mg, 0,15 mmol) en DMF (2 ml) se añadió DIPEA (24 ul, 19 mg, 0,15 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 1,5 h. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **11i** (18 mg, 25,3 % de rendimiento) como un polvo blanco.

20 [0347] MS (ESI) m/z: 507,4 [M+Na]⁺

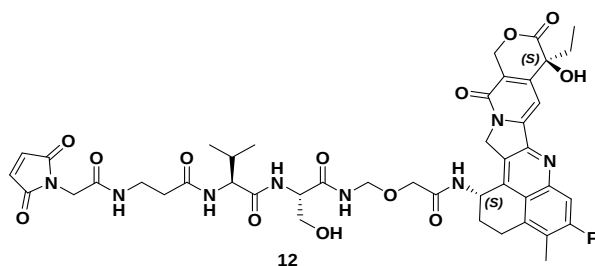
[0348] Etapa 4

[0349] 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-N-((S)-1-(((S)-1-(((2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-hidroxi-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (**11**)

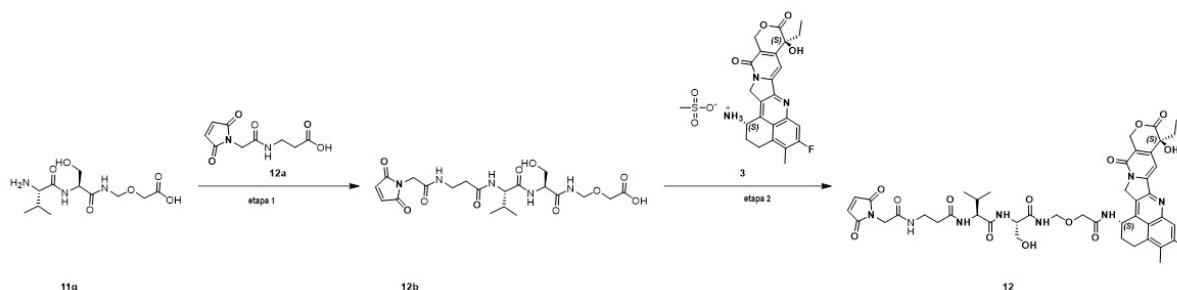
[0350] A una solución de **11i** (18 mg, 0,037 mmol) en DMF (2 ml) se añadieron HATU (15 mg, 0,039 mmol) y DIPEA (12 µl, 9,6 mg, 0,074 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **3** (20 mg, 0,037 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **11** (29 mg, 78,4 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0351] MS (ESI) m/z: 902,6 [M+H]⁺

[0352] Ejemplo 12



[0353]



[0354] Etapa 1

- 5 [0355] Ácido (7S,10R)-17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-7-(hidroximetil)-10-isopropil-6,9,12,16-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,15-tetraazaheptadecanoico (**12b**)

[0356] A una solución de **11g** (29 mg, 0,098 mmol) y **12a** (33 mg, 0,15 mmol) en DMF se añadieron TSTU (41 mg, 0,14 mmol) y DIPEA (24 μ l, 19 mg, 0,15 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Al completar la reacción. La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **12b** (23 mg, 31,4 % de rendimiento) como un polvo blanco.

[0357] MS (ESI) m/z: 522,4 [M+Na]⁺

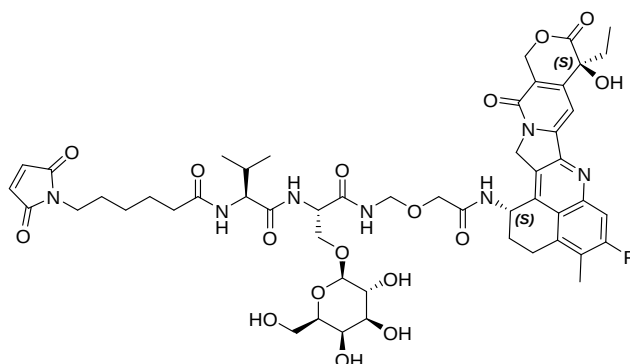
[0358] Etapa 2

- 15 [0359] (S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)-N-((S)-1-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-hidroxi-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**12**)

[0360] El Compuesto **12** (13 mg, 32,9 % de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento sintético de la etapa 6 del ejemplo 11.

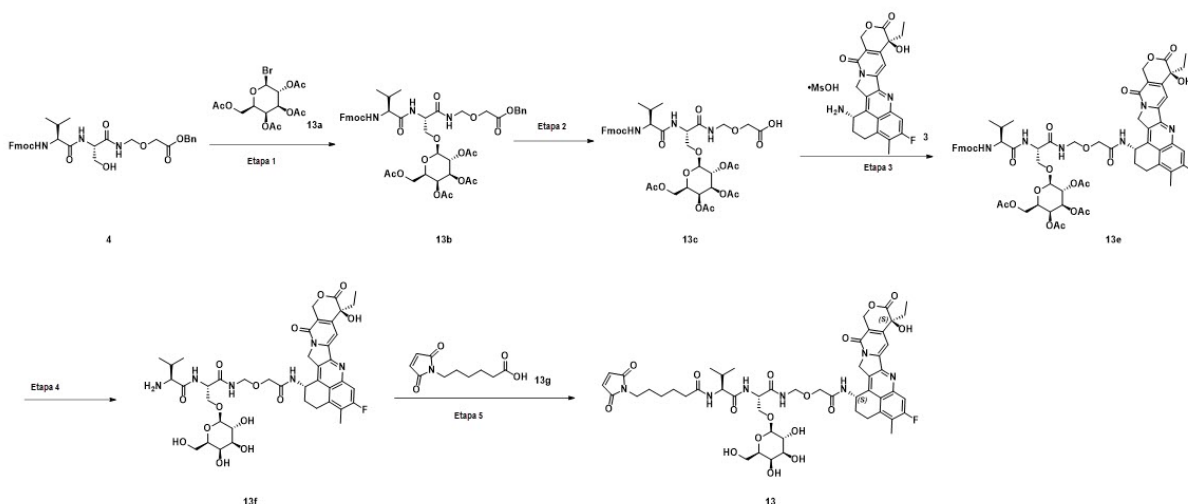
[0361] MS (ESI) m/z: 917,6 [M+H]⁺

[0362] Ejemplo 13



13

[0363]



[0364] Etapa 1

[0365] Triacetato de (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(benciloxi)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triolo (**13b**)

[0366] A una solución del compuesto **4** (420 mg, 0,70 mmol) en DCM (12 ml) se añadieron **13a** (486 mg, 1,18 mmol) y tamices moleculares de 4Å (800 mg). La mezcla se agitó a r.t. durante 30 min. Se añadió a la mezcla AgOTf (250 mg, 0,97 mmol) y se agitó a r.t. durante 4 h. Después de la reacción completa, la mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con EA (200 ml), se lavó con NaHCO₃ saturado (50 ml*3) y salmuera (50 ml*3). La capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna flash (elución: PE/EA = 100/0 ~ 70/30) para proporcionar **13b** (183 mg, 28,2 % de rendimiento) como sólido blanco.

[0367] MS (ESI) m/z: 956,5 [M+Na]⁺

[0368] Etapa 2

[0369] Ácido (5S,8S)-1-(9H-fluoren-9-il)-5-isopropil-3,6,9-trioxo-8-((((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)metil)-2,12-dioxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**13c**)

5 **[0370]** A una solución del compuesto **13b** (183 mg, 0,20 mmol) en MeOH (6 ml) se añadió Pd/C (10 %, 20 mg). La mezcla se agitó en atmósfera de H₂ (15 psi) durante 4 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite, se concentró para obtener el compuesto **13c** (165 mg, crudo) como sólido blanco.

[0371] MS (ESI) m/z: 866,4 [M+Na]⁺

10 **[0372]** Etapa 3

[0373] Triacetato de (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxa-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(acetoximetil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo (**13e**)

15 **[0374]** A una solución del compuesto **13c** (165 mg, crudo) en DMF (4 ml) se añadieron **3** (109 mg, 0,21 mol), HATU (112 mg, 0,29 mmol) y DIEA (101 mg, 0,78 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 30 min. La mezcla se filtró y el filtrado se purificó mediante HPLC preparativa (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min para proporcionar **13f** (124 mg, 50,2 % de rendimiento) como sólido blanco.

[0375] MS (ESI) m/z: 1283,6 [M+Na]⁺

[0376] Etapa 4

25 **[0377]** (S)-2-amino-N-((S)-1-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxa-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-1-oxo-3-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)propan-2-il)-3-metilbutanamida (**13f**)

30 **[0378]** A una solución del compuesto **13e** (124 mg, 0,098 mmol) en MeOH (6 ml) se añadió K₂CO₃ (136 mg, 0,98 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 4 h. La mezcla se filtró y el filtrado se purificó mediante HPLC preparativa (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min para proporcionar **13f** (42 mg, 49,1 % de rendimiento) como sólido blanco.

[0379] MS (ESI) m/z: 893,5 [M+Na]⁺

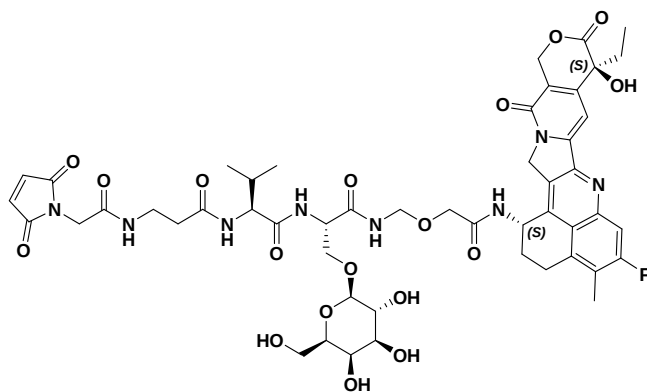
[0380] Etapa 5

[0381] 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-(((S)-1-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-1-oxo-3-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)propan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (**13**)

[0382] A una solución del compuesto **13g** (11 mg, 0,048 mmol) en DMF (1,5 ml) se le añadieron HATU (17 mg, 0,043 mmol) y DIEA (6,2 mg, 0,048 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 15 min. El compuesto **13f** (21 mg, 0,024 mmol) se añadió a la mezcla y se agitó a r.t. durante 15 min. La mezcla se filtró y el filtrado se purificó mediante HPLC preparativa (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min para proporcionar **13** (6,3 mg, 24,6 % de rendimiento) como sólido blanco.

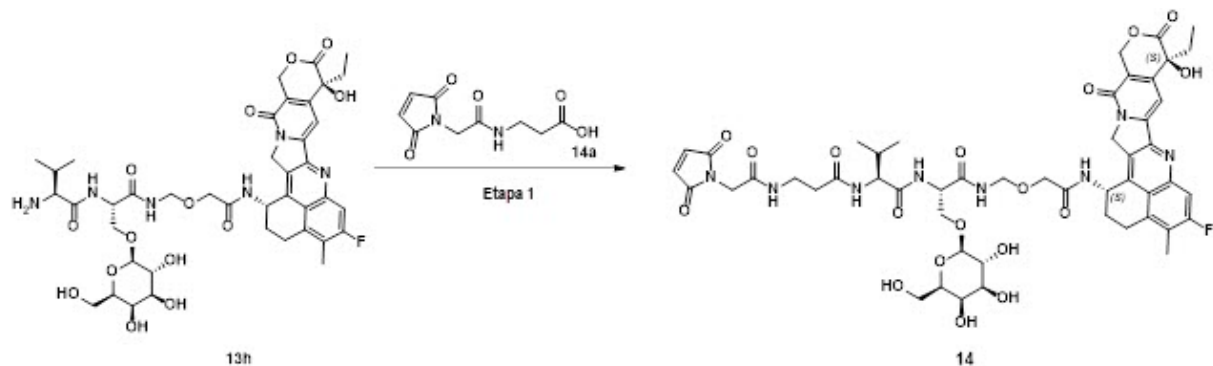
[0383] MS (ESI) m/z: 1086,6 [M+Na]⁺

15 [0384] Ejemplo 14



[0385]

14

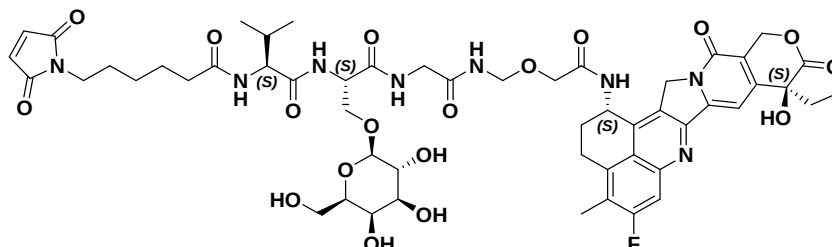


[0386] Etapa 1

[0387] El Compuesto **14** (3,6 mg, 13,8 % de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento sintético de la etapa 5 del ejemplo 13.

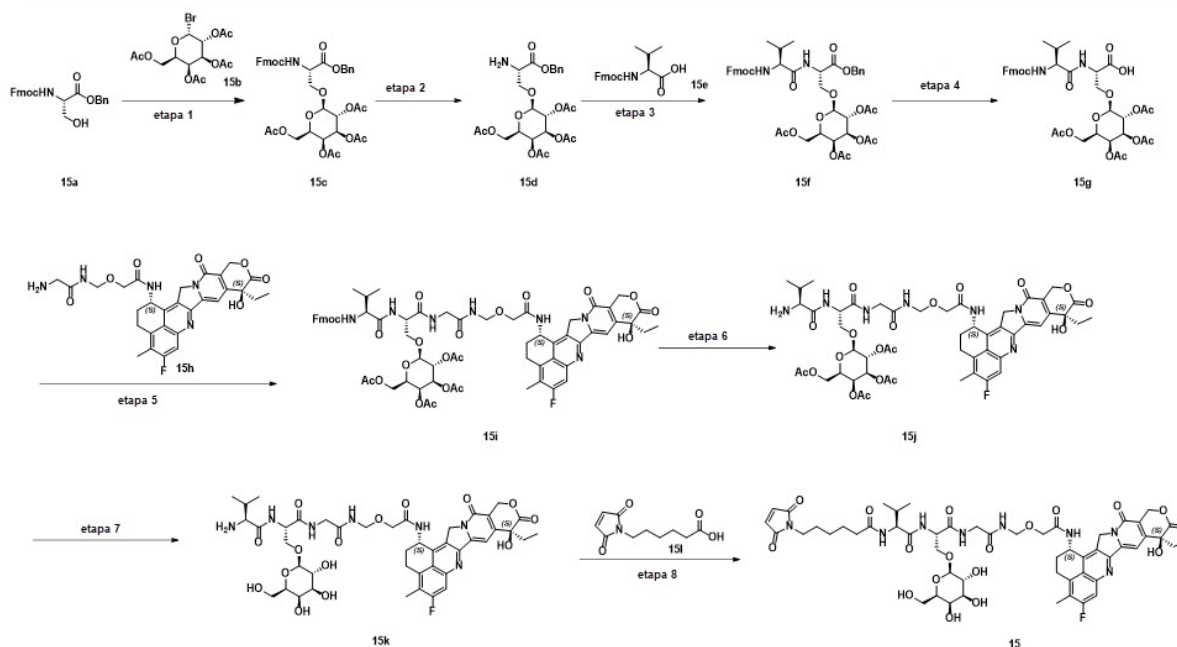
[0388] MS (ESI) m/z : 1101,6 $[M+Na]^+$

[0389] Ejemplo 15



5 [0390]

15



[0391] Etapa 1

[0392] Triacetato de (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (15c)

10 [0393] A una solución del compuesto **15a** (200 mg, 0,48 mmol) en DCM (8 ml) se añadieron **15b** (335 mg, 0,81 mmol) y tamices moleculares de 4Å (400 mg). La mezcla se agitó a r.t. durante 30 min. Se añadió a la mezcla el compuesto AgOTf (172 mg, 0,67 mmol) y se agitó a r.t. durante 4 h. Después de la reacción completa, la mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con EA (100 ml), se lavó con NaHCO₃ saturado (50 ml*3) y salmuera (50 ml*3). La capa orgánica se secó con

15 Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en

columna flash (elución: PE/EA = 100/0 ~ 70/30) para proporcionar **15c** (230 mg, 64,2 % de rendimiento) como sólido blanco.

[0394] MS (ESI) m/z: 770,4 [M+Na]⁺

[0395] Etapa 2

5 [0396] Triacetato de (2R,3S,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-((S)-2-amino-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**15d**)

[0397] A una solución del compuesto **15c** (230 mg, 0,31 mmol) en DMF (6 ml) se añadió Et₂NH (450 mg, 602 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 30 min. La mezcla se concentró a alto vacío y se coevaporó con tolueno (3 ml*3) para obtener **15d** (162 mg, crudo) como sólido marrón.

[0398] MS (ESI) m/z: 526,4 [M+H]⁺

[0399] Etapa 3

[0400] Triacetato de (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**15f**)

[0401] A una solución del compuesto **15d** (162 mg, 0,31 mmol) en DMF (4 ml) se añadieron **15e** (126 mg, 0,37 mol), HATU (176 mg, 0,46 mmol) y DIEA (120 mg, 0,93 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 30 min. La mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna flash (elución: PE/EA=100/0~70/30) para proporcionar el compuesto **15f** (145 mg, 55,6 % de rendimiento) como sólido blanco.

[0402] MS (ESI) m/z: 869,5 [M+Na]⁺

[0403] Etapa 4

[0404] N-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-valil)-O-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-L-serina (**15g**)

25 [0405] A una solución del compuesto **15f** (100 mg, 1,35 mmol) en MeOH (6 ml) se añadió Pd/C (10 %, 20 mg). La mezcla se agitó en atmósfera de H₂ (15 psi) durante 4 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celite, se concentró para obtener el compuesto **15g** (95 mg, crudo) como sólido blanco.

[0406] MS (ESI) m/z: 779,5 [M+Na]⁺

30 [0407] Etapa 5

[0408] Triacetato de (2R,3R,4S,5S,6R)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-((2-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-

1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**15i**)

[0409] A una solución del compuesto **15g** (95 mg, crudo) en DMF (4 ml) se añadieron **15h** (80 mg, 0,14 mol), HATU (72 mg, 0,19 mmol) y DIEA (49 mg, 0,38 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 30 min. La mezcla se filtró y el filtrado se purificó mediante HPLC preparativa (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min para proporcionar **15i** (117 mg, 70,4 % de rendimiento) como sólido blanco.

[0410] MS (ESI) m/z: 1340,5 [M+Na]⁺

10 **[0411]** Etapa 6

[0412] Triacetato de (2R,3S,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-3-((2-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**15j**)

15 **[0413]** El Compuesto **15j** (116 mg, crudo) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento sintético de la etapa 2 del ejemplo 15.

[0414] Etapa 7

[0415] (S)-2-amino-N-((S)-1-((2-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-1-oxo-3-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)propan-2-il)-3-metilbutanamida (**15k**)

20 **[0416]** A una solución del compuesto **15j** (116 mg, 0,11 mmol) en MeOH (4 ml) se añadió K₂CO₃ (44 mg, 0,32 mmol). Se agitó la mezcla a r.t. durante 3 h. La mezcla se filtró y el filtrado se purificó mediante HPLC preparativa (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min para proporcionar **15k** (46 mg, 46,9 % de rendimiento) como sólido blanco.

[0417] MS (ESI) m/z: 928,6 [M+H]⁺

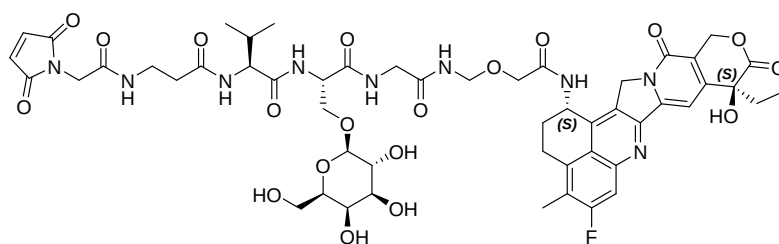
[0418] Etapa 8

30 **[0419]** 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((10S,13S)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-14-metil-1,6,9,12-tetraoxo-10-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)metil)-3-oxa-5,8,11-triazapentadecan-13-il)hexanamida (**15**)

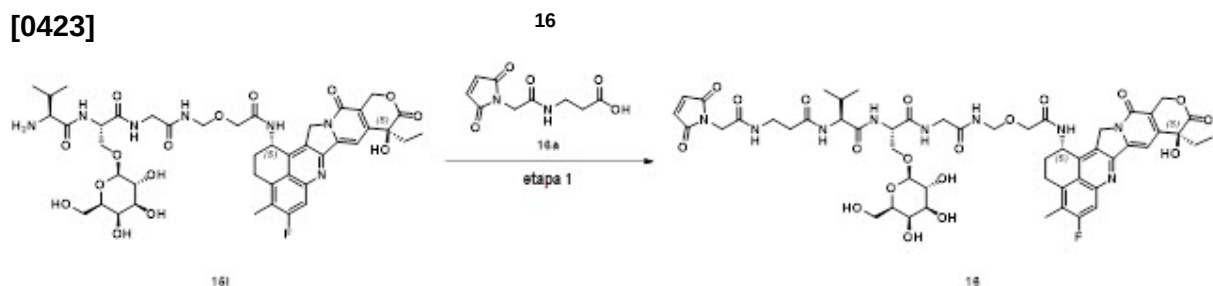
[0420] A una solución del compuesto **15i** (9,5 mg, 0,042 mmol) en DMF (1,5 ml) se añadieron HATU (14 mg, 0,038 mmol) y DIEA (5,4 mg, 0,042 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 15 min. El compuesto **15k** (23 mg, 0,021 mmol) se añadió a la mezcla y se agitó a r.t. durante 15 min. La mezcla se filtró y el filtrado se purificó mediante HPLC preparativa (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min para proporcionar **15k** (3,4 mg, 14,4 % de rendimiento) como sólido blanco.

[0421] MS (ESI) m/z: 1143,5 [M+Na]⁺

[0422] Ejemplo 16



10 **[0423]**



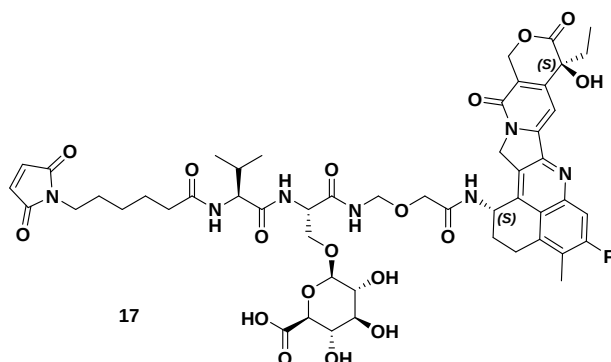
[0424] Etapa 1

[0425] (S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)-N-((S)-1-(((2-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-1-oxo-3-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)propan-2-il)-3-metilbutanamida (**16**)

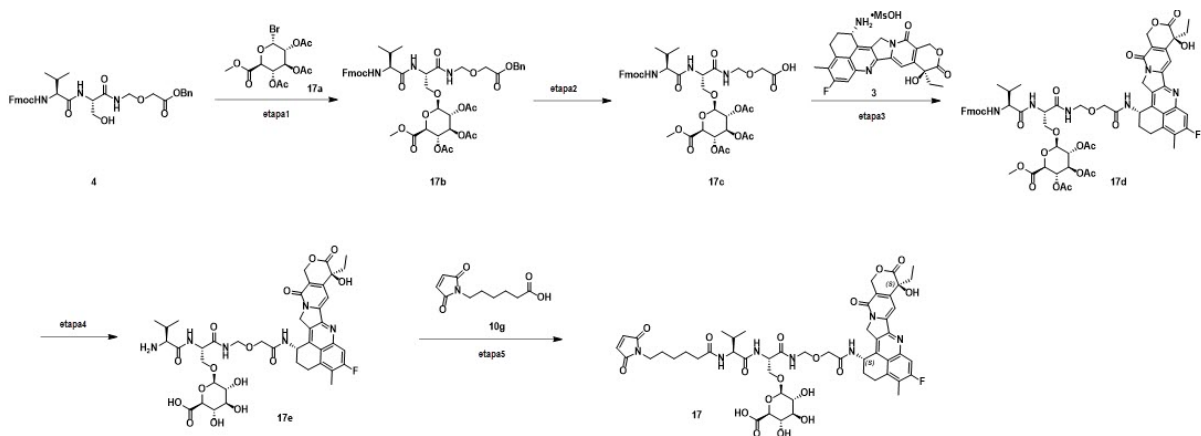
[0426] El Compuesto 16 (3,5 mg, 12,5 % de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento sintético de la etapa 8 del ejemplo 15.

20 **[0427]** MS (ESI) m/z: 1158,5 [M+Na]⁺

[0428] Ejemplo 17



[0429]



[0430] Etapa 1

[0431] Triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(benciloxi)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**17b**)

[0432] A la mezcla de **4** (150 mg, 0,25 mmol), **17a** (148 mg, 0,37 mmol) y MS de 4Å (800 mg) se añadió DCE seco (5 ml), se agitó a r.t. durante 30 min. Se añadió AgOTf (83 mg, 0,32 mmol) en atmósfera de nitrógeno, se agitó a r.t. durante 14 h. La solución de reacción se diluyó con EtOAc (10 ml), se filtró a través de celite, se lavó con EtOAc (5 ml * 3). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ sat. (20 ml), se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna flash (eluyente: éter de petróleo/EtOAc = 70/30 a 0/100, después DCM/MeOH = 100/0 a 95/5) para obtener **17b** (28 mg, 12,2 % de rendimiento) como un sólido amarillo claro.

[0433] MS (ESI) m/z: 942,5 [M+Na]⁺

[0434] Etapa 2

[0435] Ácido (5*S*,8*S*)-1-(9*H*-fluoren-9-il)-5-isopropil-3,6,9-trioxo-8-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)metil)-2,12-dioxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**17c**)

[0436] A la mezcla de **17b** (114 mg, 0,12 mmol) y Pd/C al 10 % (26 mg, 0,012 mmol) se añadió MeOH (3 ml) en atmósfera de nitrógeno. La solución de reacción se agitó a r.t. en atmósfera de H₂ durante 1 h. La solución se filtró y se concentró al vacío para obtener **17c** (103 mg, 12,4 % de rendimiento) como un sólido blanco.

5 **[0437]** MS (ESI) m/z: 852,5 [M+Na]⁺

[0438] Etapa 3

[0439] Triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**17d**)

[0440] A la solución de **17c** (103 mg, 0,12 mmol), **3** (64 mg, 0,12 mmol) y HATU (47 mg, 0,12 mmol) en DMF seca (2 ml) se añadió DIPEA (61 µl, 0,36 mmol), se agitó a r.t. durante 1 h. La solución de reacción se añadió a H₂O (20 ml), se extrajo con DCM/MeOH (10:1, 11 ml * 3). La fase orgánica se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna flash (eluyente: DCM/MeOH = 100/0 a 95/5) para proporcionar **17d** (97 mg, 64 % de rendimiento) como un sólido marrón claro.

[0441] MS (ESI) m/z: 1269,5 [M+Na]⁺

[0442] Etapa 4

20 **[0443]** Ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metilbutanamido)-3-(((2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2*H*-piran-2-carboxílico (**17e**)

[0444] A la solución de **17d** (30 mg, 0,024 mmol) en MeOH/H₂O (0,5/0,5 ml) se añadió TEA (167 µl, 1,2 mmol), se agitó a r.t. durante 9 h. La solución se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 µm 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **17e** (15 mg, 70,6 % de rendimiento) como un sólido amarillo pálido.

[0445] MS (ESI) m/z: 885,5 [M+H]⁺

30 **[0446]** Etapa 5

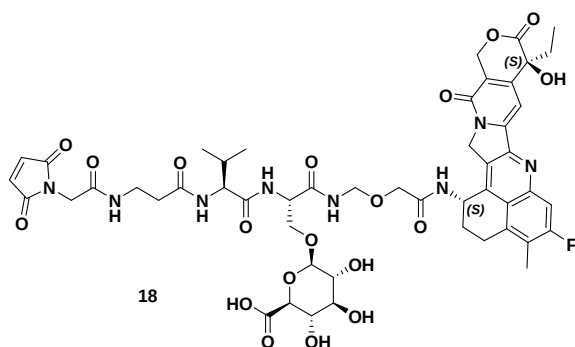
[0447] Ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-

2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**17**)

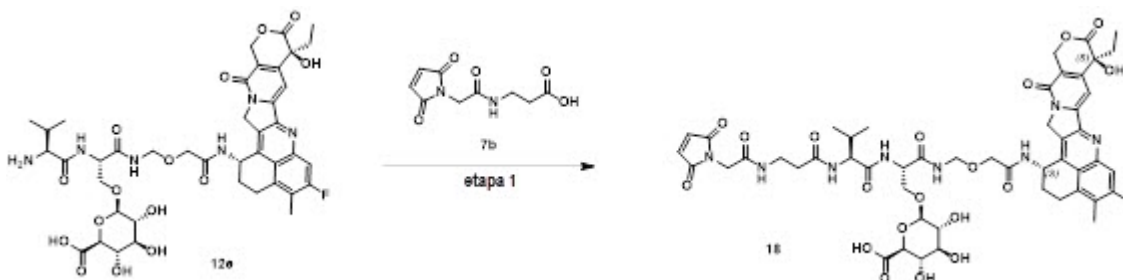
[0448] A la solución de **10g** (8,3 mg, 0,038 mmol) y HATU (11 mg, 0,029 mmol) en DMF seca (0,3 ml) era DIPEA (5 µl, 0,029 mmol), se agitó a r.t. durante 15 min. La solución se añadió gota a gota a la solución de **17e** (17 mg, 0,019 mmol) en DMF seca (0,7 ml), se agitó a r.t. durante 15 min. Se añadió HOAc para ajustar el pH a 5. La solución se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna XBridge Prep C18 OBD 5 µm 19*250 mm; fase móvil: A-agua (FA al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para proporcionar **17** (13 mg, 63,5 % de rendimiento) como un sólido beige.

[0449] MS (ESI) m/z: 1078,6 [M+H]⁺

10 [0450] Ejemplo 18



[0451]



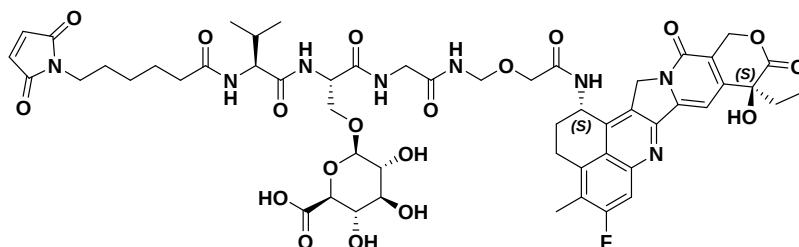
[0452] Etapa 1

15 [0453] Ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**18**)

20 [0454] El Compuesto **18** (2,9 mg, 15,7 % de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento sintético de la etapa 5 del ejemplo 17.

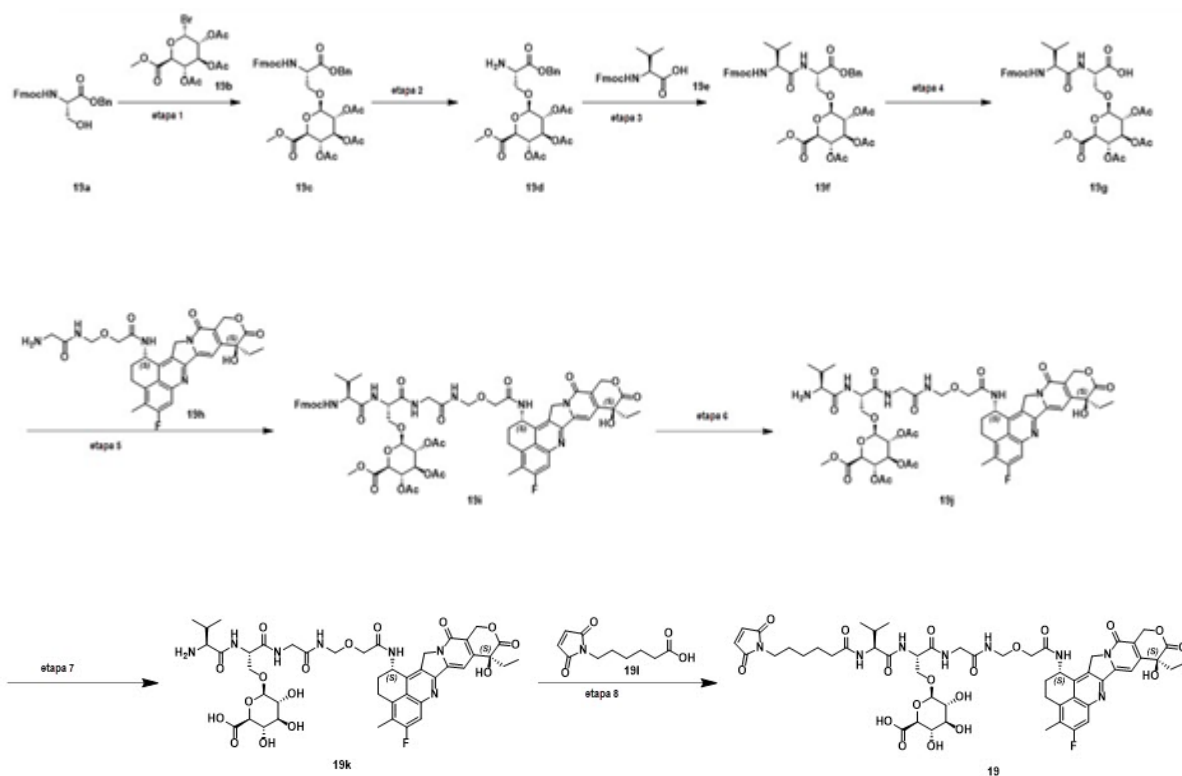
[0455] MS (ESI) m/z: 1093,5 [M+H]⁺

[0456] Ejemplo 19



[0457]

19



5 [0458] Etapa 1

[0459] Triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**19c**)

[0460] A una mezcla de **19a** (834 mg, 2 mmol), **19b** (950 mg, 2,4 mmol) y MS de 4Å (3000 mg) se añadió DCM seco (30 ml), se agitó a r.t. durante 30 min. Se añadió AgOTf (617 mg, 2,4 mmol) en atmósfera de nitrógeno, se agitó a r.t. durante 16 h. La solución de reacción se diluyó con EtOAc (30 ml), se filtró a través de celite, se lavó con EtOAc (20 ml * 3). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ sat. (20 ml), se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna flash (eluyente: éter de petróleo/EtOAc = 70/30 a 0/100) para obtener **19c** (470 mg, 32,1 % de

rendimiento) como un sólido amarillo claro.

[0461] MS (ESI) m/z : 756,3 $[M+Na]^+$

[0462] Etapa 2

[0463] Triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)-6-
5 (metoxicarbonil)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**19d**)

[0464] A una solución de **19c** (470 mg, 0,64 mmol) en DMF (5 ml) se añadió Et₂N (1420 μ l, 1011 mg, 12,8 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 0,5 h. Al completar la reacción. La mezcla se concentró al vacío para obtener **19d** (327 mg, crudo) como un sólido amarillo.

[0465] MS (ESI) m/z : 512,4 $[M+H]^+$

10 **[0466]** Etapa 3

[0467] Triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)-6-
(metoxicarbonil)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**19f**)

[0468] A una solución de **19d** (327 mg) en DMF (5 ml) se añadieron HATU (291 mg, 0,76
15 mmol) y DIPEA (223 μ l, 165 mg, 1,27 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **19e** (239 mg, 0,70 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna flash (eluyente: éter de petróleo/EtOAc = 70/30 a 0/100) y HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico
20 al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **19f** (300 mg, 56,2 % de rendimiento) como un sólido blanco.

[0469] MS (ESI) m/z : 833,4 $[M+H]^+$

[0470] Etapa 4

[0471] N-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-valil)-O-((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-3,4,5-triacetoxi-6-
25 (metoxicarbonil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-L-serina (**19g**)

[0472] A una solución de **19f** (300 mg, 0,36 mmol) en MeOH (10 ml) y THF (8 ml) se añadió Pd/C húmedo (30 mg), después se purgó con globo de H₂ 3 veces y se agitó a r.t. durante 2 h. Al completar la reacción. La mezcla se filtró a través de cabezal de filtro de jeringa Pd/C y el filtrado se concentró al vacío para obtener **19g** (265 mg, crudo) como un sólido blanco.

30 **[0473]** MS (ESI) m/z : 765,3 $[M+Na]^+$

[0474] Etapa 5

[0475] Triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-((2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-

10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**19i**)

[0476] A una solución de **19g** (265 mg) en DMF (5 ml) se añadieron HATU (120 mg, 0,42 mmol) y DIPEA (124 μ l, 92 mg, 0,71 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a r.t. durante 5 min, después se añadió **19h** (227 mg, 0,39 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 60 min. Al completar la reacción. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna flash (eluyente: DCM/MeOH = 95/5 a 90/10) para obtener **19i** (280 mg, 59,6 % de rendimiento) como un sólido marrón.

10 **[0477]** MS (ESI) *m/z*: 1326,4 [M+Na]⁺

[0478] Etapa 6

[0479] Triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metilbutanamido)-3-((2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**19j**)

[0480] A una solución de **19i** (280 mg, 0,21 mmol) en DMF (5 ml) se añadió Et₂N (478 μ l, 340 mg, 4,29 mmol). La mezcla se agitó a r.t. durante 0,5 h. Al completar la reacción. La mezcla se concentró al vacío para obtener **19j** (220 mg, crudo) como un sólido blanco.

[0481] MS (ESI) *m/z*: 1082,4 [M+H]⁺

20 **[0482]** Etapa 7

[0483] Ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metilbutanamido)-3-((2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2*H*-piran-2-carboxílico (**19k**)

[0484] A la solución de **19j** (220 mg) en MeOH/H₂O (5/5 ml) se añadió Na₂CO₃ (151 mg, 1,42 mmol), se agitó a r.t. durante 9 h. La solución se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; fase móvil: A-agua (ácido fórmico al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **19k** (45 mg, 23,8 % de rendimiento) como un sólido blanco.

30 **[0485]** MS (ESI) *m/z*: 942,3 [M+H]⁺

[0486] Etapa 8

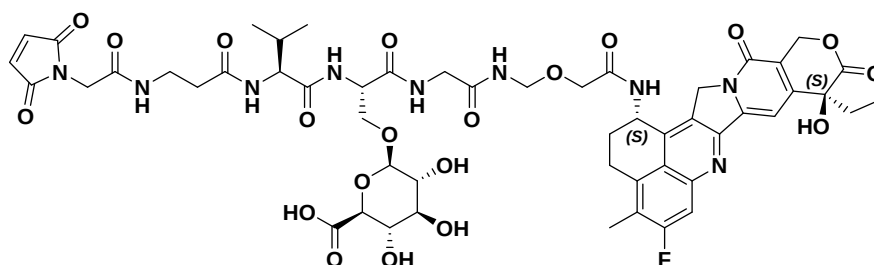
[0487] Ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-3-((2-(((1*R*,9*R*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-

dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2*H*-piran-2-carboxílico (**19**)

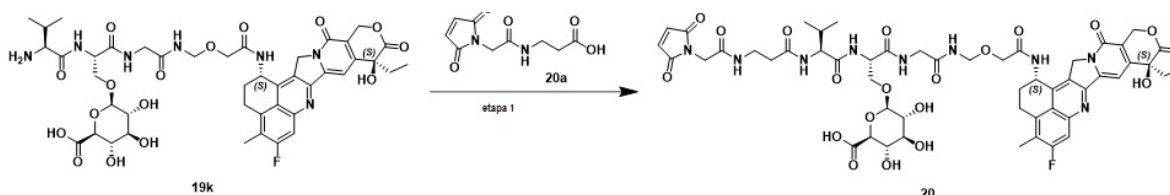
[0488] A la solución de **19I** (5,76 mg, 0,026 mmol) y HATU (9,576 mg, 0,025 mmol) en DMF seca (1 ml) era DIPEA (7,3 µl, 5,4 mg, 0,042 mmol), se agitó a r.t. durante 15 min. La solución se añadió gota a gota a la solución de **19k** (20 mg, 0,021 mmol) en DMF (1 ml), se agitó a r.t. durante 15 min. La solución se purificó mediante HPLC preparativa (FA) (método: columna XBridge Prep C18 OBD 5 µm 19*250 mm; fase móvil: A-agua (FA al 0,1 %): B-acetonitrilo; caudal: 20 ml/min, la fracción se liofilizó para obtener **19** (7,4 mg, 31,0 % de rendimiento) como un sólido blanco.

[0489] MS (ESI) *m/z*: 1135,4 [M+H]⁺

[0490] Ejemplo 20



[0491]



[0492] Etapa 1

[0493] Ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((*S*)-2-((*S*)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(((2-(((1*R*,9*R*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2*H*-piran-2-carboxílico (**20**)

[0494] El Compuesto **20** (12 mg, 50,1 % de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento sintético de la etapa 8 del ejemplo **19**.

[0495] MS (ESI) *m/z*: 1172,4 [M+Na]⁺

[0496] Preparación y caracterización de ADC

[0497] Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco

[0498] Preparación de conjugado de anticuerpo y fármaco DAR8

[0499] Se incubó anticuerpo en amortiguador de conjugación (con una concentración de 0,5-25 mg/ml, amortiguador PBS, pH de 6,0-8,5) a temperatura de reducción (0-40 °C) durante 10 min y 8-15 eq. Se añadió solución TECP (5 mM de solución madre en amortiguador PBS) a la
 5 mezcla de reacción y se dejó la reacción de reducción durante 1-8 horas a temperatura de reducción. Se añadieron en etapas disolvente orgánico (por ejemplo: DMSO, DMF, DMA, PG, acetonitrilo, 0-25 % v/v) y solución madre de conector y carga activa (10-25 eq, 10 mM de solución madre en disolvente orgánico) después de que se enfrió la mezcla de reducción a 0-25 °C. La solución de conjugación se dejó durante 1-3 h a 0-25 °C y la reacción se puede inactivar con N-
 10 acetilcisteína (1 mM de solución madre). La solución se sometió a intercambio de amortiguador (columna de desalinización por rotación, ultrafiltración y diálisis) en amortiguador de almacenamiento (por ejemplo: amortiguador de acetato de histidina con pH 5,5-6,5, con aditivos opcionales tales como sacarosa, trehalosa, tween 20, 60, 80).

[0500] Hidrólisis de maleimida después de la conjugación

[0501] Después de la etapa de conjugación, el ADC se sometió a un intercambio de amortiguador en amortiguador de apertura de anillo (pH 8,0~9,0, amortiguador de borato o Tris) y la solución se dejó a 22 o 37 °C durante 5~48 h. El proceso de apertura del anillo se controló mediante LCMS reducida. Al completar la hidrólisis de maleimida conjugada, los ADC resultantes se intercambiaron con amortiguador Tris básico con pH 8,0-8,5 o amortiguador ácido de histidina-
 20 acetato con pH 5,0-6,5 mediante diálisis.

[0502] Caracterización de ADC

[0503] Los ejemplos de ADC se prepararon siguiendo los procedimientos anteriores con perfil DAR 8. Todos los ADC se caracterizaron mediante los siguientes métodos analíticos.

[0504] La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) de los ADC se determinó mediante el
 25 método LCMS o el método HIC.

[0505] La pureza SEC de los ADC elaborados son todas > 95 % de pureza.

[0506] Determinación de la relación de fármaco a anticuerpo (DAR)

[0507] Método LCMS

[0508] El análisis LC-MS se llevó a cabo en las siguientes condiciones de medición:

[0509] Sistema LC-MS: Vanquish Flex UHPLC y espectrómetro de masas Orbitrap Exploris
 30 240

[0510] Columna: MAbPac™ RP, 2,1*50 mm, 4 μm, 1500 Å, Thermo Scientific™

[0511] Temperatura de columna: 80 °C

- [0512] Fase móvil A: solución acuosa de ácido fórmico (FA) al 0,1 %
- [0513] Fase móvil B: solución de acetonitrilo que contiene ácido fórmico (FA) al 0,1 %
- [0514] Programa de gradiente: 25 %B-25 %B (0 min-2 min), 25 %B-50 %B (2 min-18 min), 50 %B-90 %B (18 min-18,1 min), 90 % B-90 %B (18,1 min-20 min), 90 %B-25 %B (20 min-20,1 min), 25 %B-25 %B (20,1 min-25 min)
- 5 [0515] Cantidad de muestra inyectada: 1 µg
- [0516] Parámetros de MS: los datos de MS intactos y desnaturalizantes se adquirieron en modo HMR con una configuración de R = 15 k y se desconvolucionaron mediante el uso del algoritmo ReSpect™ y la integración de ventana deslizante en el software Thermo Scientific™
- 10 BioPharma Finder™ 4.0.
- [0517] **Método HIC**
- [0518] Se llevó a cabo un análisis de HPLC con las condiciones de medición siguientes:
- [0519] Sistema HPLC: Sistema de HPLC ACQUITY ARC de Waters
- [0520] Detector: longitud de onda de medición: 280 nm
- 15 [0521] Columna: columna de resina butílica no porosa de 2,5 µm, 4,6 µm ID×3,5 cm Tosoh Bioscience
- [0522] Temperatura de la columna: 25 °C
- [0523] Fase móvil A: sulfato de amonio 1,5 M, amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,0
- [0524] Fase móvil B: amortiguador fosfato 50 mM, isopropanol al 25 % (v/v), pH 7,0
- 20 [0525] Programa de gradiente: 0 %B-0 %B (0 min-2 min), 0 %B-100 %B (2 min-15 min), 100 %B-100 %B (15 min-16 min), 100 % B-0 %B (16 min-17 min), 0 %B-0 %B (17 min-20 min)
- [0526] Cantidad de muestra inyectada: 20 µg
- [0527] **Pureza de ADC**
- [0528] **Método SEC**
- 25 [0529] Se llevó a cabo un análisis de HPLC con las condiciones de medición siguientes:
- [0530] Sistema HPLC: Sistema UPLC Waters H-Class
- [0531] Detector: longitud de onda de medición: 280 nm
- [0532] Columna: ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1,7 µm 4,6x150 mm, Waters
- [0533] Temperatura de columna: temperatura ambiente
- 30 [0534] Fase móvil A: 200 mM de amortiguador de fosfato, 250 mM de cloruro de potasio, alcohol isopropílico al 15 %, PH 7,0
- [0535] Programa de gradiente: eluciones isocráticas de menos de 10 min con el caudal de 0,3 ml/min

[0536] Cantidad de muestra inyectada: 20 µg

[0537] **Evaluación de hidrofobicidad de ADC**

[0538] El ADC con propiedad más hidrófoba aparecería con un tiempo de retención posterior de cromatografía HIC (columna de interacción de hidrofobicidad). El pico DAR8 (anticuerpo con 8 cargas de fármaco) de los ADC de ejemplo para esta comparación.

[0539] Al comparar RT de D8 de HIC, se puede ver claramente que la hidrofobicidad del ADC se clasifica de la siguiente manera: ADC-C4 > ADC-C5 > ADC-C2 > ADC-C3 > ADC-C1. ADC-C1 aparece como la propiedad más hidrófoba en este conjunto.

[0540] **Método HIC**

10 [0541] Método 1

[0542] Se llevó a cabo un análisis de HPLC con las condiciones de medición siguientes:

[0543] Sistema HPLC: Sistema de HPLC ACQUITY ARC de Waters

[0544] Detector: longitud de onda de medición: 280 nm

[0545] Columna: columna de resina butílica no porosa de 2,5 µm, 4,6 µm ID×3,5 cm Tosoh
15 Bioscience

[0546] Temperatura de la columna: 25 °C

[0547] Fase móvil A: sulfato de amonio 1,5 M, amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,0

[0548] Fase móvil B: amortiguador fosfato 50 mM, isopropanol al 25 % (v/v), pH 7,0

[0549] Programa de gradiente: 0 %B-0 %B (0 min-2 min), 0 %B-100 %B (2 min-15 min), 100
20 %B-100 %B (15 min-16 min), 100 % B-0 %B (16 min-17 min), 0 %B-0 %B (17 min-20 min)

[0550] Cantidad de muestra inyectada: 20 µg

[0551] Método 2

[0552] Se llevó a cabo un análisis de HPLC con las condiciones de medición siguientes:

[0553] Sistema HPLC: Sistema de HPLC ACQUITY ARC de Waters

25 [0554] Detector: longitud de onda de medición: 280 nm

[0555] Columna: MABPac HIC-10, 5 µm, 4,6×10 mm (Thermo)

[0556] Temperatura de columna: 25 °C

[0557] Fase móvil A: sulfato de amonio 1,5 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0

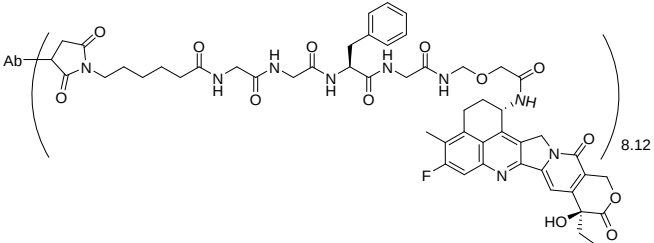
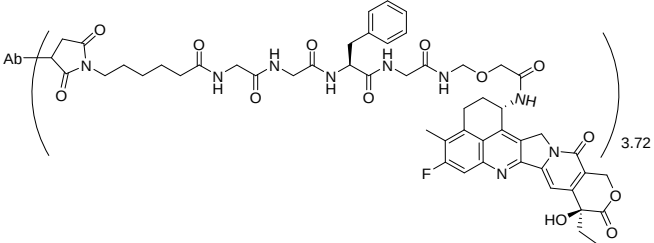
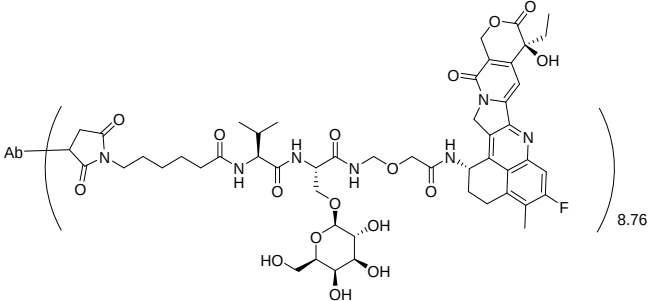
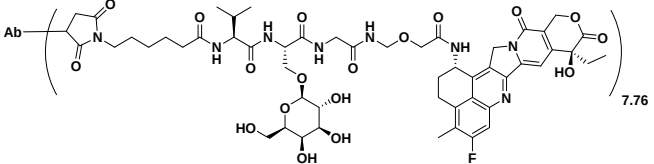
[0558] Fase móvil B: fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0

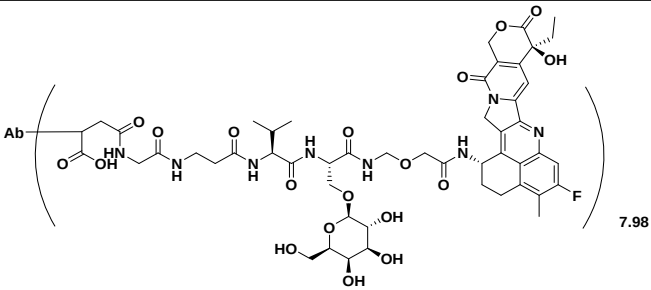
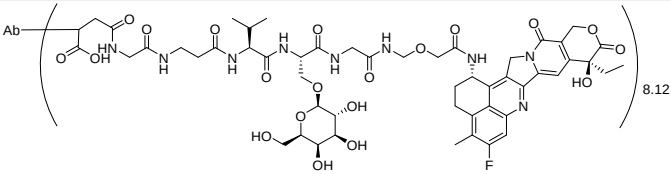
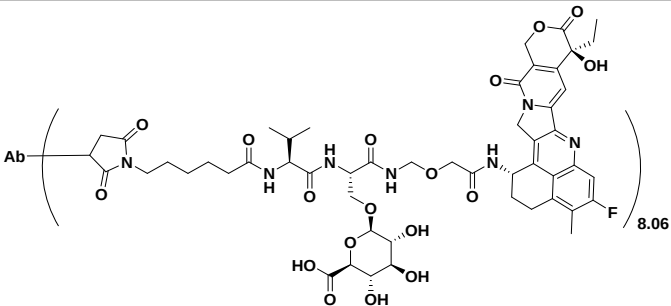
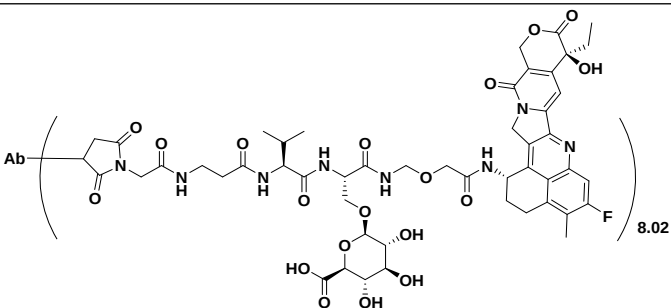
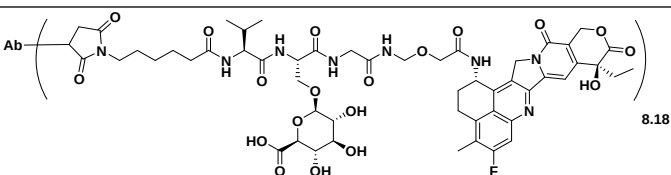
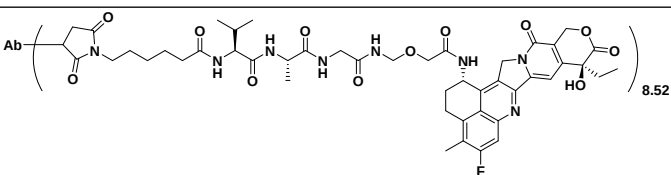
30 [0559] Programa de gradiente: 20 % B- 20 % B (0 min-1 min), 0 % B -0 % B (1 min-35 min),
20 % B-20 % B (35 min-40 min)

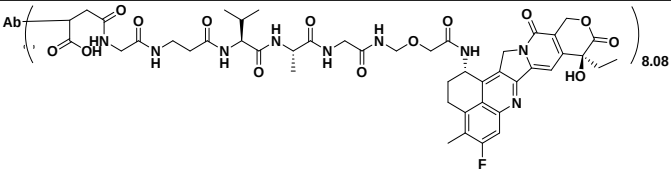
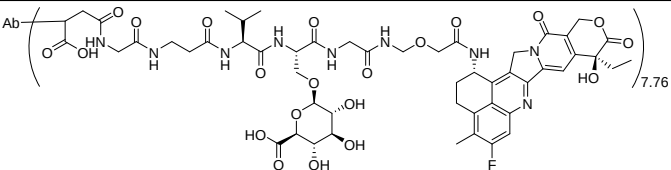
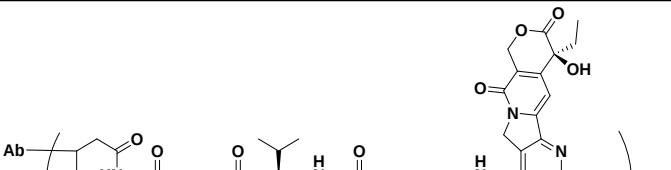
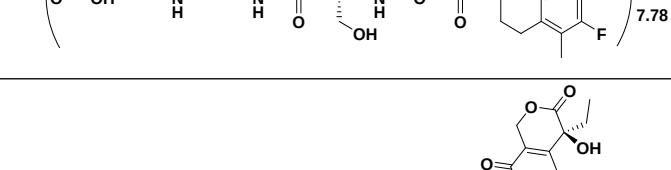
[0560] Caudal: 0,5 ml/min

[0561] Preparación de muestra: La muestra se diluyó con fase móvil inicial a 0,5 mg/ml.

[0562] Tabla 1. Ejemplos de ADC (con estructuras)

Ejemplo	Anticuerpo	Estructura de ADC	Pico DAR8 Tiempo de retención de HIC (min)
ADC-C1	Ifinatomab		Método 1: 10,860
ADC-C2	Ifinatomab		Método 1: 10,860
ADC-C3	Ifinatomab		Método 1: 9,725
ADC-C4	Ifinatomab		Método 1: 9,764

ADC-C5	Ifinatumab		Método 1: 9,898
ADC-C6	Ifinatumab		Método 1: 9,970
ADC-C7	Ifinatumab		Método 1: 9,675
ADC-C8	Ifinatumab		Método 1: 9,676
ADC-C9	Ifinatumab		Método 1: 9,698
ADC-C10	Ifinatumab		Método 1: 10,309

ADC-C11	Ifinatumab		Método 1: 10,299
ADC-C12	Ifinatumab		Método 1: 9,764
ADC-C13	Ifinatumab		Método 1: 10,105
ADC-C14	Ifinatumab		Método 1: 10,235

[0563] Todos los ADC parecen ser más hidrófilos que ADC-C1 según el tiempo de retención de especie DAR8 de perfiles HIC.

[0564] Secuencia primaria de Ifinatumab

[0565] Cadena

pesada:

5 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNHYMHWRQAPGQGLEWMGYINPYNDDEVKYN
 EKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGYYSPLYFDYWGQGTLVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 10 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK

[0566] Cadena

ligera:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSG

SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
 EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0567] Ensayo de destrucción celular de ADC

5 **[0568] Información de estirpe celular**

Celúla	Fuente	Nivel TAA
H358	ATCC	Alto
H441	ATCC	Medio
H1048	ATCC	Medio a bajo
MDA-MB-453	SIBS	Negativo

[0569] Método de ensayo

[0570] Siembra de células H358 (1E3/pocillo), H441 (1E3/pocillo), H1048 (1E3/pocillo) y MDA-MB-453 (1E3/pocillo) en una placa 3D de 96 pocillos (Corning: 4520), 80 ul/pocillo. Incubación a 37 °C, CO₂ al 5 %, durante la noche.

- 10 **[0571]** Añadir el medio de crecimiento recién preparado que contiene las diferentes concentraciones de ADC, 40 ul/pocillo en H358, H441, H1048 y MDA-MB-453.

[0572] Incubación a 37 °C, CO₂ al 5 %, 6 días.

[0573] La viabilidad de las células H358, H441, H1048 y MDA-MB-453 se detectó mediante reactivo 3D (Promega, G9683), 100 ul/pocillo de reactivo 3D.

- 15 **[0574]** Incubar las placas 3D a temperatura ambiente durante 30 minutos para estabilizar la señal luminiscente.

[0575] Analizar con lector de microplacas.

[0576] Resultados de ensayo de destrucción celular

[0577] Conjunto de datos 1

Ejemplo	H358		H441		H1048		MDA-MB-453	
	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)
ADC-C1	0,022	72	2,201	100	0,034	96	>100	/
ADC-C10	0,025	66	1,073	100	0,029	96	22	/
ADC-	0,027	72	1,234	100	0,025	94	>100	/

C11								
ADC-C13	0,01	73	0,861	100	0,014	95	>100	/
ADC-C14	0,033	64	0,511	100	0,056	100	>100	/

[0578] Con el diseño de conector de liberación en tándem, las destrucciones celulares de ADC-C1, ADC-C10, ADC-C11, ADC-C13 y ADC-C14 parecen ser similares a las de ADC-C1, lo que indica una liberación eficiente de la carga activa dentro de las células (Figura 2, Figura 3, Figura 4 y Figura 5).

5 **[0579] Conjunto de datos 2**

Ejemplo	H358		H441		H1048		MDA-MB-453	
	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)
ADC-C1	0,022	72	3,764	100	0,034	96	>100	/
ADC-C3	0,018	74	3,291	100	0,008	97	>100	/
ADC-C4	0,022	61	2,291	94	0,018	100	>100	/
ADC-C5	0,074	60	1,245	95	0,038	98	>100	/
ADC-C6	0,038	65	0,5298	96	0,013	95	>100	/

[0580] Con el diseño de conector de liberación en tándem, las destrucciones celulares de ADC-C1, ADC-C3, ADC-C4, ADC-C5 y ADC-C6 parecen ser similares a las de ADC-C1, lo que indica una liberación eficiente de la carga activa dentro de las células (Figura 6, Figura 7, Figura 8 y Figura 9).

10 **[0581] Conjunto de datos 3**

Ejempl o	H358		H441		H1048		MDA-MB-453	
	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)
ADC-C1	0,022	72	2,087	100	0,034	99	>100	/
ADC-	0,03	64	0,89	100	0,00	97	>100	/

C7	8		4		7			
ADC-C8	0,04 3	68	1,04 2	100	0,01 5	94	>100	/
ADC-C9	0,03 3	68	1,64 7	100	0,02 4	98	>100	/
ADC-C12	0,02 9	63	1,09 4	100	0,03 4	99	>100	/

[0582] Con el diseño de conector de liberación en tándem, las destrucciones celulares de ADC-C1, ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 parecen ser similares a las de ADC-C1, lo que indica una liberación eficiente de la carga activa dentro de las células (Figura 10, Figura 11, Figura 12 y Figura 13).

5 **[0583] Estudio de liberación enzimática de ADC**

Nombre	Proveedor	Cat núm.	Lote núm.	Unidades
Catepsina B de hígado humano	Sigma	C8571-25UG	SLCH4801	1500 unidades/mg
Lisosomas hepáticos de género mixto	XENOTECH	H0610.L-0,25 ml	-	2,5 mg/ml

[0584] Protocolo de ensayo

[0585] 1. Se preparó una solución de acetato de sodio de 50 mM (pH 5,0) y después se añadió TCEP para hacer que la concentración de TCEP fuera de 2 mM para obtener la solución de reacción.

10 **[0586]** 2. Se usó una solución de reacción para diluir el ADC y el lisosoma hasta una concentración final de 1 uM para el ADC y 0,125 mg/ml para el lisosoma (o 20 unidades/ml de Catepsina B). Se prepararon 5 copias de la muestra en paralelo para cada ADC con un volumen final de 100 ul.

15 **[0587]** 3. Las muestras preparadas en paralelo se incubaron a 37 °C y se añadieron 200 ul de acetonitrilo frío (incluido el patrón interno) a las 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h y 6 h para finalizar la reacción.

[0588] 4. Después de la centrifugación, se tomaron 200 ul de sobrenadante para análisis de LC-MS para detectar la carga activa libre y calcular la velocidad de liberación de carga activa.

20 **[0589]** Velocidad de liberación de carga activa (%) = (la concentración de DXd en el sobrenadante/el MW de DXd)/(la concentración de ADC/el MW de ADC)*DAR*100

[0590] Resultados**[0591] Grupo 1****[0592] Liberación de carga activa en tratamiento con lisosomas:**

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con lisosomas				
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	6 h
ADC-C1	0,5	8,26	13,28	23,35	49,70
ADC-C10	0	0,04	0,07	0,15	0,29
ADC-C11	0,03	0,05	0,06	0,11	0,36
ADC-C13	0,15	1,40	3,28	8,30	24,77
ADC-C14	0,23	8,23	14,10	26,26	55,94

5 **[0593]** El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C10, ADC-C11, ADC-C13 y ADC-C14 en tratamiento con lisosomas puede consultarse en la Figura 14.

[0594] La velocidad de liberación de carga activa de ADC-C14 y ADC-C1 es más rápida que la de ADC-C13 y mucho más rápida que la de ADC-C10 y ADC-C11 en el lisosoma.

[0595] Liberación de carga activa en tratamiento con Catepsina B:

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con Catepsina B				
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	6 h
ADC-C1	0,19	1,17	2,18	4,76	20,74
ADC-C10	0,03	0,06	0,08	0,16	0,32
ADC-C11	0,03	0,05	0,06	0,11	0,36
ADC-C13	0,04	0,11	0,36	1,08	2,07
ADC-C14	0,06	0,56	1,01	3,25	11,00

10 **[0596]** El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C10, ADC-C11, ADC-C13 y ADC-C14 en tratamiento con Catepsina B puede consultarse en la Figura 15.

[0597] La velocidad de liberación de carga activa de ADC-C1 es más rápida que la de ADC-C14 y mucho más rápida que la de ADC-C13, ADC-C10 y ADC-C11 en tratamiento con catepsina B. En la Figura 1 se muestra un modelo de liberación en tándem de ADC.

[0598] Grupo 2

15 **[0599] Liberación de carga activa en tratamiento con lisosomas:**

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con lisosomas				
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	6 h
ADC-C1	0,5	8,26	13,28	23,35	49,70

ADC-C3	0,23	2,39	5,58	13,75	40,92
ADC-C4	0,03	0,03	0,03	0,06	0,33
ADC-C5	0,15	0,27	0,51	1,8	5,13
ADC-C6	0,00	0,00	0,03	0,05	0,18

[0600] El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C3, ADC-C4, ADC-C5 y ADC-C6 en tratamiento con lisosomas puede consultarse en la Figura 16.

[0601] La velocidad de liberación de carga activa de ADC-C1 y ADC-C3 es más rápida que la de ADC-C5 y mucho más rápida que la de ADC-C4 y C6 en tratamiento con lisosomas. Se sospechó que el evento de desconjugación de ADC-C3 podría ocurrir en este ensayo con lisosomas y que la carga activa de conector no conjugado es más vulnerable a la escisión enzimática que la conjugada. Por lo tanto, se observó una mayor liberación de carga activa en ADC-C3 que en ADC-C5. Aunque ADC-C4 y ADC-C6 demostraron una velocidad de liberación de carga activa de DXd más lenta en esta condición de ensayo, ambos ADC han demostrado actividades de destrucción celular comparables y todos los ADC indicaron que se produjo una liberación de carga activa eficiente en un entorno celular *in vitro*. En la Figura 8 se muestra un modelo de liberación en tándem de ADC.

[0602] Liberación de carga activa en tratamiento con Catepsina B:

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con Catepsina B				
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	6 h
ADC-C1	0,19	1,17	2,18	4,76	20,74
ADC-C3	0,06	0,37	2,24	4,31	10,12
ADC-C4	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03
ADC-C5	0,08	0,10	0,15	0,21	0,65
ADC-C6	0,00	0,00	0,02	0,03	0,05

[0603] El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C3, ADC-C4, ADC-C5 y ADC-C6 en tratamiento con Catepsina B puede consultarse en la Figura 17.

[0604] La velocidad de liberación de carga activa de ADC-C1 es más rápida que la de ADC-C3 y mucho más rápida que la de ADC-C5, ADC-C4 y ADC-C6 en tratamiento con catepsina B. Existe abundante b-galactosidasa en el lisosoma y reconoce el resto de b-galactosa para desencadenar la escisión del enlace C-O del glicano (*J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6290-6297, *Chem. Commun.* **2021** Spring DR et al.). En la Figura 8 se muestra un modelo de liberación en tándem de ADC.

[0605] Grupo 3**[0606] Liberación de carga activa en tratamiento con lisosomas:**

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con lisosomas				
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	6 h
ADC-C1	0,5	8,26	13,28	23,35	49,70
ADC-C7	0,1	0,23	0,61	2,11	16,01
ADC-C8	0,07	0,09	0,17	0,63	5,60
ADC-C9	0,02	0,03	0,05	0,08	0,38
ADC-C12	0,03	0,04	0,06	0,06	0,15

[0607] El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 en tratamiento con lisosomas puede consultarse en la Figura 18.

- 5 **[0608]** La velocidad de liberación de carga activa de ADC-C1 es más rápida que la de ADC-C7 y mucho más rápida que la de ADC-C8, ADC-C9 y C12 en tratamiento con lisosomas. Se sospechó que el evento de desconjugación de ADC-C7 podría ocurrir en este ensayo con lisosomas y que la carga activa de conector no conjugado es más vulnerable a la escisión enzimática que la conjugada. Por lo tanto, se observó una mayor liberación de carga activa en
- 10 ADC-C7 que en ADC-C8. Aunque ADC-C8, ADC-C9, ADC-C12 demostraron una velocidad de liberación de carga activa de DXd más lenta en esta condición de ensayo, ambos ADC han demostrado actividades de destrucción celular comparables y todos los ADC indicaron que se produjo una liberación de carga activa eficiente en un entorno celular *in vitro*. En la Figura 1 se muestra un modelo de liberación en tándem de ADC.

15 **[0609] Liberación de carga activa en tratamiento con Catepsina B:**

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con Catepsina B				
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	6 h
ADC-C1	0,19	1,17	2,18	4,76	20,74
ADC-C7	0,04	0,10	0,16	0,23	0,45
ADC-C8	0,04	0,05	0,06	0,09	0,18
ADC-C9	0,00	0,00	0,00	0,03	0,06
ADC-C12	0,00	0,00	0,00	0,03	0,06

[0610] El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 en tratamiento con Catepsina B puede consultarse en la Figura 19.

[0611] La velocidad de liberación de carga activa de ADC-C1 es mucho más rápida que la

de ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 en tratamiento con catepsina B. Existe abundante glucuronidasa en el lisosoma y reconoce el resto de b-galactosa para desencadenar la escisión del enlace C-O del glicano en condiciones ácidas (*Euro. J. Med. Chem.* **2014** Papot S. *et al.*; *Mol. Can. Ther.* **2016** Lyon R. P. *et al.*). En la Figura 8 se muestra un modelo de liberación en tándem de ADC.

[0612] Estabilidad de plasma de ADC

[0613] Incubación de ADC con plasma

[0614] Diluir el ADC en plasma de ratón o humano para obtener una solución final de 100 µg/ml de ADC en plasma.

10 **[0615]** Incubar las muestras a 37 °C

[0616] Se tomaron alícuotas (100 µl) en cuatro puntos temporales (0, 4, 24, 72, 96 o 168 h).

[0617] Las muestras se congelan a –80 °C hasta su análisis.

[0618] Las concentraciones de carga activa en plasma se llevaron a cabo en las siguientes condiciones de medición:

15 **[0619]** Instrumento: LC-MS/MS (Triple Quad 5500)

[0620] Monitor: MRM

[0621] Columna: Advanced Materials Technology, HALO AQ-C18 2,7 µm 90 Å, 50*2,1 mm

[0622] Temperatura de columna: 40 °C

[0623] Fase móvil A: H₂O-FA al 0,1 %

20 **[0624]** Fase móvil B: ACN-FA al 0,1%

[0625] Programa de gradiente para DXd: 20 %B-20 %B (0 min-0,2 min), 20 %B-80 %B (0,2 min-1,5 min), 80 %B-80 %B (1,5 min-2,2 min), 80 %B-20 %B (2,20 min-2,21 min), 20 %B-20 %B (2,21 min-3,0 min); Programa de gradiente para Dxd: 2 %B-2 %B (0 min-0,2 min), 2 %B-98 %B (0,2 min-1,2 min), 98 %B-98 %B (1,2 min-2,0 min), 98 %B-2 %B (2,0 min-2,01 min), 2 %B-2 %B (2,01 min-4,0 min);

[0626] Cantidad de muestra inyectada: 10 µl

[0627] Las concentraciones de ADC en plasma y Ab total (Tab) se llevaron a cabo en las siguientes condiciones de medición:

[0628] Ensayo: ensayo de unión de ligando (ELISA)

30 **[0629]** Reactivo de captura: B7H3 ECD

[0630] Reactivo de detección: Ab anti-carga activa para ADC y Ab policlonal anti-IgG humana para Ab total.

[0631] Resultados

[0632] Liberación de carga activa en plasma humano**[0633] Grupo 1**

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con plasma humano				
	0 h	4 h	24 h	72 h	168 h
ADC-C1	0,008	0,015	0,072	0,195	0,283
ADC-C10	0,063	0,081	0,184	0,290	0,438
ADC-C11	0,08	0,020	0,039	0,089	0,171
ADC-C13	0,012	0,013	0,022	0,040	0,100
ADC-C14	BLQ	BLQ	0,066	0,122	0,233

[0634] El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C10, ADC-C11, ADC-C13 y ADC-C14 puede consultarse en la Figura 20.

- 5 **[0635]** Todos los ADC han mostrado una velocidad de liberación de carga activa comparable y aceptable (<5 % después de 168 h).

[0636] Grupo 2

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con plasma humano				
	0 h	4 h	24 h	72 h	168 h
ADC-C1	0,008	0,015	0,072	0,195	0,283
ADC-C3	BLQ	0,015	0,035	0,082	0,153
ADC-C4	BLQ	0,012	0,029	0,063	0,220
ADC-C5	BLQ	0,015	0,025	0,048	0,133
ADC-C6	BLQ	0,018	0,026	0,049	0,142

[0637] El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C3, ADC-C4, ADC-C5 y ADC-C6 puede consultarse en la Figura 21.

- 10 **[0638]** Todos los ADC han mostrado una velocidad de liberación de carga activa comparable y aceptable (< 5 % después de 168 h).

[0639] Grupo 3

Ejemplo	Velocidad de liberación de DXd (%) en tratamiento con plasma humano				
	0 h	4 h	24 h	72 h	168 h
ADC-C1	0,008	0,015	0,072	0,195	0,283
ADC-C7	BLQ	BLQ	0,015	0,051	0,130
ADC-C8	BLQ	0,008	0,031	0,066	0,108
ADC-C9	0,063	0,081	0,184	0,290	0,438

ADC-C12	0,010	0,016	0,056	0,103	0,144
---------	-------	-------	-------	-------	-------

[0640] El perfil de liberación de carga activa de ADC-C1, ADC-C7, ADC-C8, ADC-C9 y ADC-C12 puede consultarse en la Figura 22.

[0641] Todos los ADC han mostrado una velocidad de liberación de carga activa comparable y aceptable (< 5 % después de 168 h).

5 **[0642] Métodos de eficacia en el modelo H1975 modelos actualizados**

[0643] A ratones lampiños BALB/c hembra se les implantaron por vía subcutánea 5×10^6 células H1975 por 200 μ l de PBS/matrigel en el flanco derecho. Después de la inoculación, los volúmenes tumorales se determinaron dos veces por semana en dos dimensiones usando un calibrador, y se expresaron en mm³ mediante la fórmula: $V = 0,5(a \times b^2)$ donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 100-200 mm³ de tamaño, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos y fueron tratados por vía intravenosa con vehículo o ADC a 3 o 10 mg/kg una vez por semana, respectivamente. La regresión parcial (PR) se definió como un volumen tumoral inferior a 50 % del volumen tumoral de partida el primer día de tratamiento en tres determinaciones consecutivas y la regresión completa (CR) se definió como un volumen tumoral inferior a 14 mm³ en tres mediciones consecutivas. Los datos se presentan como volumen tumoral medio $\pm$ error estándar de la media (SEM). La inhibición del crecimiento tumoral (ITG) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición del crecimiento} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{(\text{tratado } t) - (\text{tratado } t_0)}{(\text{placebo } t) - (\text{placebo } t_0)} \right) \right)$$

[0644]

20 **[0645]** tratado t = volumen del tumor tratado en el tiempo t

[0646] tratado t₀ = volumen del tumor tratado en el tiempo 0

[0647] placebo t = volumen del tumor del placebo en el tiempo t

[0648] placebo t₀ = volumen del tumor del placebo en el tiempo 0

[0649] Métodos de eficacia en el modelo H1650

25 **[0650]** A ratones lampiños BALB/c hembra se les implantaron por vía subcutánea 3×10^6 células H1650 por 200 μ l de PBS/matrigel en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 100-200 mm³ de tamaño, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos y fueron tratados por vía intravenosa con vehículo, ADC a 10 mg/kg una vez por semana, respectivamente.

[0651] Métodos de eficacia en el modelo H441

[0652] A ratones NOG hembra se les implantaron por vía subcutánea 5×10^6 células H441 por 300 μ l de PBS/matrigel en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 100-200 mm³ de tamaño, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos y fueron tratados por vía intravenosa con vehículo, ADC a 10 mg/kg una vez por semana, respectivamente.

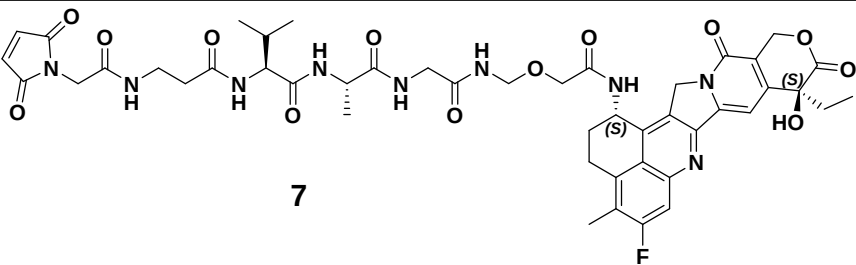
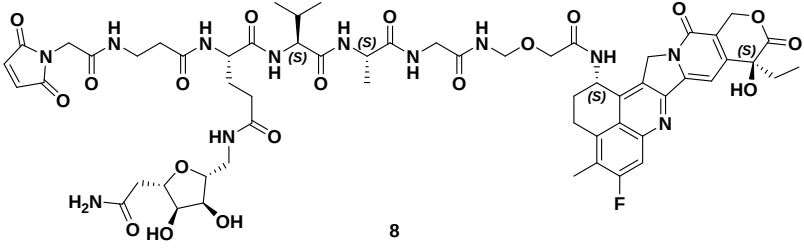
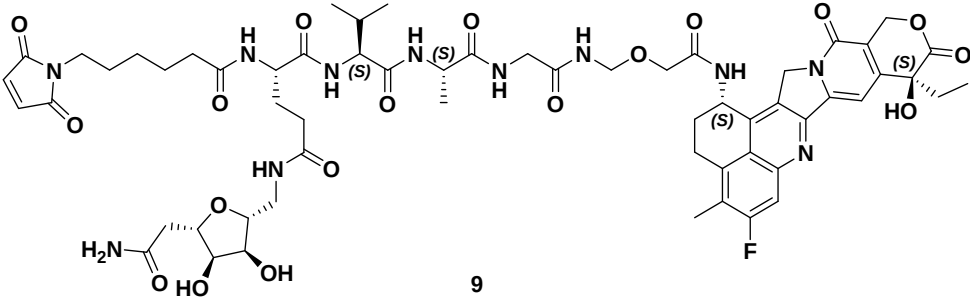
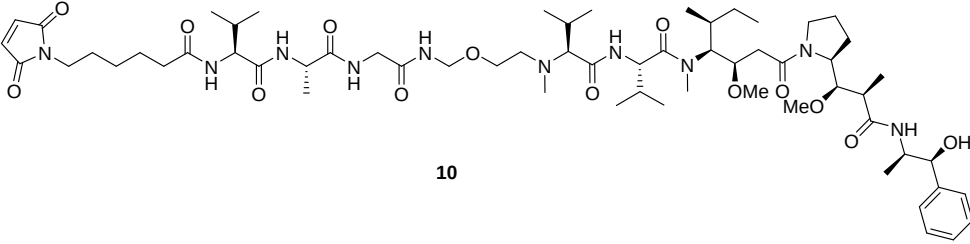
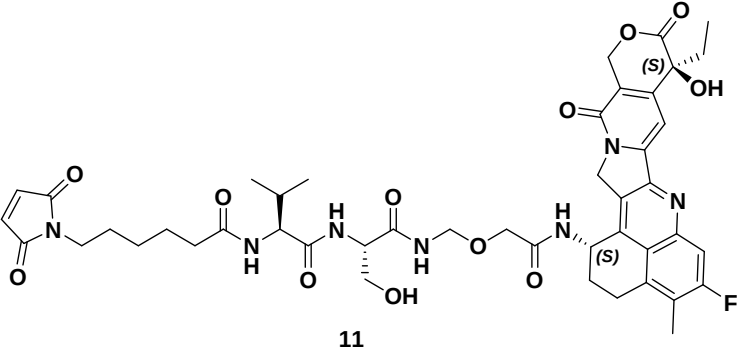
[0653] En estudio de PK en ratones

[0654] Se extrajeron muestras de sangre a las 0, 2, 4, 8, 24, 72 y 168 h después de la administración intravenosa de 10 mg/kg de ADC de ratones portadores de tumores A375, seguido de centrifugación (4 °C, 3000 $\times$ g, 7 min) para separar el plasma. Las concentraciones de ADC y Abs totales se midieron mediante métodos de unión de ligando Meso Scale Discovery (MSD) desarrollados internamente. En resumen, se usó la proteína de fusión del dominio extracelular B7H3 marcada con His como reactivo de captura, el Ab anti-DXd marcado con biotina o el Ab kappa caprino anti-humano se usaron como reactivos de detección para los ADC o la medición de Ab totales, respectivamente.

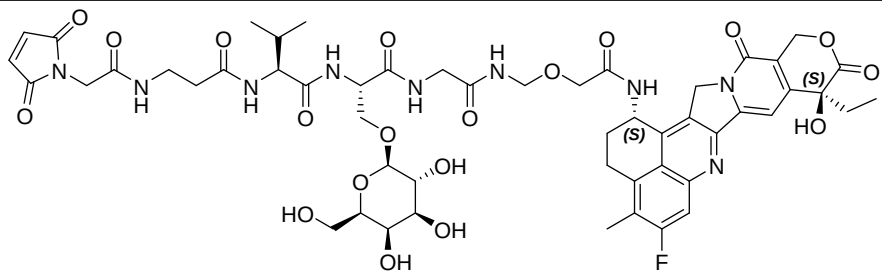
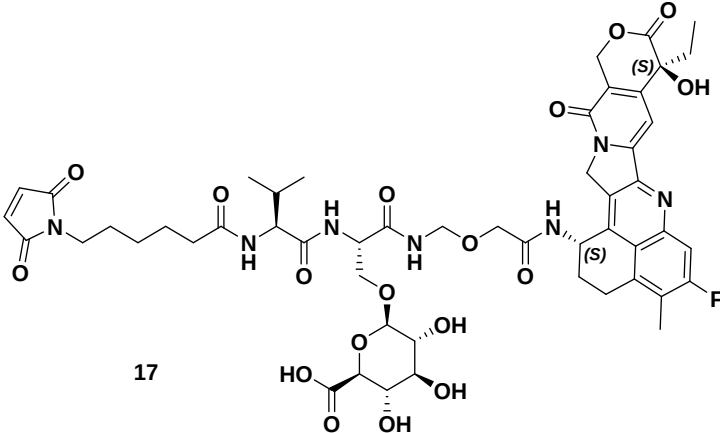
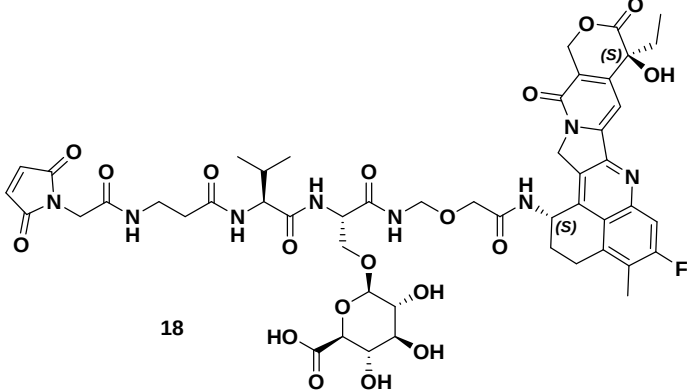
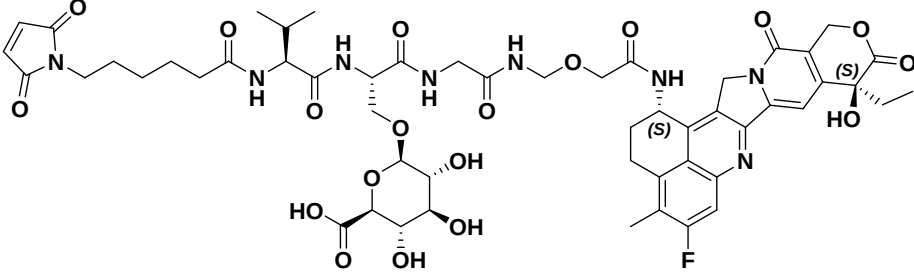
[0655] Los anticuerpos usados en el presente documento se prepararon de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, construcción de vectores, transfección de células eucariotas tales como la transfección de células HEK293 (Life Technologies cat. núm. 11625019), purificación y expresión. Las secuencias de los anticuerpos usados en el presente documento se pueden encontrar como se proporciona en el presente documento.

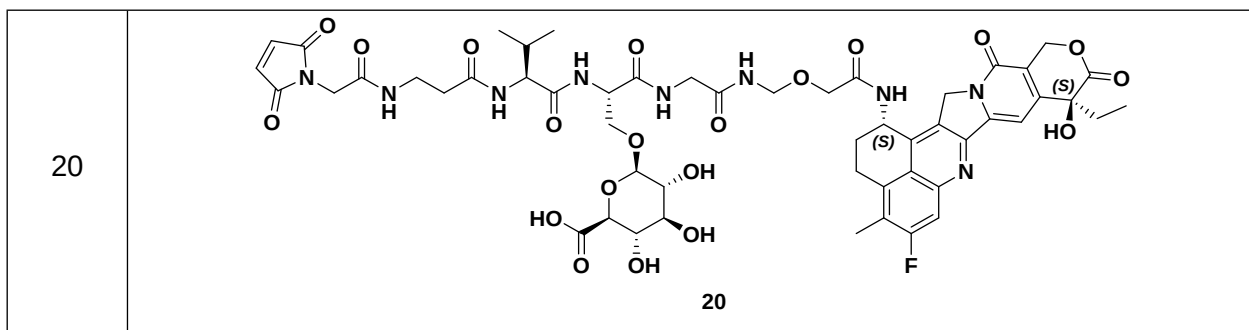
[0656] Tabla 2. Ejemplos de plataformas

Comp. núm.	Estructura de carga activa de conector
6	6

7	 7
8	 8
9	 9
10	 10
11	 11

12	12
13	13
14	14
15	15

16	 16
17	 17
18	 18
19	 19



[0657] La invención se describe generalmente en el presente documento mediante el uso de lenguaje afirmativo para describir las diversas modalidades. La invención también incluye específicamente modalidades en las que se excluye, total o parcialmente, una materia particular, tal como sustancias o materiales, etapas del método y condiciones, protocolos, procedimientos, ensayos o análisis. Por lo tanto, aunque la invención generalmente no se expresa en el presente documento en términos de lo que la invención no incluye; no obstante, aspectos que no están expresamente incluidos en la invención se describen en el presente documento.

[0658] Si bien la invención que antecede se describió con ciertos detalles a modo de ejemplo e ilustración para una mayor comprensión, los expertos en la técnica entenderán que pueden realizarse determinados cambios y modificaciones menores. Por lo tanto, la descripción y los ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

[0659] Debe entenderse que, si en el presente documento se hace referencia a cualquier publicación del estado de la técnica; dicha referencia no constituye una admisión de que la publicación forma parte del conocimiento general común en la técnica en cualquier país.

[0660] Se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad las descripciones de todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y solicitudes de patente publicadas a las que se hace referencia en el presente documento a través de una cita que las identifica.