CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO INHIBIDORES DE MCL-1 Y SUS MÉTODOS DE USO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[01] Esta solicitud invoca el beneficio y la prioridad de la fecha de presentación según el artículo §119(e), 35 del U.S.C. de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nro.: 62/850.098, presentada el 20 de mayo de 2019, cuyo contenido se incorpora por completo en la presente a modo de referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 25 de junio de 2020, se nombró como 1320743-00220:SL.txt y tiene un tamaño de 76.528 bytes.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[02] La presente divulgación se relaciona con conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un inhibidor de Mcl-1 y un anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a un antígeno blanco, por ejemplo, un antígeno expresado sobre una célula tumoral u otra célula cancerosa. La divulgación también se relaciona con métodos y composiciones que son de utilidad en el tratamiento y/o diagnóstico de cánceres que expresan el antígeno blanco anti-CD74 y/o que son susceptibles al tratamiento mediante modulación de la expresión y/o actividad de Mcl-1, así como métodos para elaborar dichas composiciones. También se divulgan conjugados de conector-fármaco que comprenden una unidad de un fármaco inhibidor de Mcl-1 y métodos para su elaboración.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[03] La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico que es crucial para el desarrollo embrionario y el mantenimiento d la homeostasis tisular. La muerte celular tipo apoptótica en general comprende cambios morfológicos, tales como condensación del núcleo y fragmentación de ADN, así como cambios bioquímicos, tal como la activación de caspasas, que pueden causar daños en componentes estructurales clave de la célula. La regulación de la apoptosis es compleja y típicamente comprende activación o represión de varias vías de señalización intracelulares (Cory et al., (2002) *Nature Review Cancer* 2: 647-656).

[04] La desregulación de la apoptosis está asociado con algunas patologías. Por ejemplo, una apoptosis aumentada está asociada con enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer e isquemia. Por el contrario, los déficits de apoptosis cumplirían una función en el desarrollo de cánceres y quimiorresistencia, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias e infecciones virales. La ausencia

de apoptosis es una de la características fenotípicas del cáncer (Hanahan et al., (2000) *Cell* 100: 57-70). Las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 están asociadas con numerosos tipos de cáncer, tales como cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de próstata, leucemia linfoide crónica, linfoma, mieloma y cáncer de páncreas.

[05] La leucemia de células mieloides 1 (Mcl-1), un miembro de la familia antiapoptótica Bcl-2, es un regulador de la supervivencia celular. Se ha observado amplificación del gen Mcl-1 y/o la sobreexpresión de la proteína Mcl-1 en múltiples tipos de cáncer y comúnmente están involucrados en el desarrollo de tumores (Beroukhim et al., (2010) Nature 463(7283): 899-905). El gen Mcl-1 es uno de los genes más frecuentemente amplificados en el cáncer en humanos y también constituye un factor de supervivencia crítico que según se ha demostrado interviene en la resistencia a fármacos para una variedad de agentes anticancerosos.

[06] Se cree que Mcl-1 promueve la supervivencia celular mediante la unión y neutralización de las actividades inductoras de muerte de las proteínas proapoptóticas tales como Bim, Noxa, Bak y Bax. La inhibición de Mcl-1 libera estas proteínas proapoptóticas, que a menudo conduce a una inducción de apoptosis en células tumorales dependientes de Mcl-1 para su supervivencia. El direccionamiento terapéutico de Mcl-1 o proteínas corriente arriba y/o corriente abajo en una vía de señalización apoptótica puede representar entonces estrategias prometedoras para el tratamiento de diversas formas malignas y para superar la resistencia a fármacos en determinados cánceres humanos.

[07] CD74 (DHLAG) es un objetivo establecido y atractivo para conjugados de anticuerpo-fármaco debido a su expresión restringida en tejidos normales y regulación positiva significativa en una gama de neoplasias hematológicas. CD74 funciona como un chaperón que es necesaria para el ensamblaje y el tráfico de complejos de MHC de clase II, así como un receptor para el receptor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). En oncología, se ha establecido que el CD74 está significativamente regulado al alza tanto en el nivel de ARN como de proteína en un rango de neoplasias malignas de células B y mieloides, incluyendo leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple y linfoma difuso de células B grandes. Además, se sabe que CD74 se internaliza rápidamente tras el acoplamiento de anticuerpos y el tráfico al lisosoma, así como que se repobla rápidamente en la superficie de las células tumorales después de la internalización. Se ha demostrado previamente que los anticuerpos y los conjugados de anticuerpo-fármaco dirigidos a CD74 demuestran actividad antitumoral en modelos preclínicos de cáncer.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[08] En algunas formas de realización, la presente divulgación provee, en parte, nuevos

compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) con actividad biológica contra células cancerosas. Los compuestos pueden retardar, inhibir y/o invertir el crecimiento de tumores en mamíferos, y/o pueden ser de utilidad para el tratamiento de pacientes humanos con cáncer. La presente divulgación se relaciona más específicamente, en algunas formas de realización, con compuestos de ADC capaces de unirse y matar a las células cancerosas. En algunas formas de realización, los compuestos de ADC divulgados en la presente comprenden un conector que une un inhibidor de Mcl-1 a un anticuerpo anti-CD74 de longitud completa o un fragmento de unión al antígeno. En algunas formas de realización, los compuestos de ADC también se pueden internalizar en una célula blanco después de la unión.

[09] En algunas formas de realización, los compuestos de ADC se pueden representar mediante la Fórmula (1):

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (1)

en donde Ab es un anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo dirigido a una célula cancerosa;

D es un inhibidor de Mcl-1;

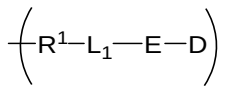
L es un conector que une Ab a D de manera covalente; y

p es un número entero de entre 1 y 16.

[10] En algunas formas de realización, *p* es un número entero de entre 1 y 8. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de entre 1 y 5. En algunas formas de realización, *p* es un número entero de entre 2 y 4. En algunas formas de realización, *p* es 2. En algunas formas de realización, *p* es 4. En algunas formas de realización, *p* se determina mediante cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS).

[11] En algunas formas de realización, el conector (L) comprende un grupo de unión, por lo menos un grupo espaciador y por lo menos un grupo escindible. En algunos casos, el grupo escindible comprende un grupo pirofosfato y/o un grupo autoescindible. En formas de realización específicas, L comprende un grupo de unión; por lo menos un grupo espaciador formador de puentes; y por lo menos un grupo escindible que comprende un grupo pirofosfato y/o un grupo autoescindible.

[12] En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende una unidad de conector-fármaco (o “conector-carga útil”); -(L-D) es de la fórmula (A):

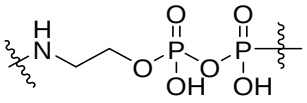


(A),

en donde R^1 es un grupo de unión, L_1 es un grupo espaciador formador de puentes y E es un grupo escindible.

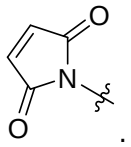
[13] En algunas formas de realización, el grupo escindible comprende un grupo pirofosfato.

En algunas formas de realización, el grupo escindible comprende:



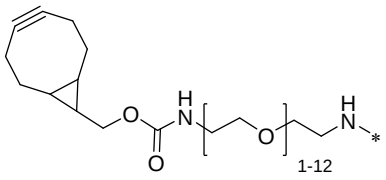
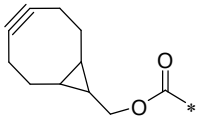
[14] En algunas formas de realización, el grupo espaciador formador de puentes comprende un grupo polioxietileno (PEG). En algunos casos, el grupo PEG se puede seleccionar entre PEG1, PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, PEG14 y PEG15. En algunas formas de realización, el grupo espaciador formador de puentes puede comprender: -CO-CH_2-CH_2-PEG12-. En otras formas de realización, el grupo espaciador formador de puentes comprende un grupo butanoílo, pentanoílo, hexanoílo, heptanoílo u octanoílo. En algunas formas de realización, el grupo espaciador formador de puentes comprende un grupo hexanoílo.

[15] En algunas formas de realización el grupo de unión se forma a partir de por lo menos un grupo reactivo seleccionado entre un grupo maleimida, un grupo tiol, un grupo ciclooctino y un grupo azida. Por ejemplo, grupo maleimida puede ser de la siguiente estructura:



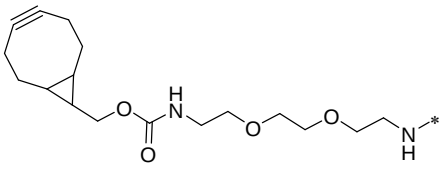
[16] El grupo azida puede ser de la siguiente estructura: -N=N^+=N^-.

[17] El grupo ciclooctino puede ser de la siguiente estructura:

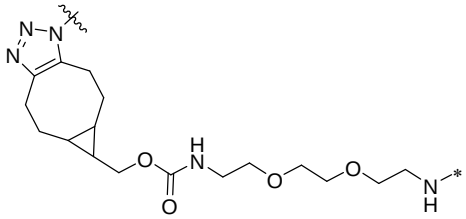
o , y en donde —* es una unión al anticuerpo .

[18] En algunos casos, el grupo ciclooctino tiene la estructura:

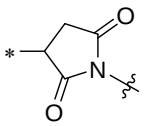


, y en donde —* es una unión al anticuerpo .

[19] En algunas formas de realización, el grupo de unión presenta una fórmula que comprende

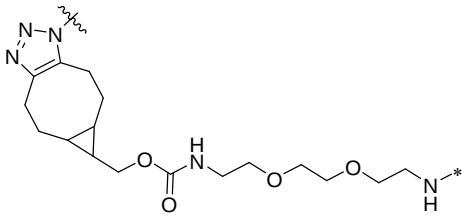
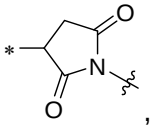


o



, y en donde —* es una unión al anticuerpo

[20] En algunas formas de realización, el anticuerpo está unido al conector (L) mediante un grupo de unión seleccionado entre:


y

,

en donde —* es una unión al anticuerpo , y en donde  es una unión al grupo espaciador formador de puentes.

[21] En algunas formas de realización, el grupo espaciador formador de puentes está unido a un grupo escindible.

[22] En algunas formas de realización, el grupo espaciador formador de puentes es -CO-CH_2-CH_2-PEG12-.

[23] En algunas formas de realización, el grupo escindible es -pirofosfato-CH_2-CH_2-NH_2-.

[24] En algunas formas de realización, el grupo escindible está unido al inhibidor de Mcl-1 (D).

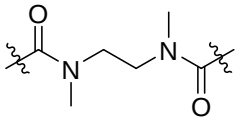
[25] En algunas formas de realización, el grupo escindible está unido grupo al inhibidor de Mcl-1 (D) a través de un grupo fenil-pirimidinilo.

[26] En algunas formas de realización, el conector comprende: un grupo de unión, por lo menos un grupo espaciador formador de puentes, un grupo peptídico y por lo menos un grupo escindible.

[27] En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende una unidad de conector-fármaco, -(L-D), es de la fórmula (B):

$$\left(-R^1\text{-}L_1\text{—}Lp\text{—}E\text{-}\left(L_2\right)_m\text{-}D\right) \quad \text{(B)},$$

en donde R^1 es un grupo de unión, L_1 es un espaciador formador de puentes, Lp es un grupo peptídico que comprende 1 a 6 residuos de aminoácidos, E es un grupo escindible, L_2 es un espaciador formador de puentes, m es 0 ó 1; y D es un inhibidor de Mcl-1. En algunos casos, m es 1 y el espaciador formador de puentes comprende:

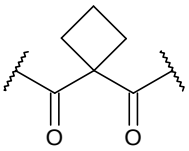

.

[28] En algunas formas de realización, dicho por lo menos un espaciador formador de puentes comprende un grupo PEG. En algunos casos, el grupo PEG se selecciona entre, PEG1, PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, PEG14 y PEG15. En algunos casos, dicho por lo menos un espaciador formador de

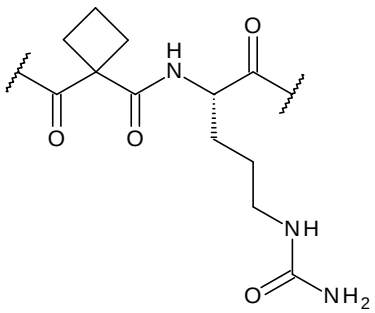
puentes se selecciona entre *-C(O)-CH_2-CH_2-PEG1-**, *-C(O)-CH_2-PEG3-**, *-C(O)-CH_2-CH_2-PEG12**, *-NH-CH_2-CH_2-PEG1-**, un grupo polihidroxialquilo y *-C(O)-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-C(O)-**, en donde ** indican el punto de unión directa o indirecta de dicho por lo menos un espaciador formador de puentes al grupo de unión y * indica el punto de unión directa o indirecta de dicho por lo menos un espaciador formador de puentes al grupo peptídico..

[29] En algunas formas de realización, L_1 se selecciona entre *-C(O)-CH_2-CH_2-PEG1-**, *-C(O)-CH_2-PEG3-**, *-C(O)-CH_2-CH_2-PEG12**, *-NH-CH_2-CH_2-PEG1-** y un grupo polihidroxialquilo, en donde ** indican el punto de unión directa o indirecta de L_1 a R^1 y * indica el punto de unión directa o indirecta de L_1 a Lp..

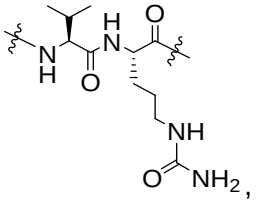
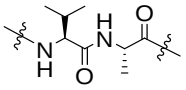
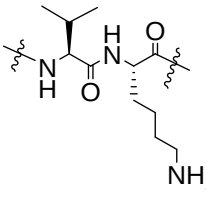
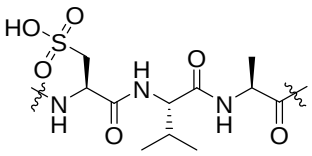
[30] En algunas formas de realización, m es 1 y L_2 es -C(O)-N(CH_3)-CH_2-CH_2-N(CH_3)-C(O)-.

[31] En algunas formas de realización, el grupo peptídico comprende 1 a 12 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el grupo peptídico (Lp) comprende 1 a 10 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el grupo peptídico (Lp) comprende 1 a 8 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el grupo peptídico (Lp) comprende 1 a 6 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el grupo peptídico comprende 1 a 4 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el grupo peptídico comprende 1 a 3 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización el grupo peptídico comprende 1 a 2 residuos de aminoácidos. En algunos casos, los residuos de aminoácidos se seleccionan entre L-glicina (Gly), L-valina (Val), L-citrulina (Cit), ácido L-cisteico (sulfo-Ala), L-lisina (Lys), L-isoleucina (Ile), L-fenilalanina (Phe), L-metionina (Met), L-asparagina (Asn), L-prolina (Pro), L-alanina (Ala), L-leucina (Leu), L-triptofano (Trp) y L-tirosina (Tyr). Por ejemplo, el grupo peptídico puede comprender Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys y/o sulfo-Ala-Val-Ala. En algunas formas de realización, el grupo peptídico (Lp) comprende 1 residuo de aminoácido unido a un grupo 

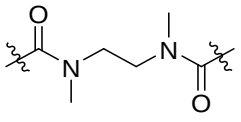
. En algunas formas de realización, el grupo peptídico (Lp) comprende un grupo seleccionado entre:



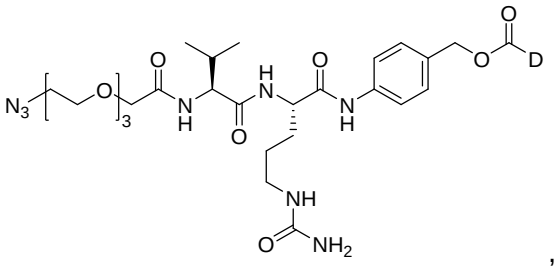
[32] En algunos casos, el grupo peptídico comprende un grupo seleccionado entre:

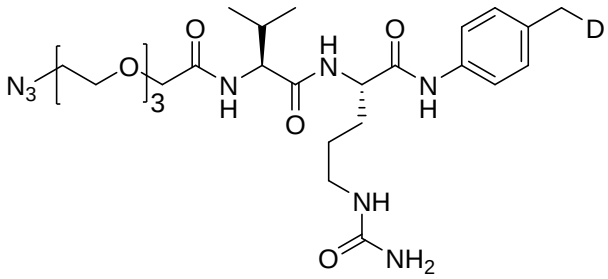
 ,  ,  , y  .

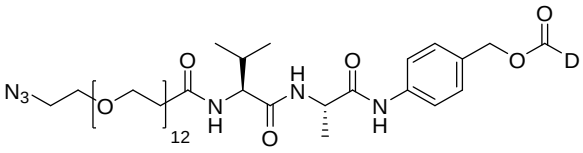
[33] En algunas formas de realización, el grupo autoescindible comprende para-aminobencil-carbamato, para-aminobencil-amonio, para-amino-(sulfo)bencil-amonio, para-amino-(sulfo)bencil-carbamato, para-amino-(alcoxi-PEG-alquil) bencil-carbamato, para-amino-(polihidroxicarboxitetrahidropiranil)alquil-bencil-carbamato o para-amino-(polihidroxicarboxitetrahidropiranil)alquil-bencil-amonio.

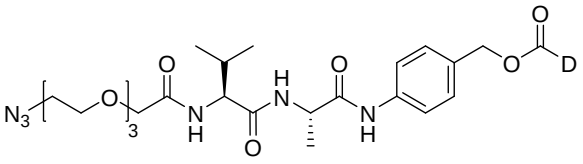
[34] En algunas formas de realización, m es 1 y el espaciador formador de puentes comprende  .

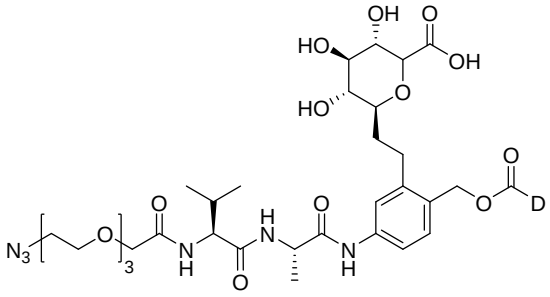
[35] En algunas formas de realización, la unidad de conector-fármaco, -(L-D), se forma a partir de un compuesto seleccionado entre:

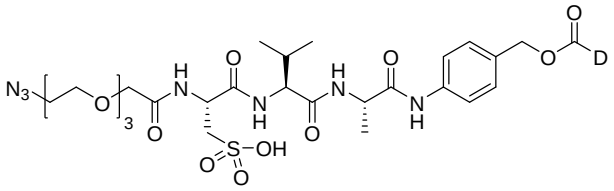
 ,

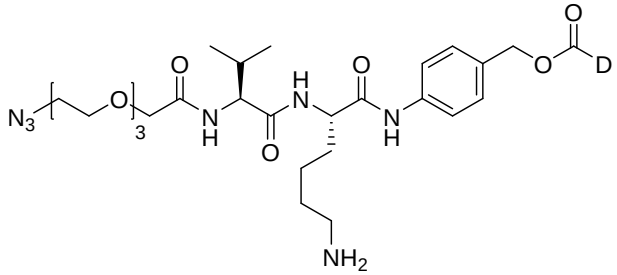
 ,

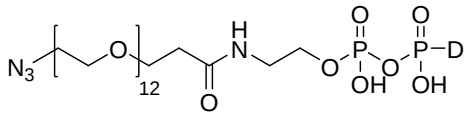
 ,

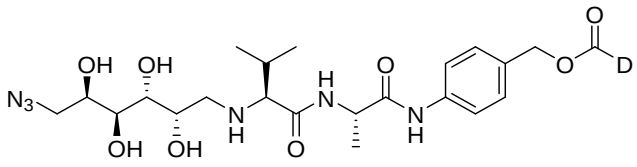
 ,

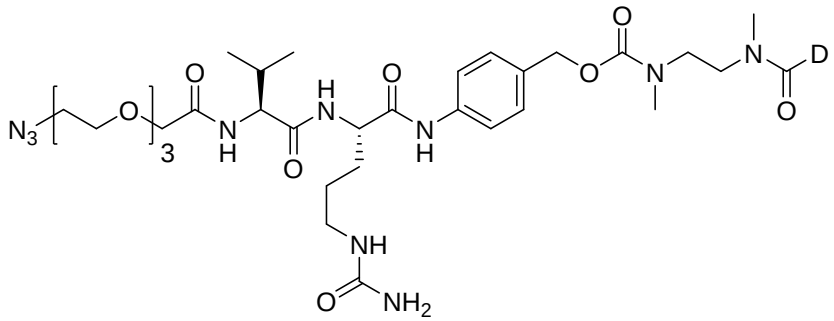

,

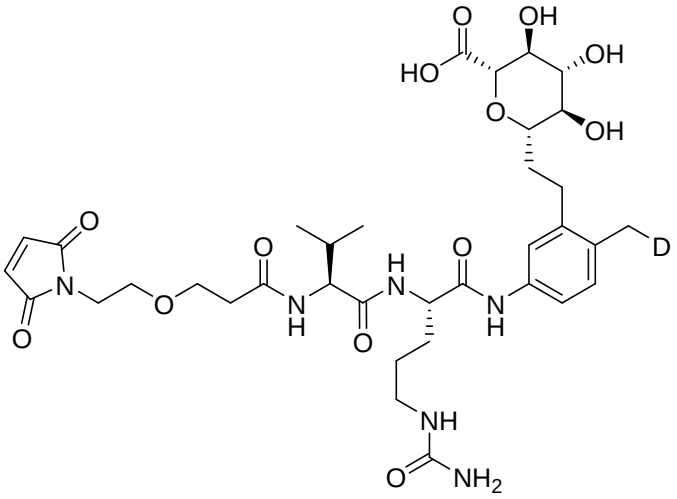
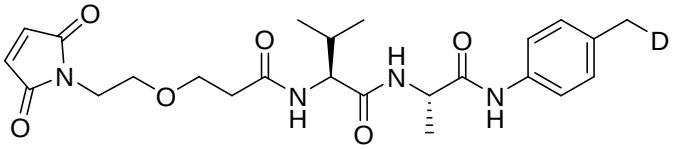
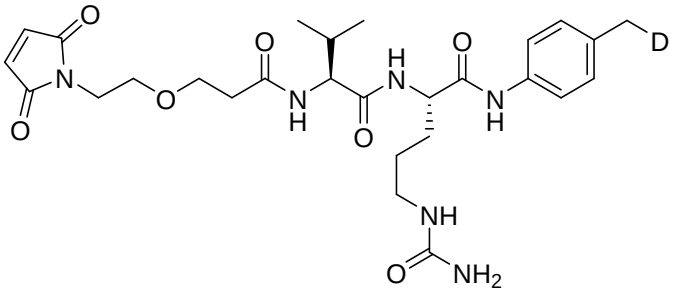
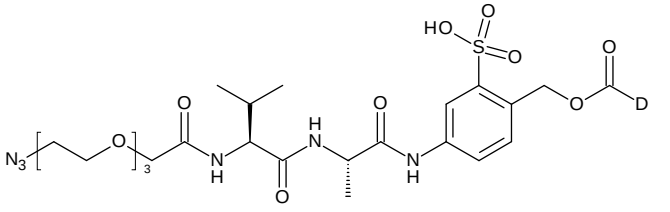
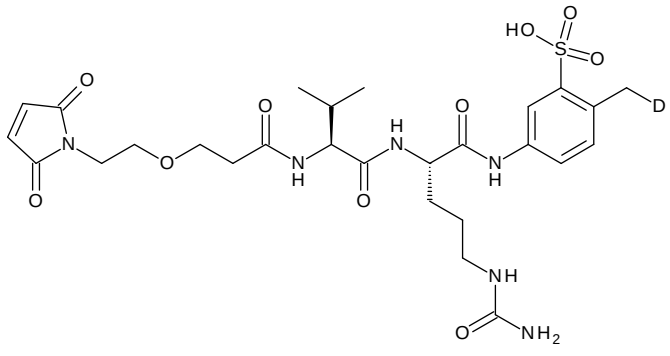

,

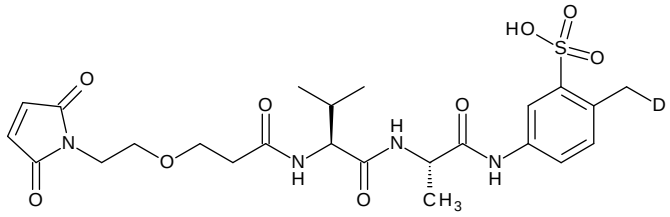

,


,

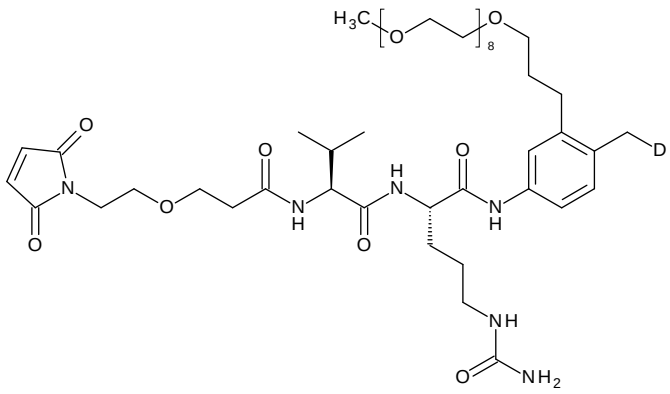

,


,

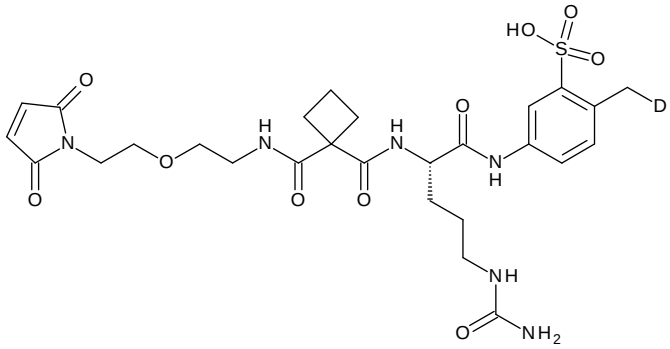

,

,

,

,

,



,

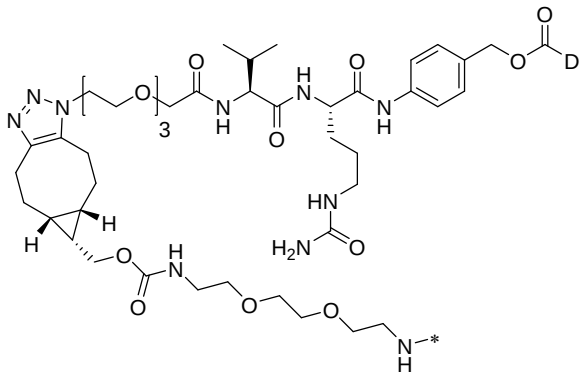


, y

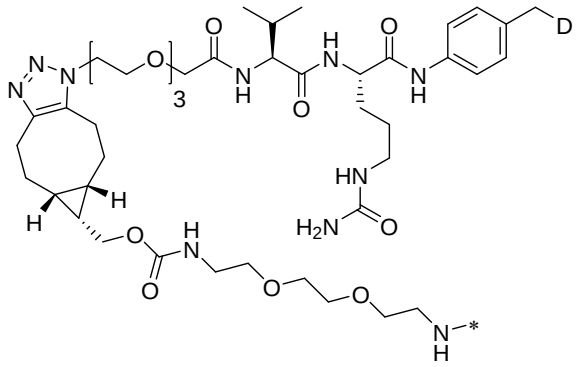


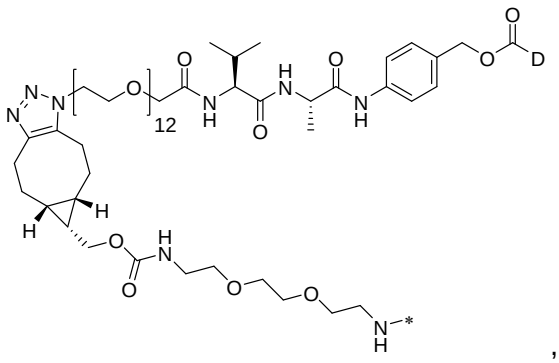
.

[36] En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende al grupo de conector-fármaco, -(L-D), que comprende una fórmula seleccionada entre:

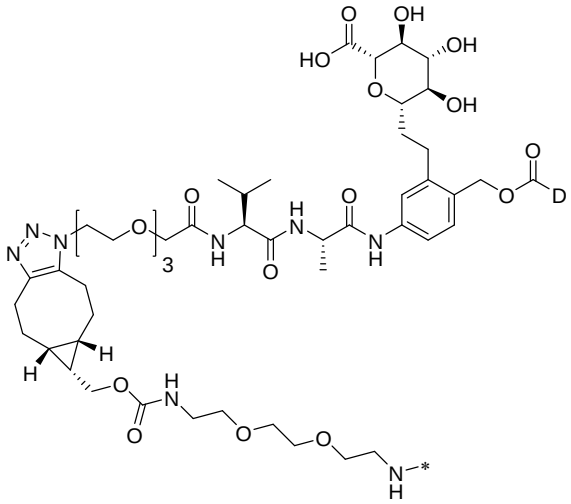


,

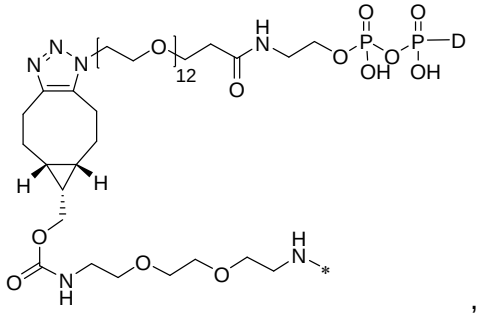




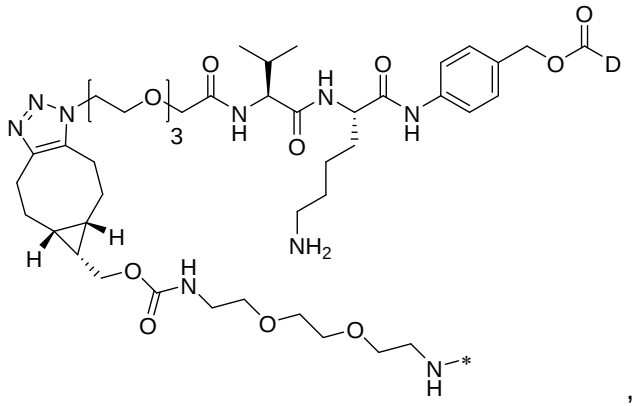
,



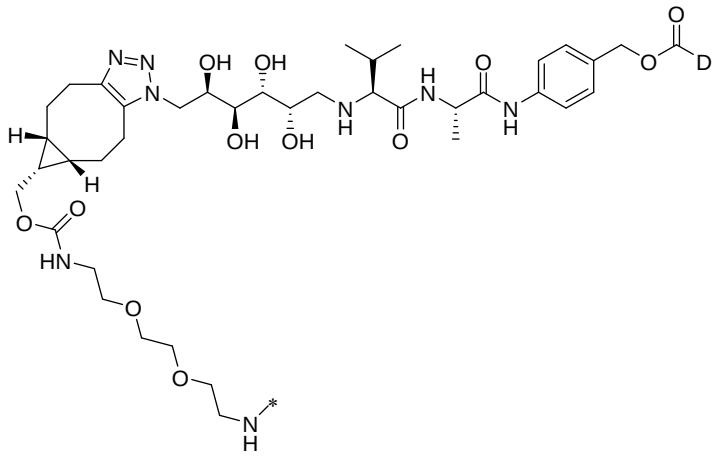
,



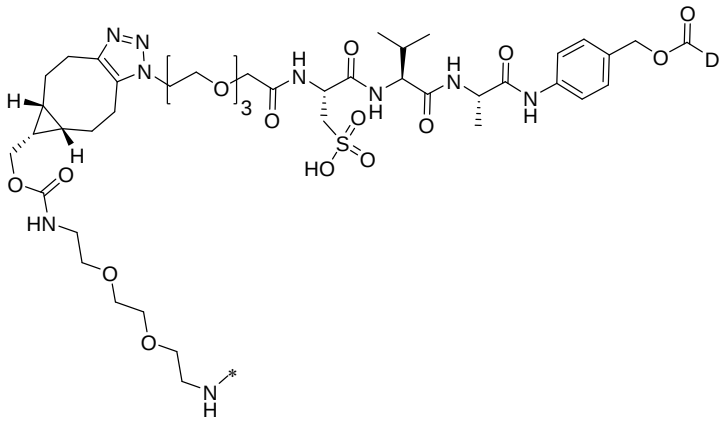
,



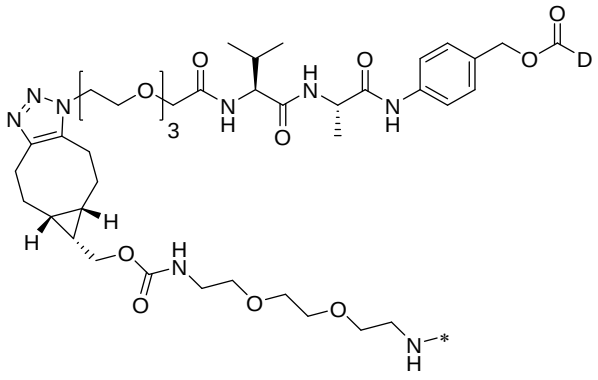
,



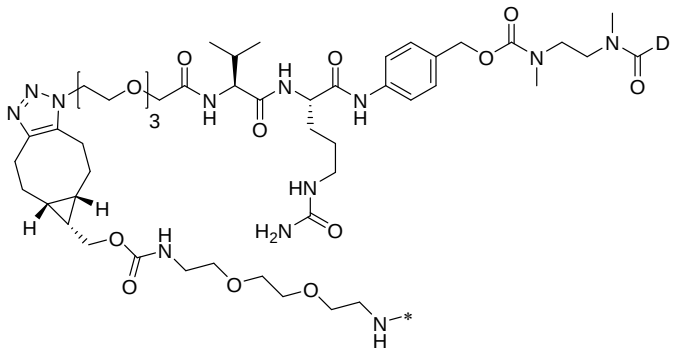
,



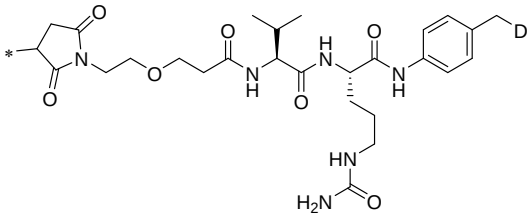
,



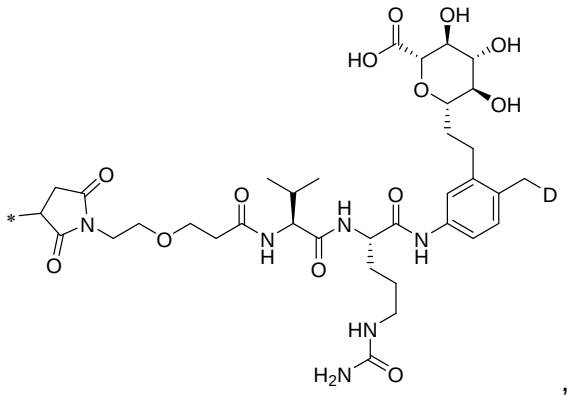
,



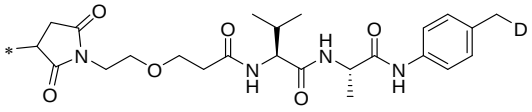
,



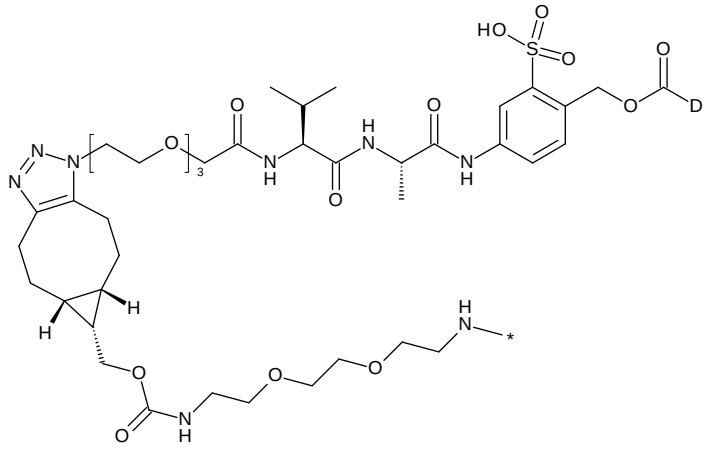
,



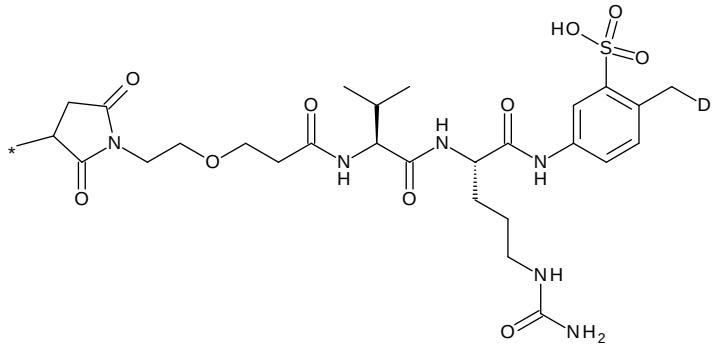
,



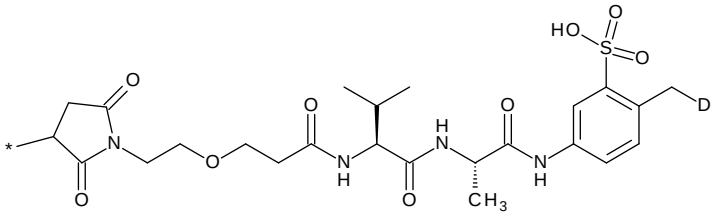
,



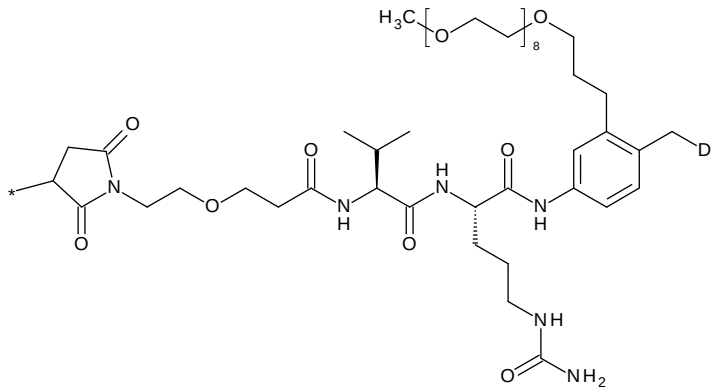
,



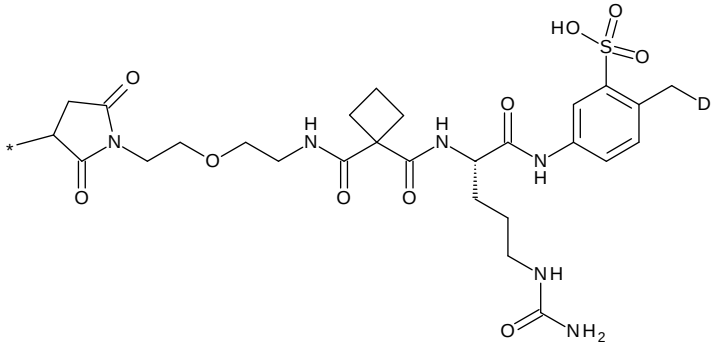
,



,



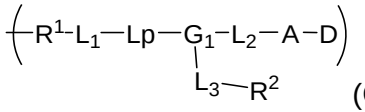
, y



, y

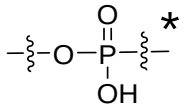
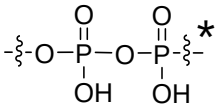
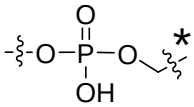
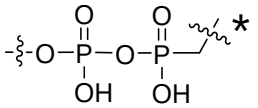
en donde —* es una unión al anticuerpo .

[37] En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende al grupo de conector-fármaco, -(L-D), que es de la fórmula (C):

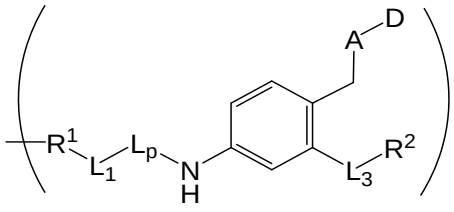


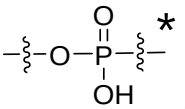
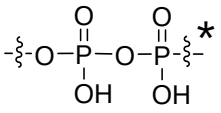
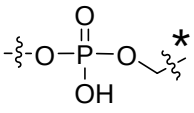
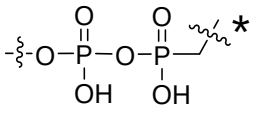
(C),

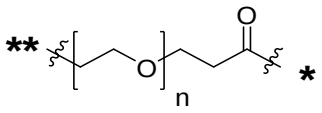
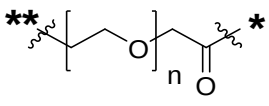
en donde: R^1 es un grupo de unión, L_1 es un espaciador formador de puentes; L_p es un grupo peptídico que comprende 1 a 6 aminoácidos; D es un inhibidor de Mcl-1; G_1-L_2-A es un

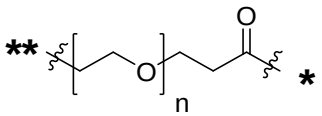
espaciador autoescindible; L_2 es un enlace, metileno, neopentileno o C_2-C_3 alquenileno; A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; L_3 es una unidad espaciadora; y R^2 es una unidad hidrofílica.

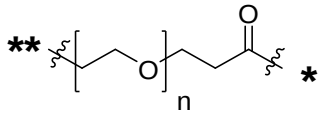
[38] En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende al grupo de conector-fármaco, -(L-D), que es de la fórmula (D):

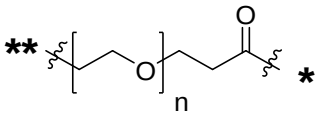
 (D),

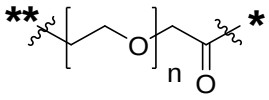
en donde: R^1 es un grupo de unión; L_1 es un espaciador formador de puentes; Lp es un grupo peptídico que comprende 1 a 6 aminoácidos; A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; L_3 es una unidad espaciadora; y R^2 es una unidad hidrofílica.

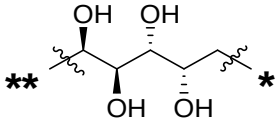
[39] En algunas formas de realización, L_1 comprende:  ,  , o *-CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)-**, en donde cada n es un número entero de entre 1 y 12, en donde * de L_1 indica el punto de unión directa o indirecta a Lp, y el ** de L_1 indica el punto de unión directa o indirecta a R^1.

[40] En algunas formas de realización, L_1 es  , y n es un número entero de entre 1 y 12, en donde * de L_1 indica el punto de unión directa o indirecta a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión directa o indirecta a R^1.

[41] En algunas formas de realización, L_1 es  , y n es 1, en donde * de L_1 indica el punto de unión directa o indirecta a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión directa o indirecta a R^1.

[42] En algunas formas de realización, L_1 es  , y n es 12, en donde * de L_1 indica el punto de unión directa o indirecta a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión directa o indirecta a R^1.

[43] En algunas formas de realización, L_1 es  , y n es un número entero de entre 1 y 12, en donde * de L_1 indica el punto de unión directa o indirecta a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión directa o indirecta a R^1.

[44] En algunas formas de realización, L_1 comprende  , en donde * de L_1 indica el punto de unión directa o indirecta a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión directa o indirecta a R^1.

[45] En algunas formas de realización, L_1 es un espaciador formador de puentes que comprende:

*-$C(=O)(CH_2)_mO(CH_2)_m$-**; *-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**;

*-$C(=O)(CH_2)_m$-**; *-$C(=O)NH((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**;

*-$C(=O)O(CH_2)_mSSC(R^3)_2(CH_2)_mC(=O)NR^3(CH_2)_mNR^3C(=O)(CH_2)_m$-**;

*-$C(=O)O(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$-**; *-$C(=O)(CH_2)_mNH(CH_2)_m$-**;

*-$C(=O)(CH_2)_mNH(CH_2)_nC(=O)$-**; *-$C(=O)(CH_2)_mX_1(CH_2)_m$-**;

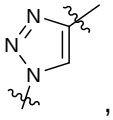
*-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-$C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-**;

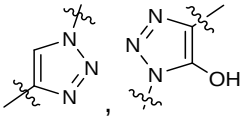
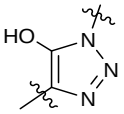
*-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-**;

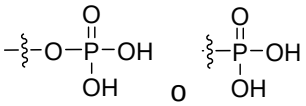
*-$C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**;

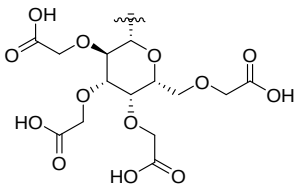
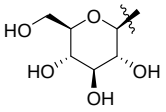
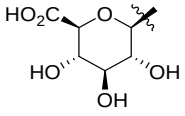
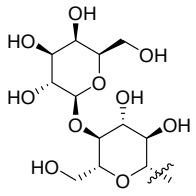
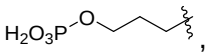
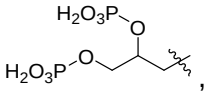
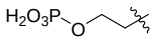
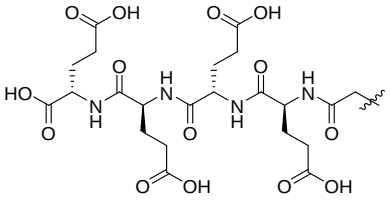
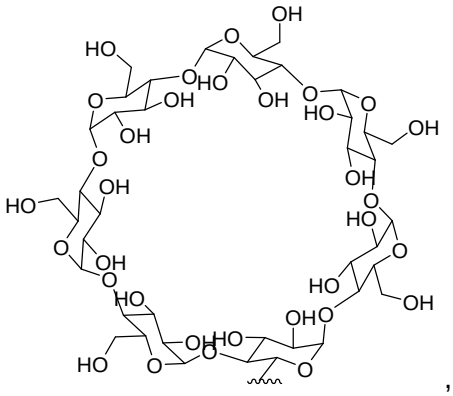
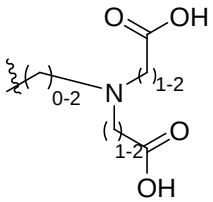
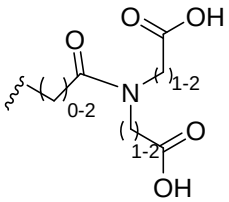
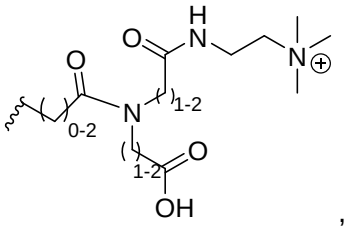
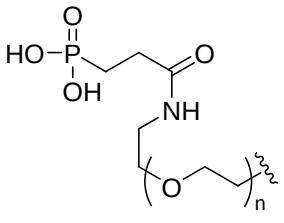
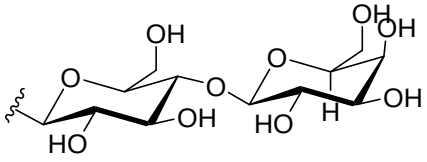
*-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**;

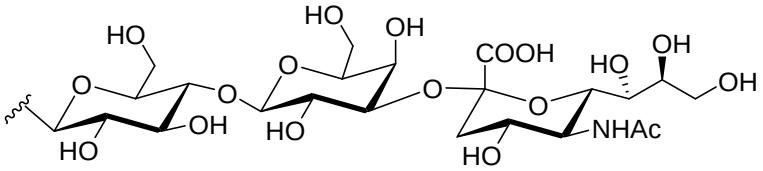
*-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_m$-**; *-$C(=O)(CH_2)_mC(R^3)_2$-** o

*-$C(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión directa o indirecta a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión directa o indirecta a R^1, en donde X_1 es  ,

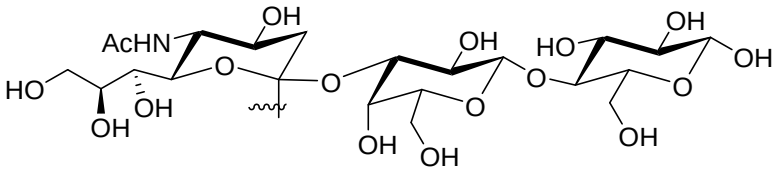

o 
; y cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; y cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

[46] En algunas formas de realización, R^2 es una unidad hidrofílica que comprende polietilenglicol, polialquilenglicol, un poliol, una polisarcosina, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6 alquilo sustituido con 1 a 3 grupos 
. En algunas formas de realización, R^2 es

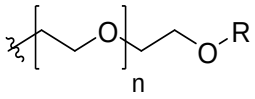
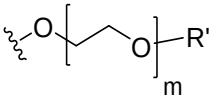

, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
o 
, 
, 
, 
, 
en donde n es un número entero entre 1 y 6, 
,

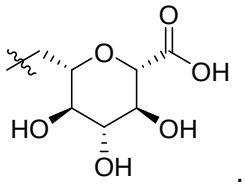


, o

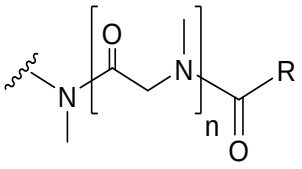


.

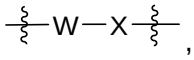
[47] En algunas formas de realización, la unidad hidrofílica comprende un polietilenglicol de fórmula:  o  , en donde R es is H, $-CH_3$, $-CH_2CH_2NHC(=O)OR_a$, $-CH_2CH_2NHC(=O)R_a$, o $-CH_2CH_2C(=O)OR_a$, R' es OH, $-OCH_3$, $-CH_2CH_2NHC(=O)OR_a$, $-CH_2CH_2NHC(=O)R_a$, o $-OCH_2CH_2C(=O)OR_a$, en el cual R_a es H o C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido con OH o C_{1-4} alcoxi, y cada m y n son un número entero entre 2 y 25 (por ejemplo, entre 3 y 25).

[48] En algunas formas de realización, la unidad hidrofílica comprende  .

[49] En algunas formas de realización, la unidad hidrofílica comprende una polisqarcosina, por ejemplo con la siguiente unidad



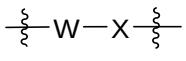
, en donde n es un número entero de entre 3 y 25; y R es H, $–CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

[50] En algunas formas de realización, L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

en donde:

W es $-CH_2-$, $-CH_2O-$, $-CH_2N(R^b)C(=O)O-$, $-NHC(=O)C(R^b)_2NHC(=O)O-$, $-NHC(=O)C(R^b)_2NH-$, $-NHC(=O)C(R^b)_2NHC(=O)-$, $-CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O-$, $-C(=O)N(X\text{-}R^2)-$, $-CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)-$, $-C(=O)NR^b-$, $-C(=O)NH-$, $-CH_2NR^bC(=O)-$, $-CH_2NR^bC(=O)NH-$, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b-$, $-NHC(=O)-$, $-NHC(=O)O-$, $-NHC(=O)NH-$, $-OC(=O)NH-$, $-S(O)_2NH-$, $-NHS(O)_2-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)O-$ o $-NH-$, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo; y

X es un enlace, triazolilo o $-CH_2$-triazolil-.

[51] En algunas formas de realización, L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  , en donde

W es $-CH_2-$, $-CH_2O-$, $-CH_2N(R^b)C(=O)O-$, $-NHC(=O)C(R^b)_2NHC(=O)O-$, $-NHC(=O)C(R^b)_2NH-$, $-NHC(=O)C(R^b)_2NHC(=O)-$, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)O-$, $-C(=O)N(X-R^2)-$, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)-$, $-C(=O)NR^b-$, $-C(=O)NH-$, $-CH_2NR^bC(=O)-$, $-CH_2NR^bC(=O)NH-$, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b-$, $-NHC(=O)-$, $-NHC(=O)O-$, $-NHC(=O)NH-$, $-OC(=O)NH-$, $-S(O)_2NH-$, $-NHS(O)_2-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)O-$ o $-NH-$, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo, and C_3-C_8 ccloalquilo; y

[52] X es $-CH_2$-triazolyl-C_{1-4} alquilen-$OC(O)NHS(O)_2NH-$, -C_{4-6} cicloalquilen-$OC(O)NHS(O)_2NH-$, $-(CH_2CH_2O)_n-C(O)NHS(O)_2NH-$, $-(CH_2CH_2O)_n-C(O)NHS(O)_2NH-(CH_2CH_2O)_n-$, o

$-CH_2$-triazolil-C_{1-4} alquilen-$OC(O)NHS(O)_2NH-(CH_2CH_2O)_n-$, en donde cada n es de manera independiente 1, 2, ó 3.

[53] En algunas formas de realización, el grupo de unión se forma mediante una reacción que comprende por lo menos un grupo reactivo. En algunos casos, el grupo de unión se forma mediante reacción de: un primer grupo reactivo que está unido al conector, y un segundo grupo reactivo que está unido al anticuerpo o es un residuo de aminoácido del anticuerpo.

[54] En algunas formas de realización, por lo menos uno de los grupos reactivos comprende:

un tiol,

una maleimida,

una haloacetamida,

una azida,

un alquino,

un cicloocteno,

una triarilfosfina,

un oxanobornadieno,

un ciclooctino,

una diariltetrazina,

una monoariltetrazina,

un norborneno,

un aldehído,

una hidroxilamina,

una hidrazina,

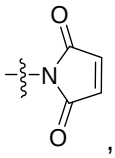
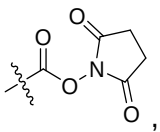
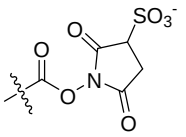
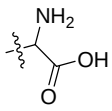
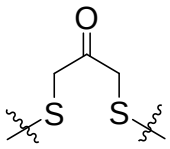
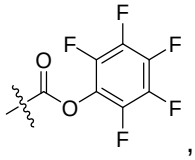
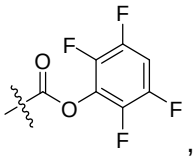
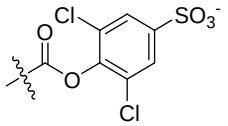
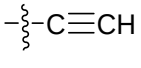
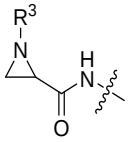
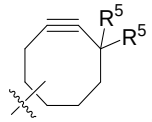
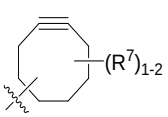
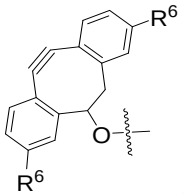
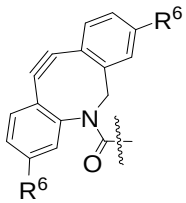
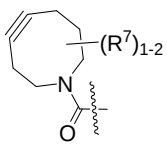
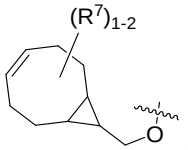
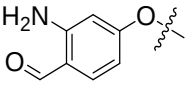
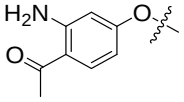
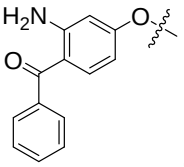
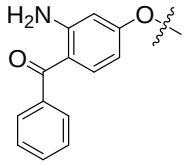
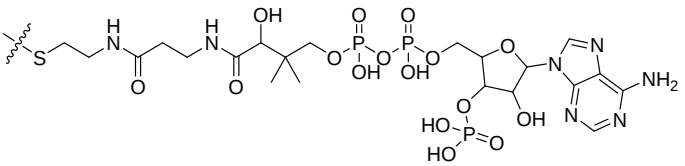
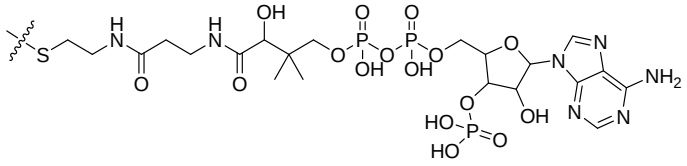
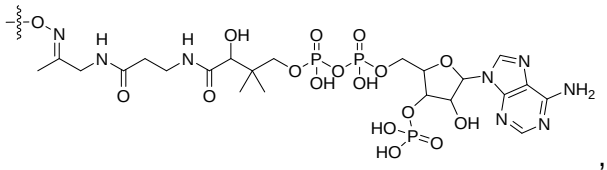
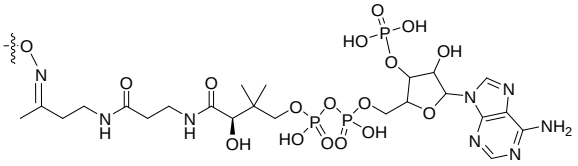
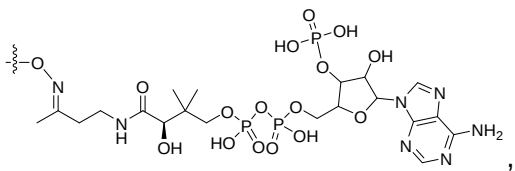
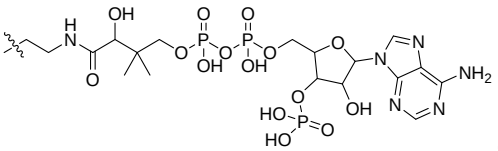
NH_2-NH-C(=O)-,

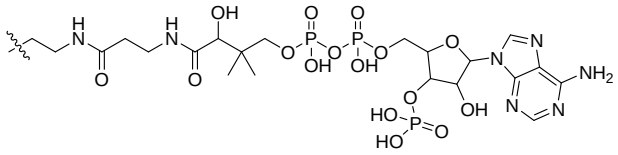
una cetona,

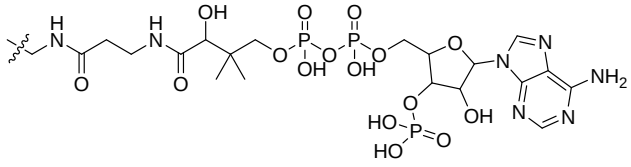
una vinilsulfona,

una aziridina,

un residuo de aminoácido,


, -ONH_2, -NH_2, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, -N_3, 
, -SH, -SR^3, -SSR^4, -$S(=O)_2(CH=CH_2)$, -$(CH_2)_2S(=O)_2(CH=CH_2)$, -$NHS(=O)_2(CH=CH_2)$, -$NHC(=O)CH_2Br$, -$NHC(=O)CH_2I$, 
, -$C(O)NHNH_2$, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
, 
.


, o


;

en donde:

cada R^3 se selecciona de manera independiente entre H y C_1-C_6alquilo;

cada R^4 es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada R^5 se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo, F, Cl y -OH;

cada R^6 se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, -CN, $-NO_2$ y-OH;

cada R^7 se selecciona de manera independiente entre H, C_{1-6}alquilo, fluoro, benciloxi sustituido con –C(=O)OH, bencilo sustituido con –C(=O)OH, C_{1-4}alcoxi sustituido con –C(=O)OH y C_{1-4}alquilo sustituido con –C(=O)OH.

[55] En algunas formas de realización, el primer grupo reactivo y el segundo grupo reactivo comprenden:

un tiol y una maleimida,

un tiol y una haloacetamida,

un tiol y una vinilsulfona,

un tiol y una aziridina,

una azida y un alquino,

una azida y un ciclooctino,

una azida y un cicloocteno,

una azida y una triarilfosfina,

una azida y un oxanobornadieno,

una diariltetrazina y un cicloocteno,

una monoariltetrazina y un norborneno,

un aldehído y una hidroxilamina,

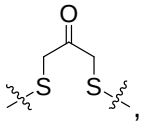
un aldehído y una hidrazina,

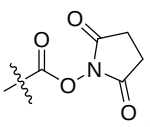
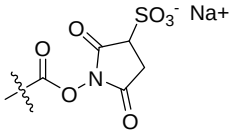
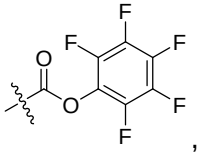
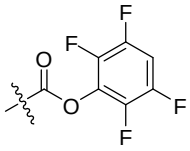
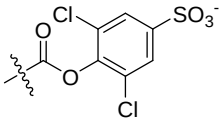
un aldehído y NH_2-NH-C(=O)-,

una cetona y una hidroxilamina,

una cetona y una hidrazina,

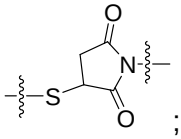
una cetona y NH2-NH-C(=O)-,

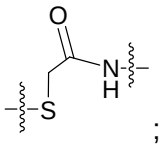
una hidroxilamina y  ,

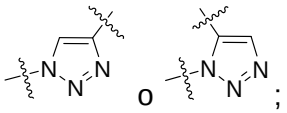
una amina y  ,  ,  ,  o  , o

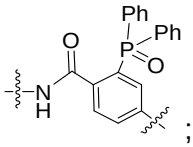
una CoA o un análogo de CoA y un residuo serina.

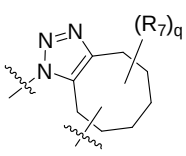
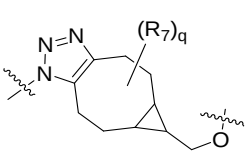
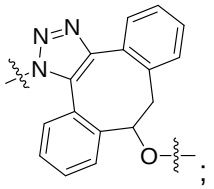
[56] En algunas formas de realización, el grupo de unión comprende un grupo seleccionado entre:

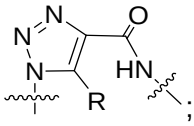
 ;

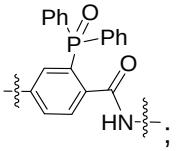
 ;

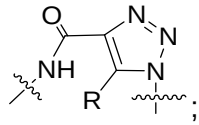
 ;

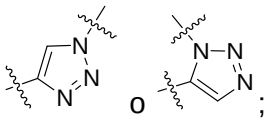
 ;

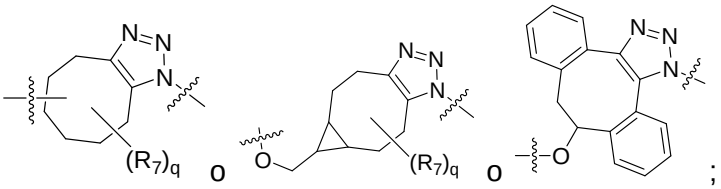
 o  o  ;

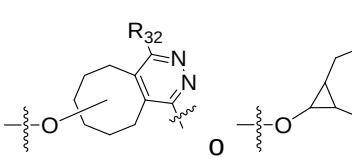
 ;

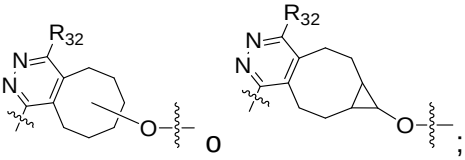
 ;

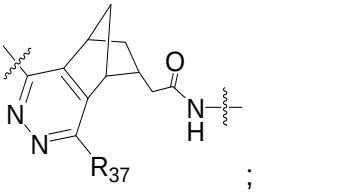

;

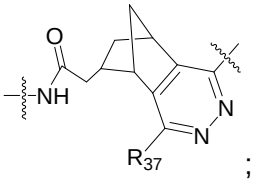

;

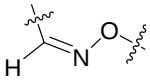

;

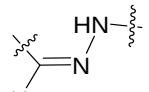

;

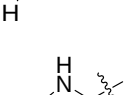

;

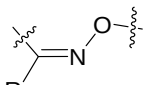

;

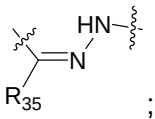

;

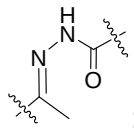

;

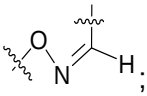

;

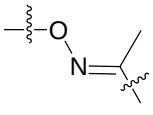

;

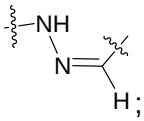

;

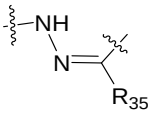

;

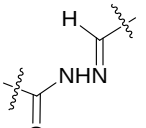

;

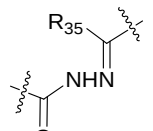

;

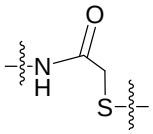

;

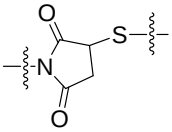

;

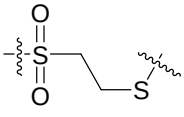

;

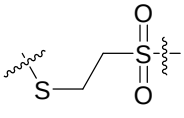

;

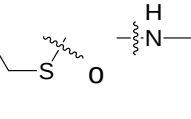

;

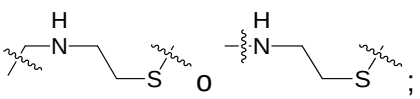

;

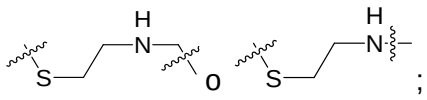

;

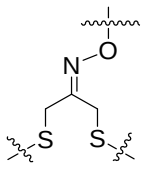

;


;

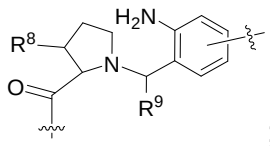

;

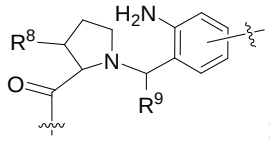

;

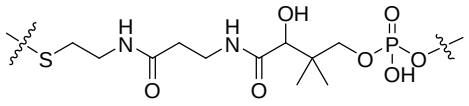

;

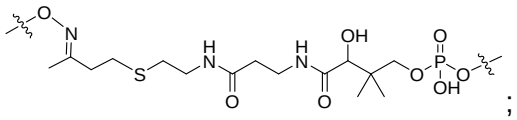

;

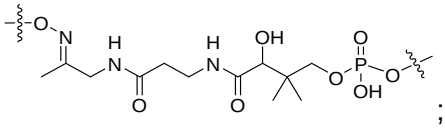
amida;

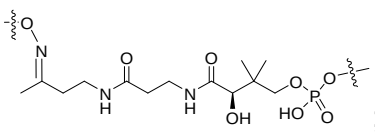

;

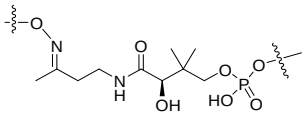

;

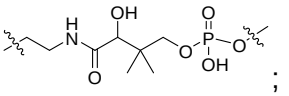

;

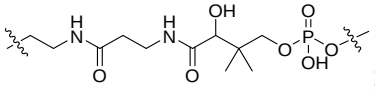

;

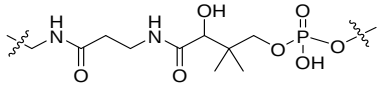

;


;


;


;


;


; y

disulfuro,

en donde:

R^{32} es H, C_{1-4} alquilo, fenilo, pirimidina o piridina;

R^{35} es H, C_{1-6} alquilo, fenilo o C_{1-4} alquilo sustituido con 1 a 3 grupos –OH;

cada R^7 se selecciona de manera independiente entre H, C_{1-6} alquilo, fluoro, benciloxi sustituido con –C(=O)OH, bencilo sustituido con –C(=O)OH, C_{1-4} alcoxi sustituido con –C(=O)OH y C_{1-4} alquilo sustituido con –C(=O)OH;

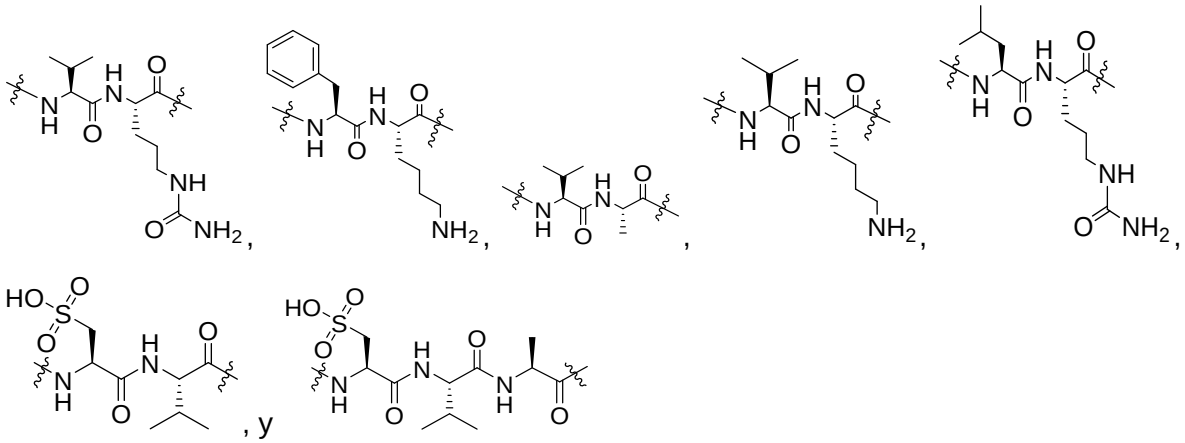
R^{37} se selecciona de manera independiente entre H, fenilo y piridina;

q es 0, 1, 2 ó 3;

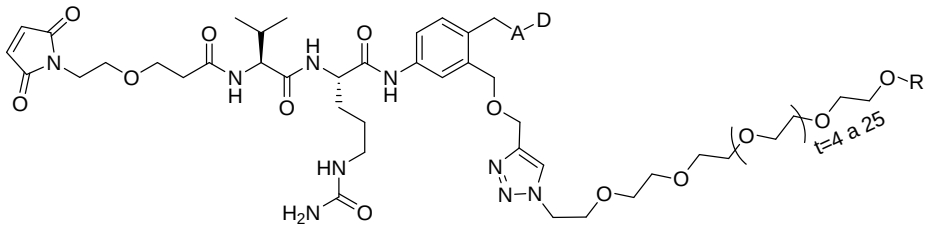
R^8 es H o metilo; y

R^9 es H, $-CH_3$ o fenilo.

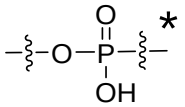
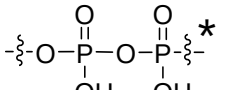
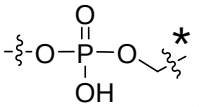
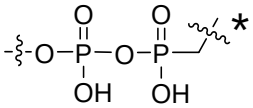
[57] En algunas formas de realización, el grupo peptídico (Lp) comprende 1 a 6 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el grupo peptídico (Lp) comprende 1 a 4 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el grupo peptídico comprende 1 a 3 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, el grupo peptídico comprende 1 a 2 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, los residuos de aminoácidos se seleccionan entre L-glicina (Gly), L-valina (Val), L-citrulina (Cit), ácido L-cisteico (sulfo-Ala), L-lisina (Lys), L-isoleucina (Ile), L-fenilalanina (Phe), L-metionina (Met), L-asparagina (Asn), L-prolina (Pro), L-alanina (Ala), L-leucina (Leu), L-triptofano (Trp) y L-tirosina (Tyr). En algunas formas de realización, el grupo peptídico comprende Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala, Val-Lys, Leu-Cit, sulfo-Ala-Val y/o sulfo-Ala-Val-Ala. En algunas formas de realización, Lp se selecciona entre:


, y

[58] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:

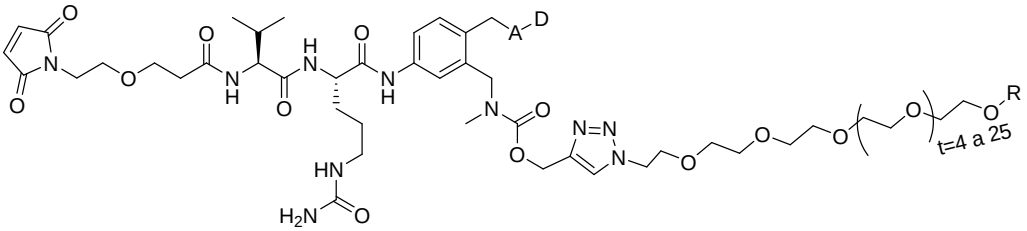

, en donde:

R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

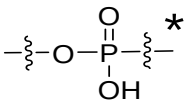
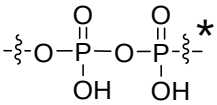
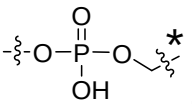
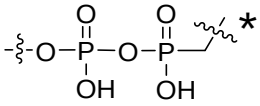
D es un inhibidor de Mcl-1.

[59] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:



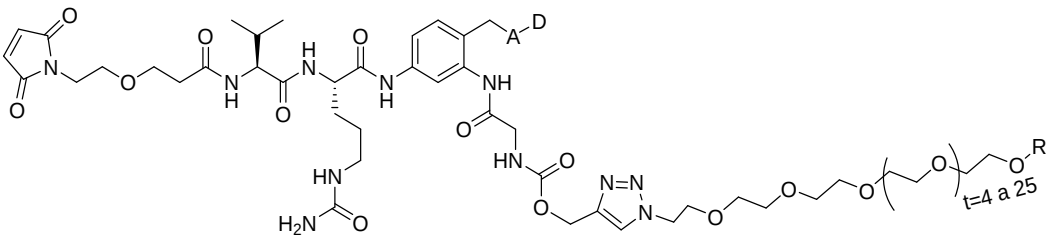
, en donde:

R es H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

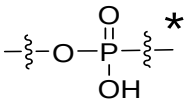
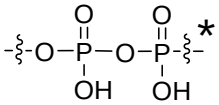
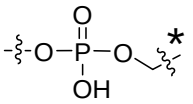
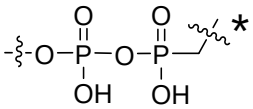
D es un inhibidor de Mcl-1.

[60] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:



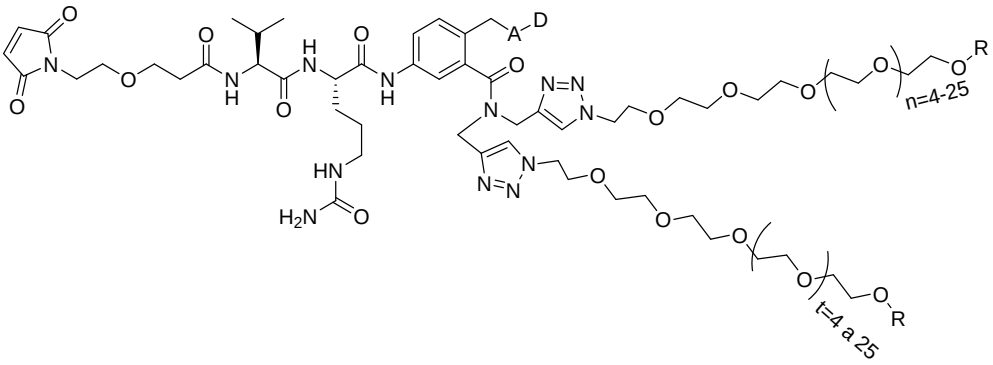
, en donde:

R es H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

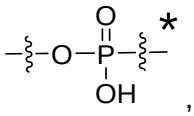
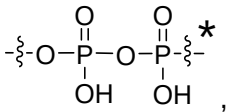
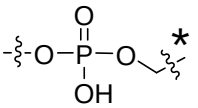
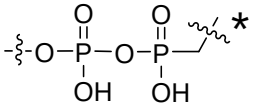
D es un inhibidor de Mcl-1.

[61] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:



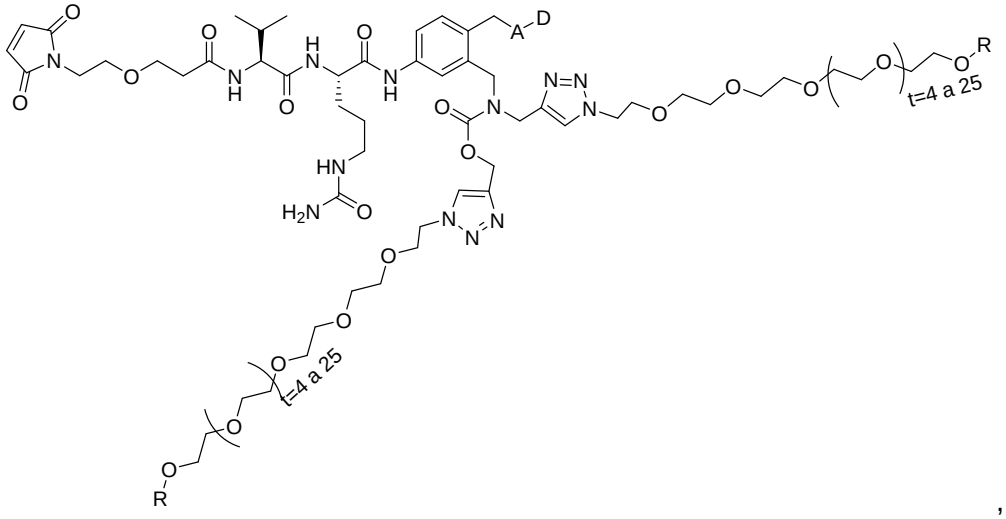
, en donde:

cada R se selecciona de manera independiente entre H, $-CH_3$, y $-CH_2CH_2C(=O)OH$;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

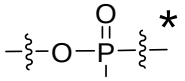
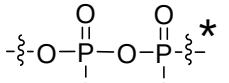
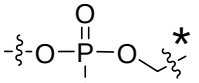
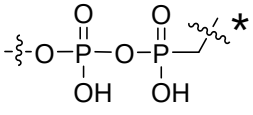
D es un inhibidor de Mcl-1.

[62] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:



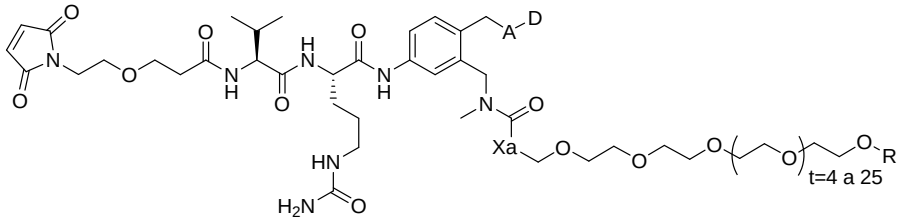
, en donde:

cada R se selecciona de manera independiente entre H, $-CH_3$, y $-CH_2CH_2C(=O)OH$;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

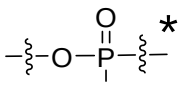
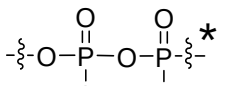
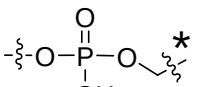
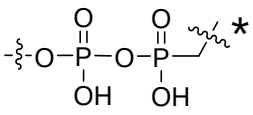
D es un inhibidor de Mcl-1.

[63] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:



, en donde:

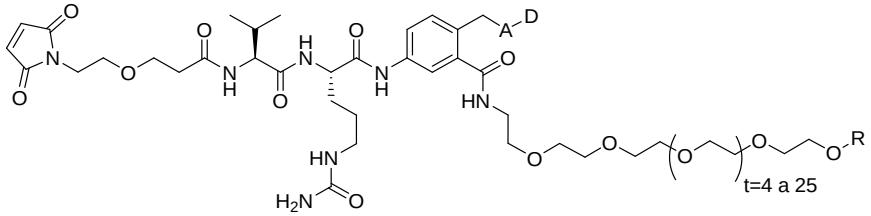
Xa es $-CH_2-$, $-OCH_2-$, $-NHCH_2-$ o $-NRCH_2-$ y cada R es de manera independiente H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera

independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

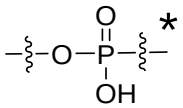
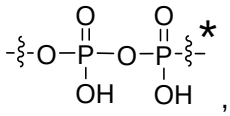
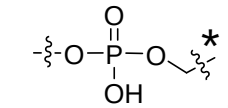
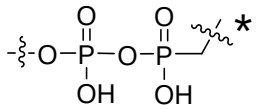
D es un inhibidor de Mcl-1.

[64] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:



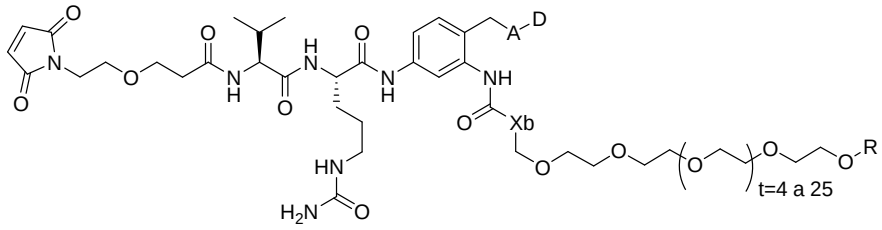
, en donde:

R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , $-OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)$-* o $-OC(=O)N(CH_3)C(R^a)_2C(R^a)_2N(CH_3)C(=O)$-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

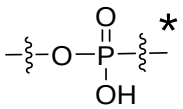
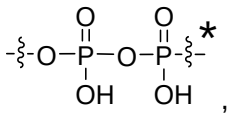
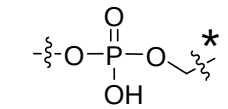
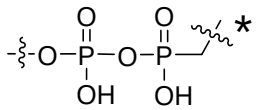
D es un inhibidor de Mcl-1.

[65] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:



, en donde:

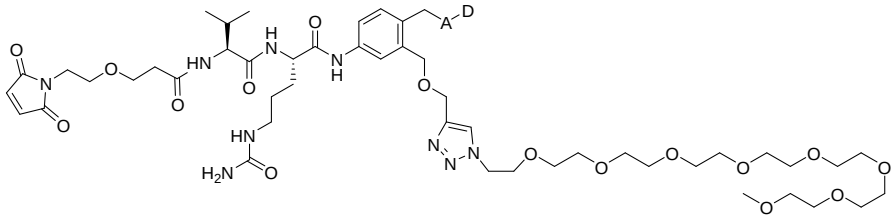
Xb es $-CH_2-$, $-OCH_2-$, $-NHCH_2-$ o $-NRCH_2-$ y cada R es de manera independiente H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , $-OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)$-* o $-OC(=O)N(CH_3)C(R^a)_2C(R^a)_2N(CH_3)C(=O)$-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a

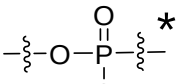
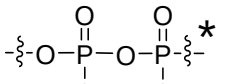
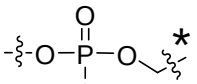
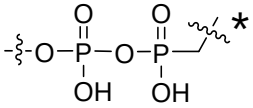
D; y

D es un inhibidor de Mcl-1.

[66] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:

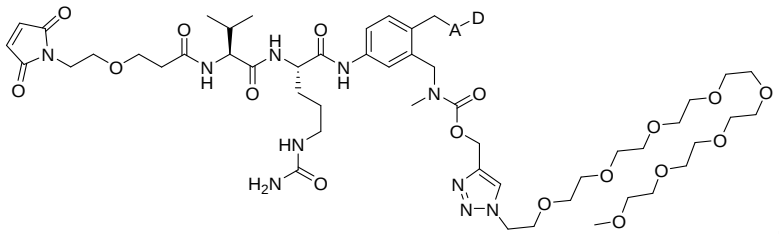


, en donde:

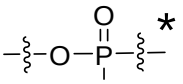
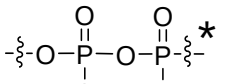
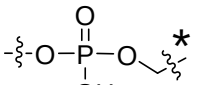
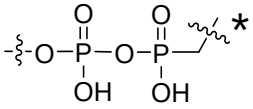
A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

D es un inhibidor de Mcl-1.

[67] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:

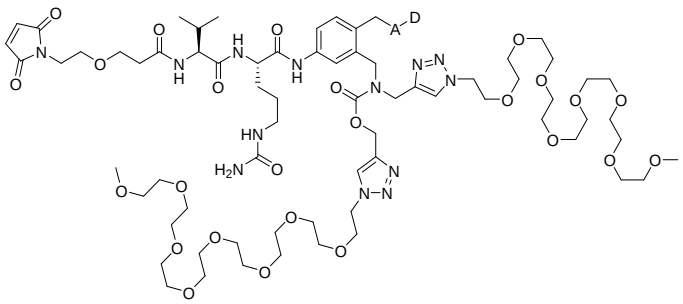


, en donde:

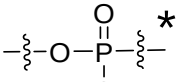
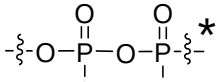
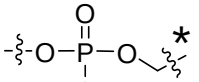
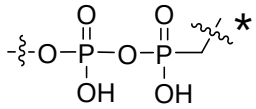
A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

D es un inhibidor de Mcl-1.

[68] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:

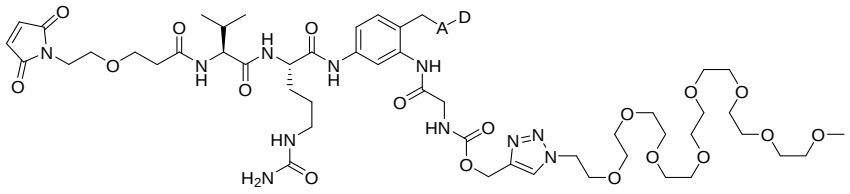


, en donde:

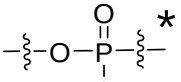
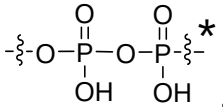
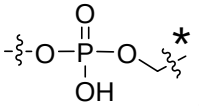
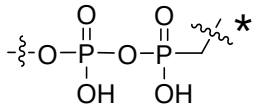
A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

D es un inhibidor de Mcl-1.

[69] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:

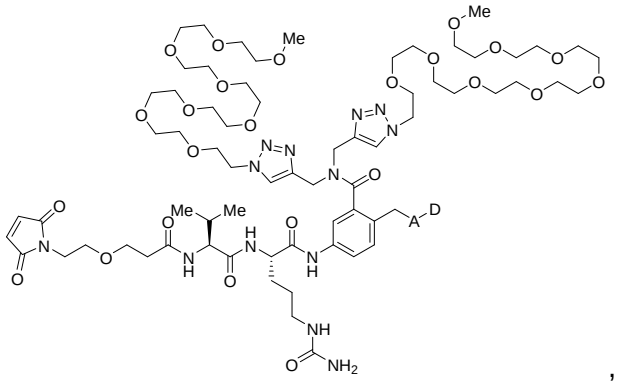


, en donde:

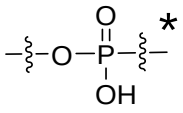
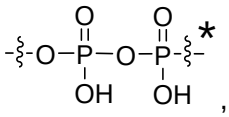
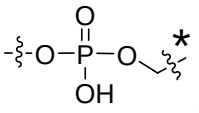
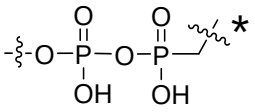
A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

D es un inhibidor de Mcl-1.

[70] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:

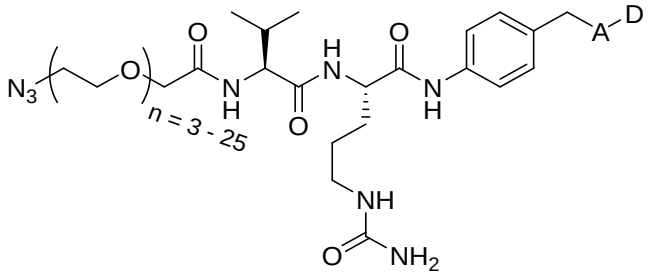


, en donde:

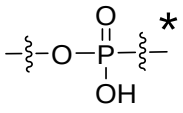
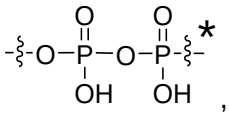
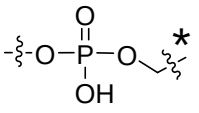
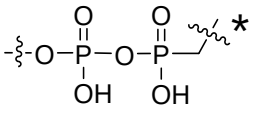
A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

D es un inhibidor de Mcl-1.

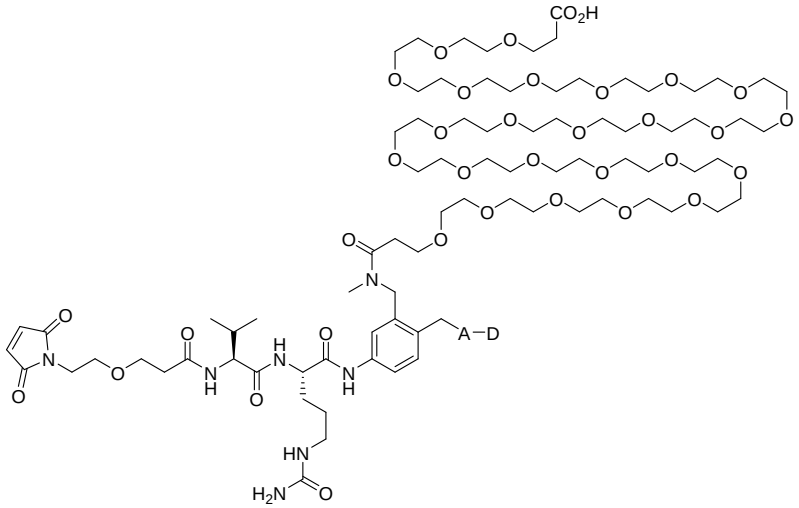
[71] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:



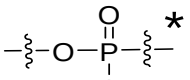
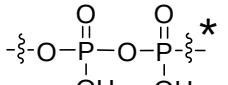
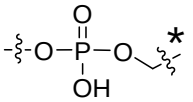
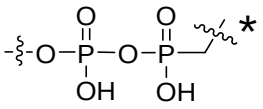
, en donde:

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y D es un inhibidor de Mcl-1.

[72] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o se forma a partir de un compuesto de fórmula:

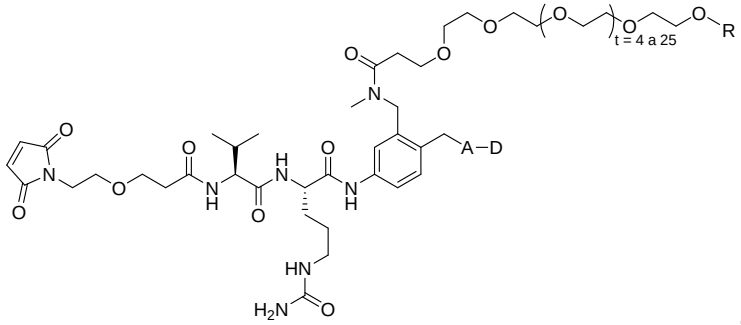


, en donde:

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

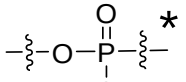
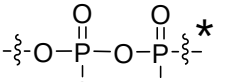
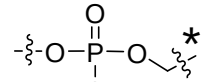
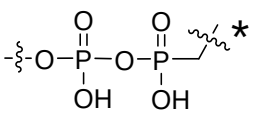
D es un inhibidor de Mcl-1.

[73] En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco -(L-D) comprende o está formado con un compuesto de la Fórmula:



, en donde:

cada R es de manera independiente H, -CH3 o -CH2CH2C(=O)OH;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*,

en donde cada Ra se selecciona de manera independiente entre H, C1-C6 alquilo y

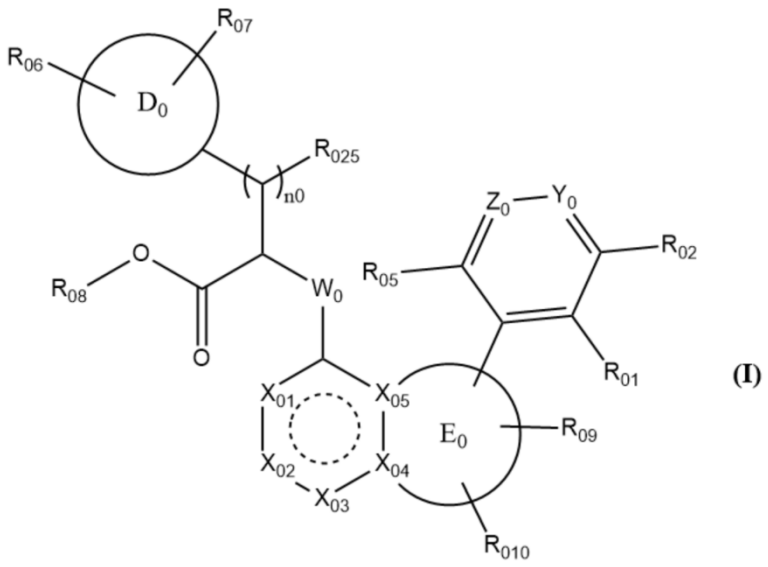
C3-C8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

D es un inhibidor de Mcl-1.

[74] En algunas formas de realización, A es un enlace.

[75] En algunas formas de realización, R es $-CH_3$.

[76] En algunas formas de realización, el inhibidor de Mcl-1 (D) comprende un compuesto de la Fórmula (I):



(I)

en donde:

El anillo D_0 es un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,

El anillo E_0 es un anillo furilo, tienilo o pirrolilo,

X_{01}, X_{03}, X_{04} y X_{05} son de manera independiente entre sí un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno,

X_{02} es un grupo C-R_{026} o un átomo de nitrógeno,

 significa que el anillo es aromático

Y_0 es un átomo de nitrógeno o un grupo C-R_{03},

Z_0 es un átomo de nitrógeno o un grupo C-R_{04},

R_{01} es un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -Cy_{08}, -(C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-(C_1-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-(C_1-C_6)alquil-R_{012}, -C(O)-OR_{011}, -O-C(O)-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -NR_{011}-C(O)-OR_{011}', -(C_1-C_6)alquil-NR_{011}-C(O)-R_{011}', -SO_2-$NR_{011}R_{011}$' o -SO_2-(C_1-C_6)alquilo,

R_{02}, R_{03}, R_{04} y R_{05} son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -(C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-Cy_{01}, -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{01}, -O-(C_1-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-(C_1-C_6)alquil-R_{031}, -O-(C_1-C_6)alquil-R_{012}, -C(O)-OR_{011}, -O-C(O)-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -NR_{011}-C(O)-OR_{011}', -(C_1-C_6)alquil-NR_{011}-C(O)-R_{011}', -SO_2-$NR_{011}R_{011}$' o -SO_2-(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{01}, R_{02}), (R_{02}, R_{03}), (R_{03}, R_{04}) o (R_{04}, R_{05}) forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con 1 ó 2 grupos seleccionados entre halógeno, (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, (C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -$NR_{013}R_{013}$', -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01} o oxo,

R_{06} y R_{07} son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -(C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-(C_1-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-Cy_{01}, -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{01}, -O-(C_1-C_6)alquil-R_{012}, -C(O)-OR_{11}, -O-C(O)-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -NR_{11}-C(O)-R_{011}', -NR_{011}-C(O)-OR_{011}', -(C_1-C_6)alquil-NR_{011}-C(O)-R_{011}', -SO_2-$NR_{011}R_{011}$' o -SO_2-(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{06}, R_{07}), cuando se fusiona con los dos átomos de carbono adyacentes, forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, -$NR_{013}R_{013}$', -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01} o un oxo,

W_0 es un grupo -CH_2-, un grupo -NH- o un átomo de oxígeno,

R_{08} es un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_8)alquilo lineal o ramificado, un grupo -$CHR_{0a}R_{0b}$, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo aril(C_1-C_6)alquilo o un grupo heteroaril(C_1-C_6)alquilo,

R_{09} es un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, -Cy_{02}, -(C_1-C_6)alquil-Cy_{02}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{02}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{02}, -Cy_{02}-Cy_{03}, -(C_2-C_6)alquinil-O-Cy_{02}, -Cy_{02}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{03}, un átomo de halógeno, un grupo ciano, -C(O)-R_{014} o -C(O)-$NR_{014}R_{014}$',

R_{010} es un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo aril(C_1-C_6)alquilo, un grupo (C_1-C_6)cicloalquilalquilo, un grupo (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado o -(C_1-C_6)alquil-O-Cy_{04},

o el par (R_{09}, R_{010}), cuando se fusiona con los dos átomos de carbono adyacentes, forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N,

R_{011} y R_{011}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, opcionalmente sustituido o -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01},

o el par (R_{011}, R_{011}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el nitrógeno se puede sustituir por 1 ó 2 grupos seleccionados entre un átomo de hidrógeno y un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, y en donde uno o más entre los átomos de carbono del grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado está opcionalmente deuterado,

R_{012} es -Cy_{05}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-NR_{011}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{07}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{09}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{09}, -NH-C(O)-NH-R_{011}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-NR_{011}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{09}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -$NR_{011}R_{011}$', -OR_{011}, -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -O-(C_1-C_6)alquil-OR_{011}, -SO_2-R_{011} y -C(O)-OR_{011},

R_{013}, R_{013}', R_{014} y R_{014}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido,

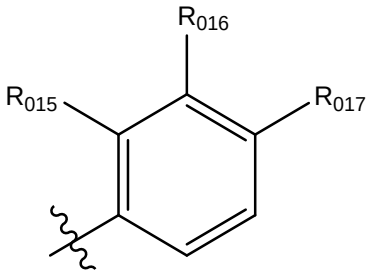
R_{0a} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{0b} es un grupo -O-C(O)-O-R_{0c}, un grupo -O-C(O)-$NR_{0c}R_{0c}$' o un grupo -O-P(O)(OR_{0c})$_2$,

R_{0c} y R_{0c}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_8)alquilo lineal o ramificado, un grupo cicloalquilo, un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo, o un grupo (C_1-C_6)alcoxicarbonil(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{0c}, R_{0c}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo no aromático compuesto por entre 5 y 7 miembros del anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados entre oxígeno y nitrógeno, en donde el nitrógeno está sustituido opcionalmente con un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{03}, Cy_{04}, Cy_{05}, Cy_{06}, Cy_{07}, Cy_{08} y Cy_{010} representan, de manera independiente entre sí, un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido,

Cy_{09} es 

,

o Cy_{09} es un grupo heteroarilo que está sustituido por un grupo seleccionado entre -O-P(O)(OR_{020})$_2$; -O-P(O)(O^-M^+)$_2$; -$(CH_2)_{p0}$-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)$_{q0}$-R_{020}; hidroxi; hidroxi(C_1-C_6)alquilo; -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo; y -U_0-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$',

R_{015} es un átomo de hidrógeno; un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)$_q$0-R_{020}; un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado; un grupo -U_0-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$'; o un grupo -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo,

R_{016} es un átomo de hidrógeno; un grupo hidroxi; un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo; un grupo -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo; un grupo $(CH_2)_{r0}$-U_0-V_0-O-P(O)(OR_{020})$_2$; un grupo -O-P(O)(O^-M^+)$_2$; un grupo -O-S(O)$_2$$OR_{020}$; un grupo -S(O)$_2$$OR_{020}$; un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-($CHR_{018}$-$CHR_{019}$-O)$_q$0-$R_{020}$; un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-C(O)-$NR_{022}R_{023}$; o un grupo -$U_0$-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$',

R_{017} es un átomo de hidrógeno; un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)$_q$0-R_{020}; un grupo -CH_2-P(O)(OR_{020})$_2$, un grupo -O-P(O)(OR_{020})$_2$; un grupo -O-P(O)(O^-M^+)$_2$; un grupo hidroxi; un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo; un grupo -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo; un grupo -U_0-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$'; o un ácido aldónico,

M^+ es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable,

U_0 es un enlace o un átomo de oxígeno,

V_0 es un grupo -$(CH_2)_{s0}$- o un grupo -C(O)-,

R_{018} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo,

R_{019} es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo,

R_{020} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{021} y R_{021}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{021}, R_{021}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{022} es un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo, un grupo -$(CH_2)_{p0}$-$NR_{024}R_{024}$', o un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)$_q$0-R_{020},

R_{023} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{022}, R_{023}) forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático

o no aromático que contiene 5 a 18 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 5 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo heterocicloalquilo,

R_{024} y R_{024}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

o el par (R_{024}, R_{024}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático compuesto por entre 5 y 7 miembros del anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, y en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{025} es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxi o un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo,

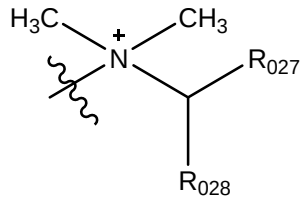
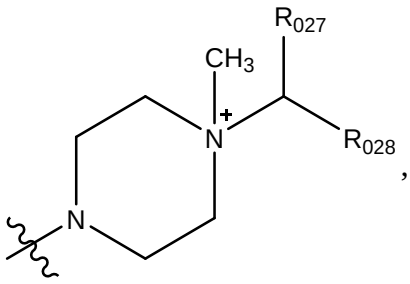
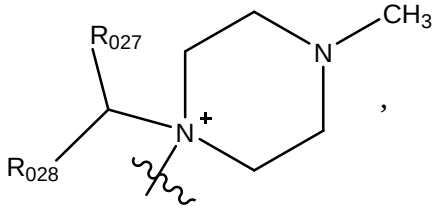
R_{026} es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo ciano,

R_{027} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{028} es un grupo -O-P(O)(O^-)(O^-), un grupo -O-P(O)(O^-)(OR_{030}), un grupo -O-P(O)(OR_{030})(OR_{030}'), un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-SO_2-O^-, un grupo -$(CH_2)_{p0}$-SO_2-O^-, un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-SO_2-OR_{030}, -Cy_{010}, un grupo -$(CH_2)_{p0}$-SO_2-OR_{030}, un grupo -O-C(O)-R_{029}, un grupo -O-C(O)-OR_{029} o un grupo -O-C(O)-$NR_{029}R_{029}$';

R_{029} y R_{029}' representan de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo amino(C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{030} y R_{030}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo aril(C_1-C_6)alquilo,

R_{031} es  ,  , o  , en donde el catión de amonio opcionalmente existe como una forma zwiteriónica o tiene un contraión aniónico monovalente,

n_0 es un número entero igual a 0 ó 1,

p_0 es un número entero igual a 0, 1, 2 ó 3,

q_0 es un número entero igual a 1, 2, 3 ó 4,

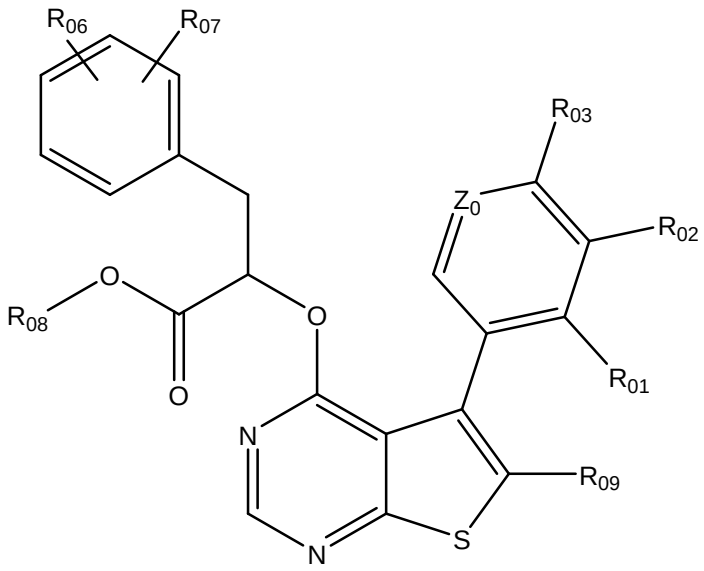
r_0 y s_0 son de manera independiente un número entero igual a 0 ó 1;

en donde, como máximo, uno de los grupos R_{03}, R_{09} o R_{012}, si está presente, está unido de manera covalente al conector, y en donde no se excede la valencia de un átomo en virtud de uno o más sustituyentes unidos al mismo,

o un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

[77] En algunas formas de realización, Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{03}, Cy_{04}, Cy_{05}, Cy_{06}, Cy_{07}, Cy_{08} y Cy_{010}, son, de manera independiente entre sí, un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados entre halo; -(C_1-C_6)alcoxi; -(C_1-C_6)haloalquilo; -(C_1-C_6)haloalcoxi; -$(CH_2)_{p0}$-O-SO_2-OR_{030}; -$(CH_2)_{p0}$-SO_2-OR_{030}; -O-P(O)$(OR_{020})_2$; -O-P(O)$(O^-M^+)_2$; -CH_2-P(O)$(OR_{020})_2$; -$(CH_2)_{p0}$-O-$(CHR_{018}$-CHR_{019}-O$)_{q0}$-R_{020}; hidroxi; hidroxi(C_1-C_6)alquilo; -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo; o -U_0-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$'.

[78] En algunas formas de realización, D comprende un compuesto de la Fórmula (II):



(II)

en donde:

Z_0 es un átomo de nitrógeno o un grupo C-R_{04},

R_{01} es un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, -$Cy_{08,}$ -$NR_{011}R_{011}$',

R_{02}, R_{03} y R_{04} son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-

C_6)alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -(C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-Cy_{01}, -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{01}, -O-(C_1-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-(C_1-C_6)alquil-R_{031}, -C(O)-OR_{011}, -O-C(O)-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -NR_{011}-C(O)-OR_{011}', -(C_1-C_6)alquil-NR_{011}-C(O)-R_{011}', -SO_2-$NR_{011}R_{011}$' o -SO_2-(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{02}, R_{03}) o (R_{03}, R_{04}) forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo está sustituido opcionalmente con un grupo seleccionado entre un (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, -$NR_{013}R_{013}$', -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01} y oxo,

R_{06} y R_{07} son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -(C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-Cy_{01}, -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{01}, -O-(C_1-C_6)alquil-R_{012}, -C(O)-OR_{011}, -O-C(O)-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -NR_{011}-C(O)-OR_{011}', -(C_1-C_6)alquil-NR_{011}-C(O)-R_{011}', -SO_2-$NR_{011}R_{011}$' o -SO_2-(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{06}, R_{07}), cuando se fusiona con dos átomos de carbono adyacentes, forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, y en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un grupo seleccionado entre un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, -$NR_{013}R_{013}$', -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01} y un oxo,

R_{08} es un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_8)alquilo lineal o ramificado, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo aril-(C_1-C_6)alquilo, o un grupo heteroaril(C_1-C_6)alquilo,

R_{09} es un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, -Cy_{02}, -(C_1-C_6)alquil-Cy_{02}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{02}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{02}, -Cy_{02}-Cy_{03}, -(C_2-C_6)alquinil-O-Cy_{02}, -Cy_{02}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{03}, un átomo de halógeno, un grupo ciano, -C(O)-R_{014}, -C(O)-$NR_{014}R_{014}$',

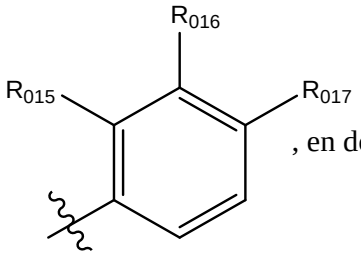
R_{011} y R_{011}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido o -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01},

o el par (R_{011}, R_{011}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el átomo de N está sustituido opcionalmente con un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, y en donde uno o más de los átomos de carbono del grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado está opcionalmente deuterado,

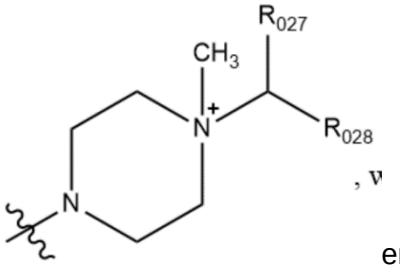
R_{012} representa -Cy_{05}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-NR_{011}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{07}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{09}, -NH-C(O)-NH-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -$NR_{011}R_{011}$', -OR_{011}, -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -O-(C_1-C_6)alquil-OR_{011}, -SO_2-R_{011} o -C(O)-OR_{011},

R_{013}, R_{013}', R_{014} y R_{014}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido,

Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{03}, Cy_{05}, Cy_{06}, Cy_{07} y Cy_{08} son de manera independiente entre sí un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido,

Cy_{09} es 

, en donde R_{015}, R_{016} y R_{017} son como se definieron para la formula (I),

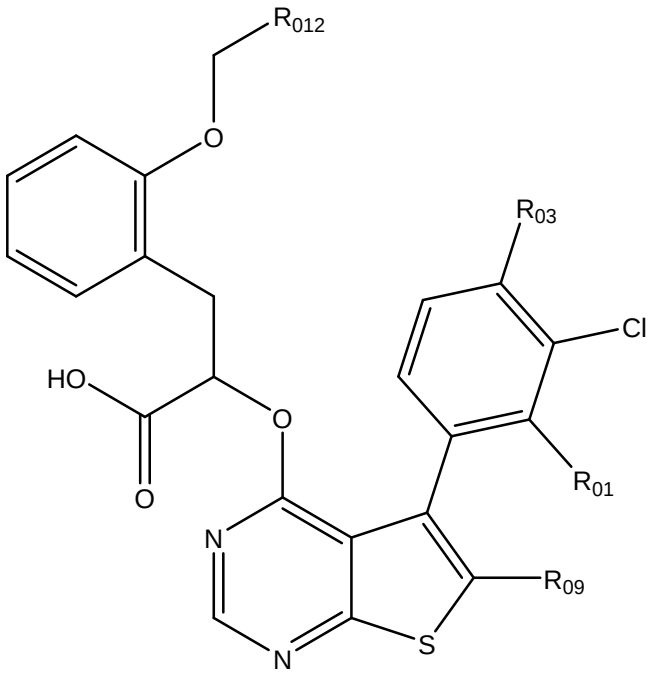
R_{031} es 

, en donde R_{027} y R_{028} son como se definieron para la Fórmula (I);

en donde, como máximo, uno de los grupos R_{03},R_{09} o R_{012}, si está presente, está unido de manera covalente al conector,

o un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

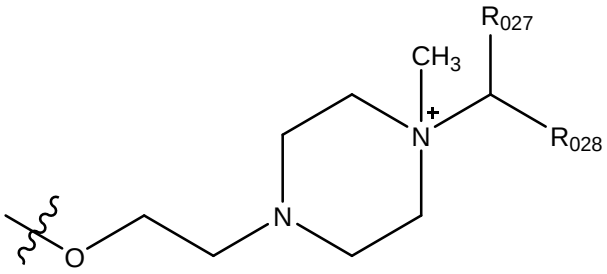
[79] En algunas formas de realización, D comprende un compuesto de la Fórmula (III):



(III)

en donde:

R_{01} es un grupo $(C_1\text{-}C_6)$alquilo lineal o ramificado,

R_{03} es -O-$(C_1\text{-}C_6)$alquil-$NR_{011}R_{011}$', o 

,

en donde R_{011} y R_{011}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo $(C_1\text{-}C_6)$alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido o -$(C_0\text{-}C_6)$alquil-Cy_{01};

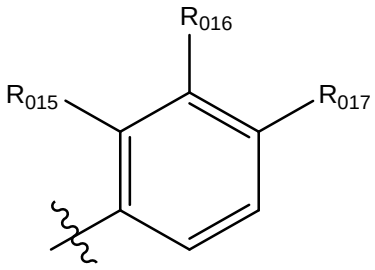
o el par (R_{011}, R_{011}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el átomo de N puede estar sustituido por 1 ó 2 grupos seleccionados entre un átomo de hidrógeno o un grupo $(C_1\text{-}C_6)$alquilo lineal o ramificado,

y en donde R_{027} es un átomo de hidrógeno y R_{028} es un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-SO_2-O^- o un grupo -$(CH_2)_{p0}$-SO_2-OR_{030};

R_{09} es un grupo $(C_2\text{-}C_6)$alquinilo lineal o ramificado o -Cy_{02},

R_{012} es -Cy_{05}, -Cy_{05}-$(C_0\text{-}C_6)$alquil-Cy_{06} o -Cy_{05}-$(C_0\text{-}C_6)$alquil-Cy_{09},

Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{05} y Cy_{06} son de manera independiente entre sí un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido,

Cy_{09} es 

,

R_{015}, R_{016} y R_{017} son como se definieron para la Fórmula (I),

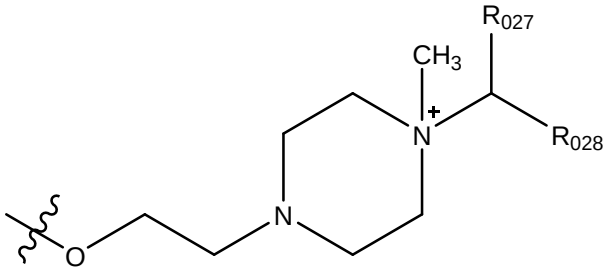
en donde, como máximo, uno de los grupos R_{03}, R_{09}, o R_{012}, si está presente, está unido de manera covalente al conector,

o el enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

[80] En algunas formas de realización, Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{05}, Cy_{06}, son, de manera independiente entre sí, un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo, cada uno de los cuales está sustituido opcionalmente con uno o más grupos seleccionados entre halo; -(C_1-C_6)alcoxi; -(C_1-C_6)haloalquilo; -(C_1-C_6)haloalcoxi; -$(CH_2)_{p0}$-O-SO_2-OR_{030}; -$(CH_2)_{p0}$-SO_2-OR_{030}; -O-P(O)(OR_{020})$_2$; -O-P(O)(O^-M^+)$_2$; -CH_2-P(O)(OR_{020})$_2$; -$(CH_2)_{p0}$-O-$(CHR_{018}$-CHR_{019}-O)$_{q0}$-R_{020}; hidroxi; hidroxi(C_1-C_6)alquilo; -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo o -U_0-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$'.

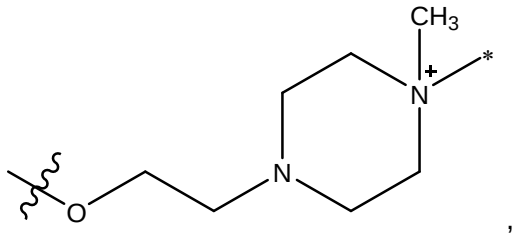
[81] En algunas formas de realización, R_{01} es metilo o etilo.

[82] En algunas formas de realización, R_{03} es -O-CH_2-CH_2-$NR_{011}R_{011'}$ en donde R_{011} y R_{011}' forman, junto con el átomo de nitrógeno donde se encuentran, un grupo piperazinilo que puede estar sustituido por un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado.

[83] En algunas formas de realización, R_{03} comprende la fórmula: 

, en donde R_{027} es un átomo de hidrógeno y R_{028} es un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-SO_2-OR_{030}, p_0 es un número entero igual a 0, 1, 2 ó 3; y en donde R_{030} representa un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo aril(C_1-C_6)alquilo.

[84] En algunas formas de realización, R_{03} comprende la fórmula:



,

en donde —* es un enlace con el conector.

[85] En algunas formas de realización, Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{03}, Cy_{04}, Cy_{05}, Cy_{06}, Cy_{07}, Cy_{08} y Cy_{010} son de manera independiente entre sí un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes opcionales se seleccionan entre (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado opcionalmente sustituido, (C_1-C_6)alquil-S- opcionalmente sustituido, hidroxi, oxo (o N-óxido si fuera apropiado), nitro, ciano, -C(O)-OR_0', -O-C(O)-R_0', -C(O)-NR_0'R_0'', -NR_0'R_0'', -(C=NR_0')-OR_0'', (C_1-C_6) haloalquilo lineal o ramificado, trifluorometoxi o halógeno, en donde R_0' y R_0'' son cada uno de manera independiente un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, y en donde uno o más de los átomos de carbono del grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado está opcionalmente deuterado.

[86] En algunas formas de realización, R_{09} es un grupo Cy_{02}, preferiblemente un grupo arilo, más preferiblemente un grupo fenilo. En algunas formas de realización, Cy_{02} es un grupo arilo opcionalmente sustituido.

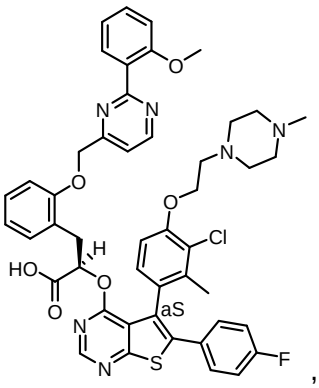
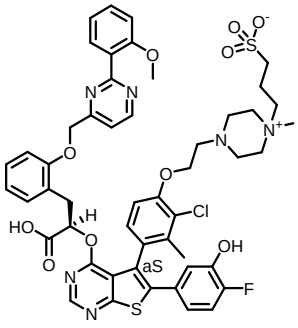
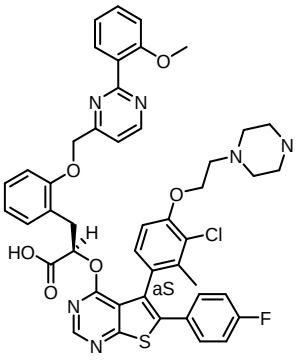
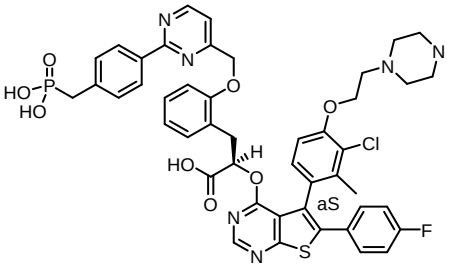
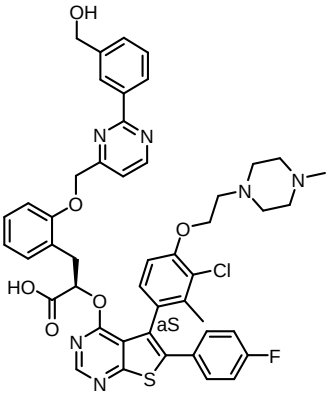
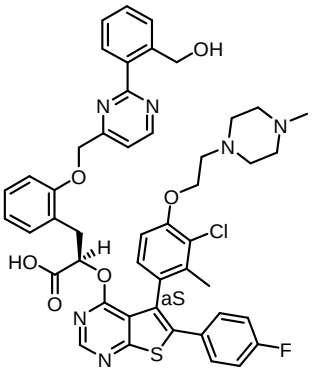
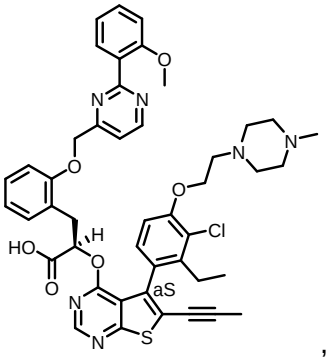
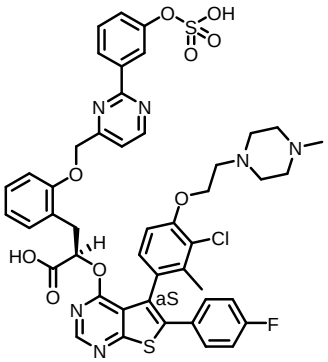
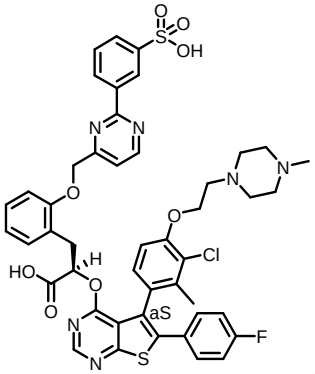
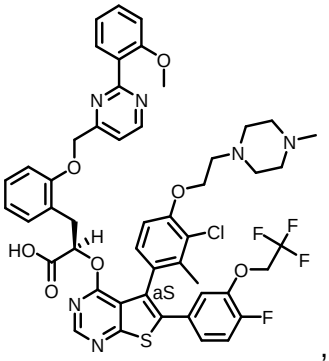
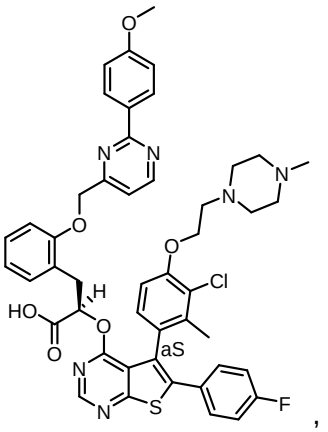
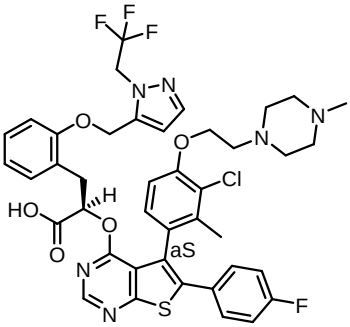
[87] En algunas formas de realización, Cy_{05} comprende un grupo heteroarilo seleccionado entre un grupo pirazolilo y un grupo pirimidinilo.

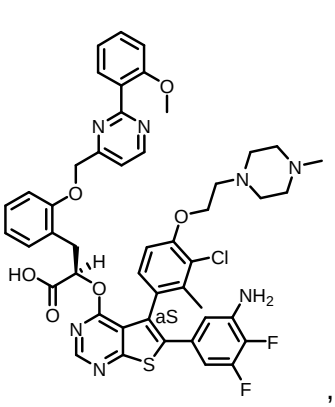
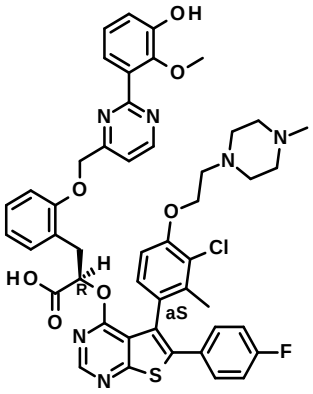
[88] En algunas formas de realización, Cy_{05} es un grupo pirimidinilo.

[89] En algunas formas de realización, Cy_{05} es un grupo pirimidinilo y Cy_{06} es un grupo fenilo.

[90] En algunas formas de realización, el conector (L) está unido a D mediante un enlace covalente de L a R_{03} de las fórmulas (I), (II) o (III). En algunas formas de realización, el conector (L) está unido a D mediante un enlace covalente de L a R_{09} de las fórmulas (I), (II) o (III).

[91] En algunas formas de realización, D comprende:

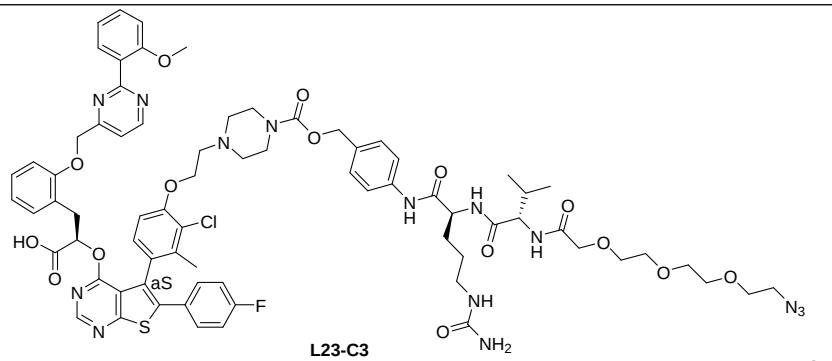
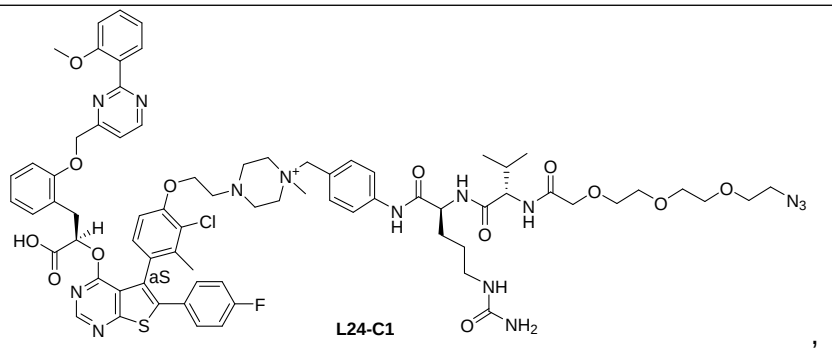

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

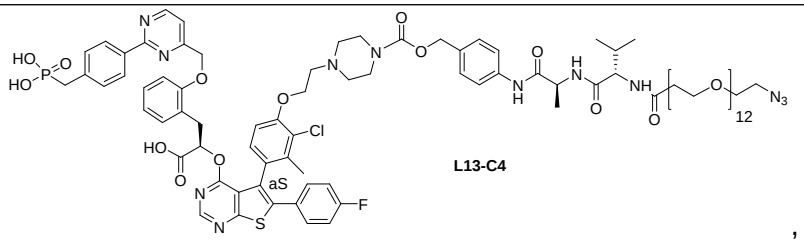

, o

, o

un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

[92] En algunas formas de realización, -(L-D) se forma a partir de un compuesto seleccionado de la Tabla A o un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo: Para los compuestos en la Tabla A, dependiendo de su carga electrónica, estos compuestos pueden contener un contraión aniónico monovalente M_1^- farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el contraión aniónico monovalente M_1^- puede seleccionarse entre bromuro, cloruro, yoduro, acetato, trifluoroacetato, benzoato, mesilato, tosilato, triflato, formiato o similares. En algunas formas de realización, el contraión aniónico monovalente M_1^- es trifluoroacetato o formiato.

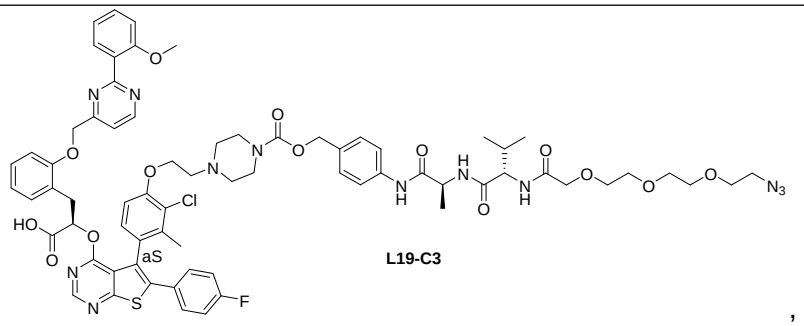
Tabla A: Ejemplos de grupos de conector-fármaco

 **L23-C3** ,
 **L24-C1** ,



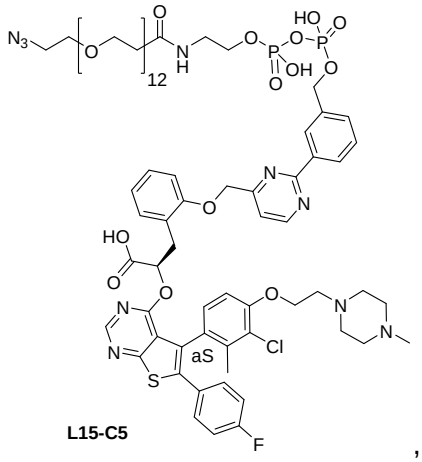
L13-C4

,



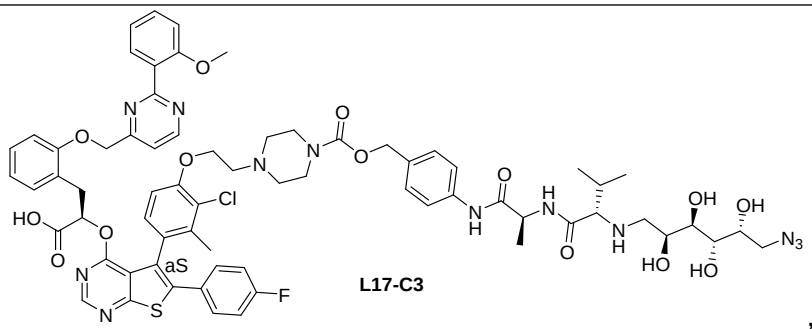
L19-C3

,



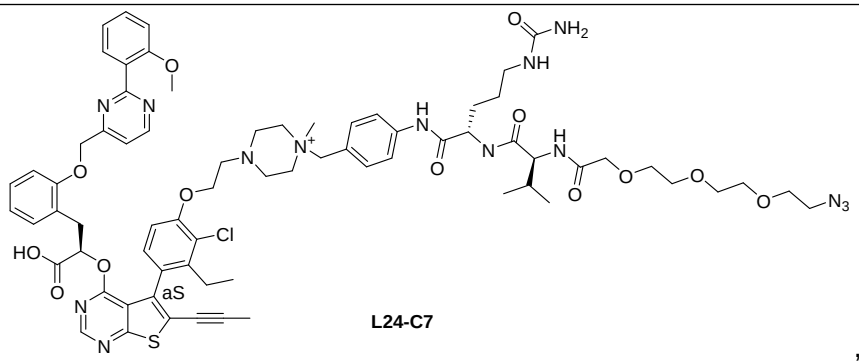
L15-C5

,



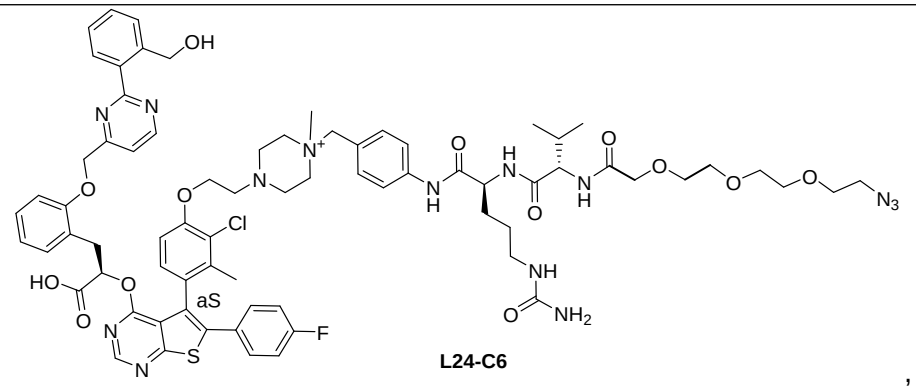
L17-C3

,



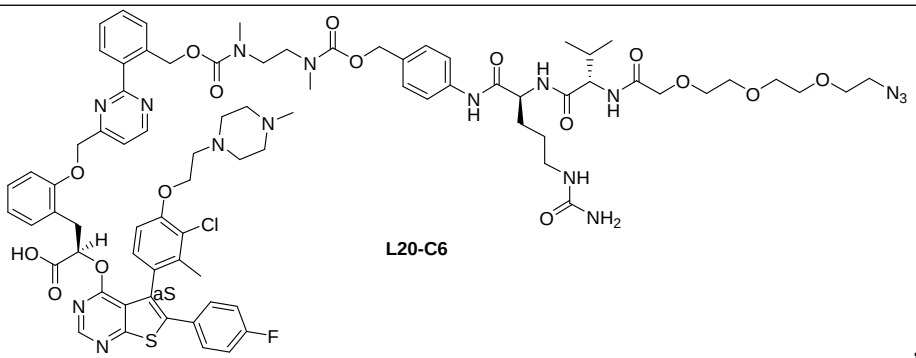
L24-C7

,



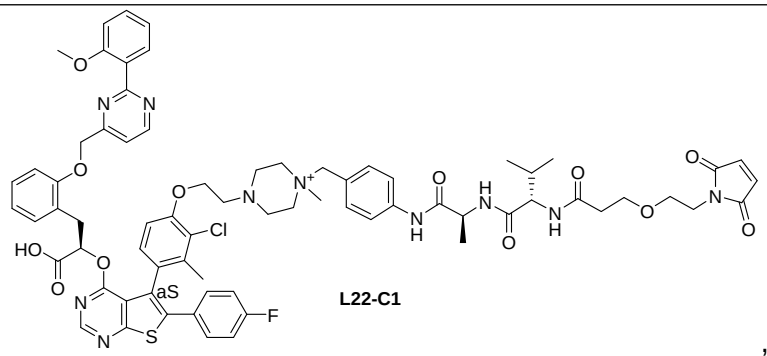
L24-C6

,



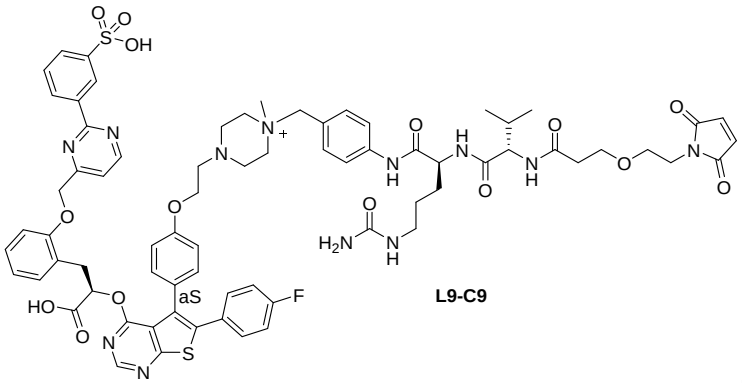
L20-C6

,



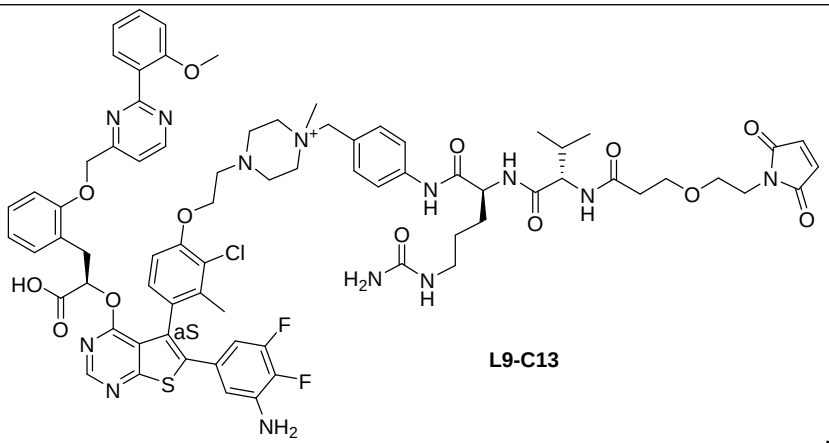
L22-C1

,



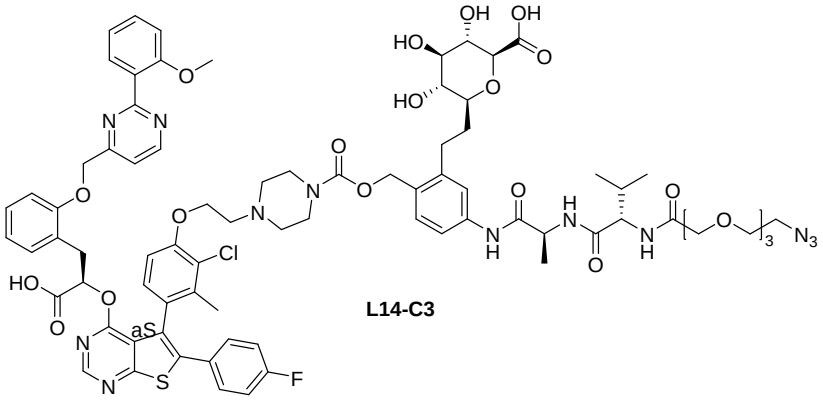
L9-C9

,



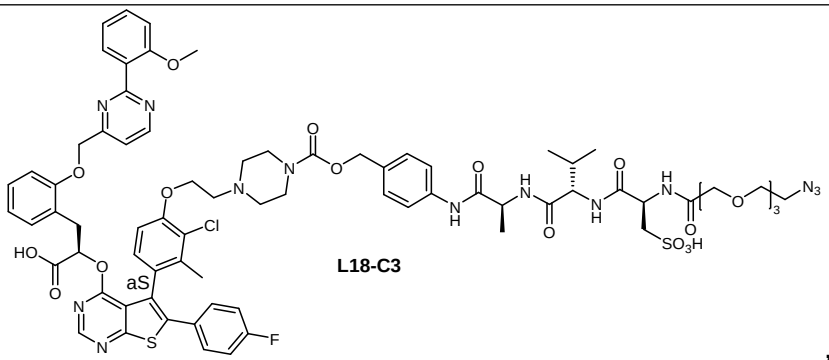
L9-C13

,



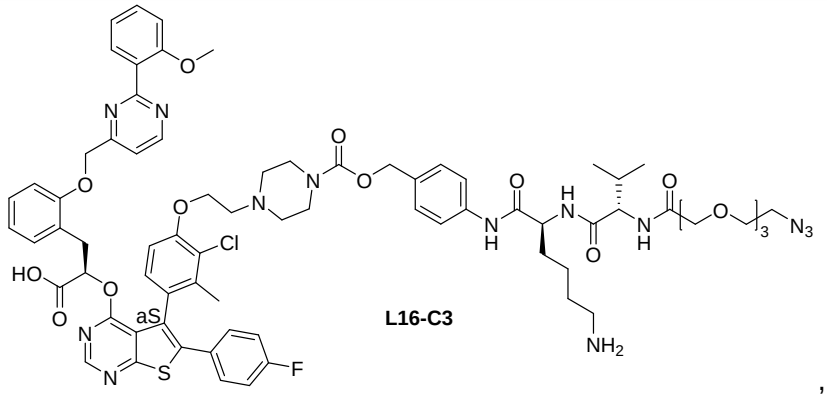
L14-C3

,



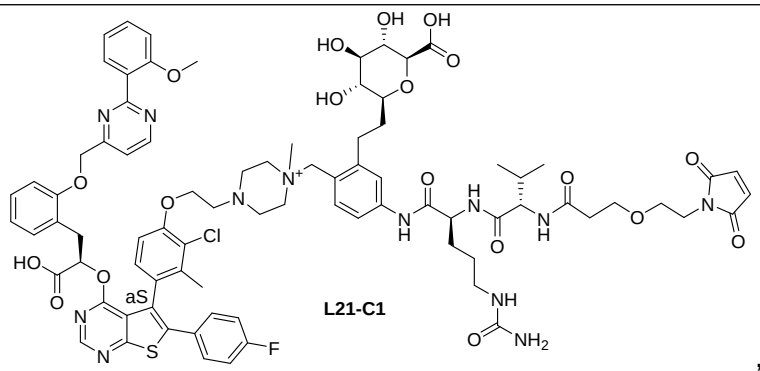
L18-C3

,



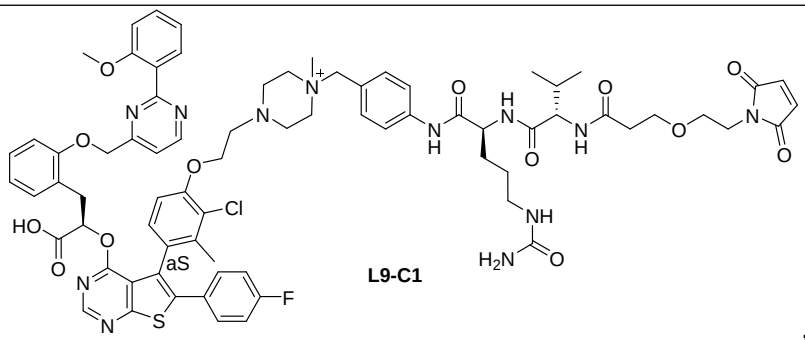
L16-C3

,



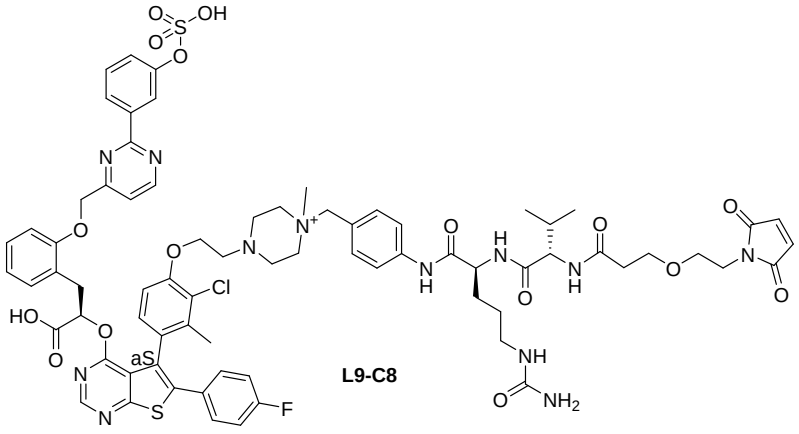
L21-C1

,



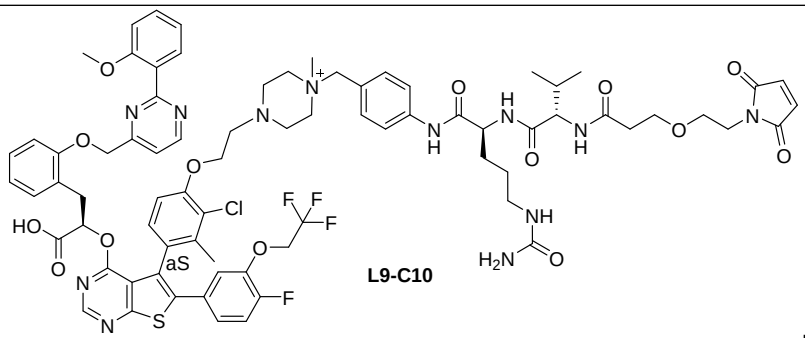
L9-C1

,



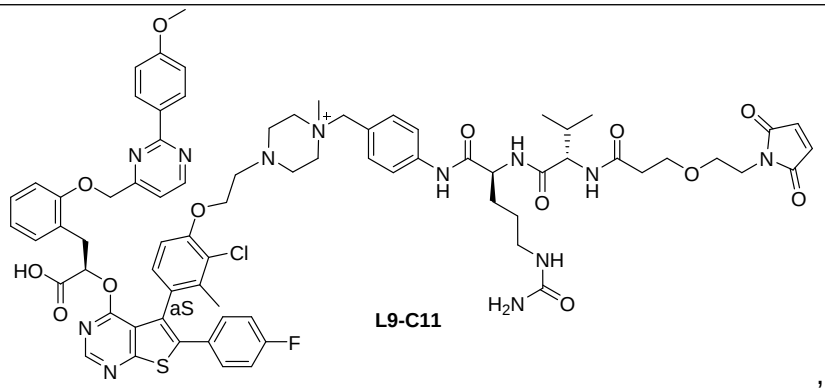
L9-C8

,



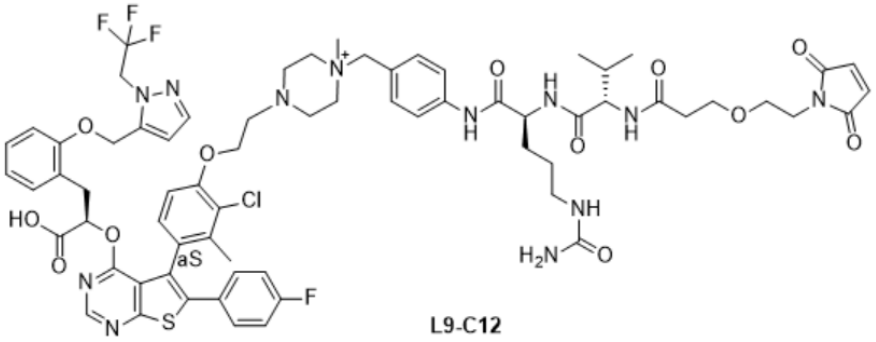
L9-C10

,



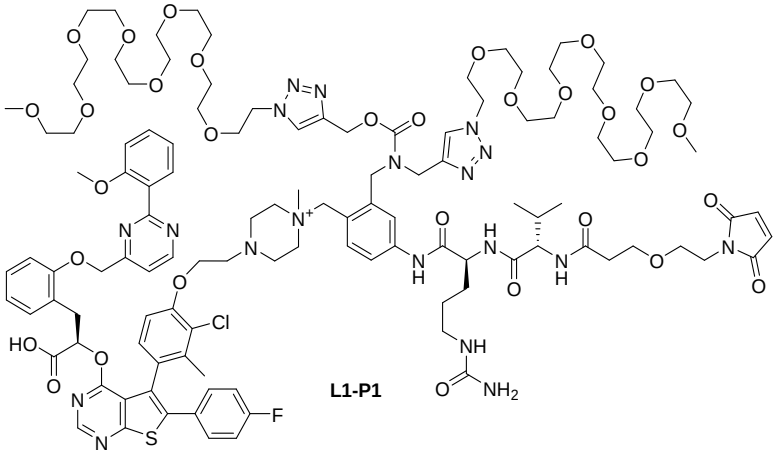
L9-C11

,



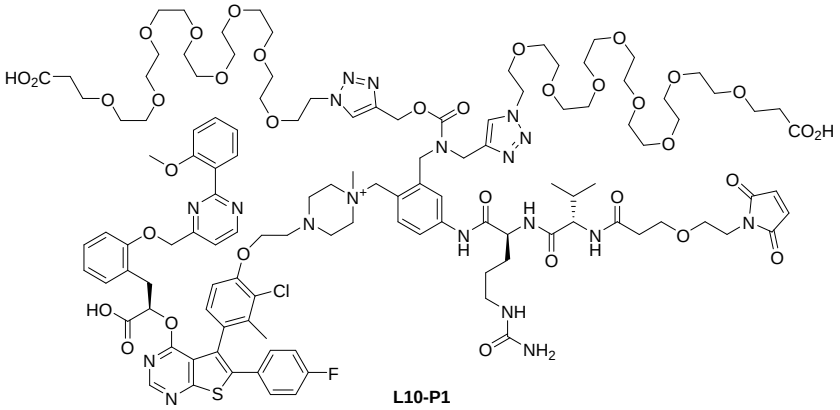
L9-C12

,



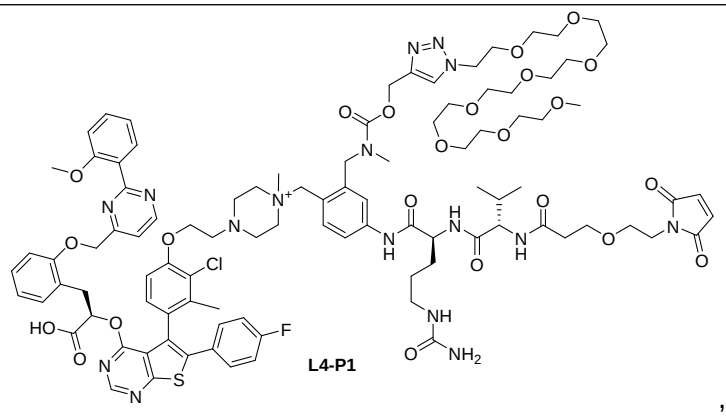
L1-P1

,



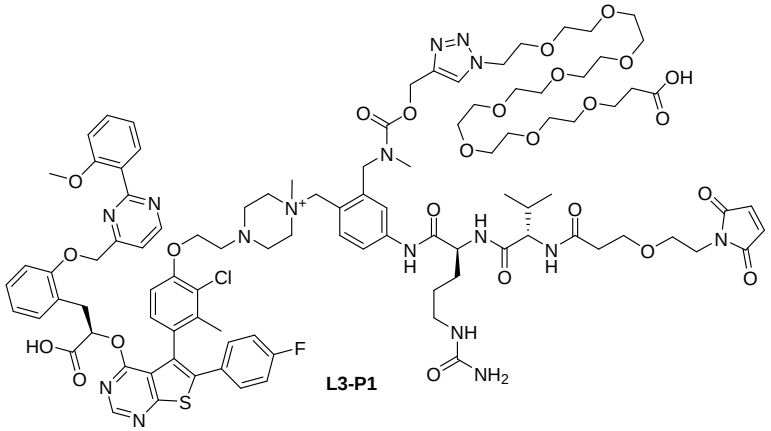
L10-P1

,



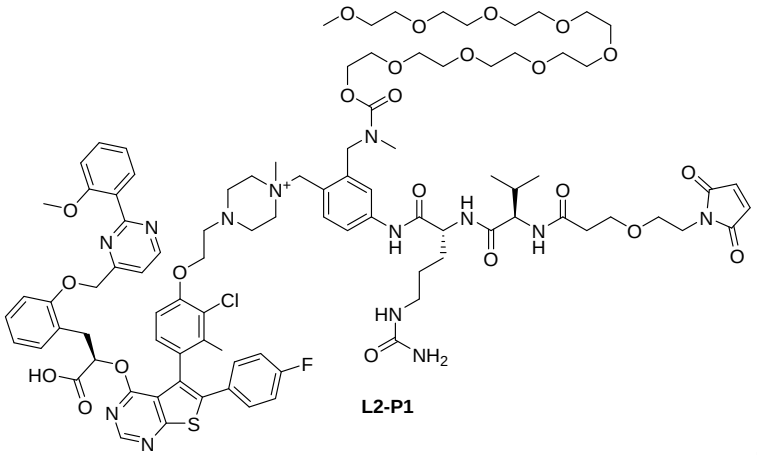
L4-P1

,



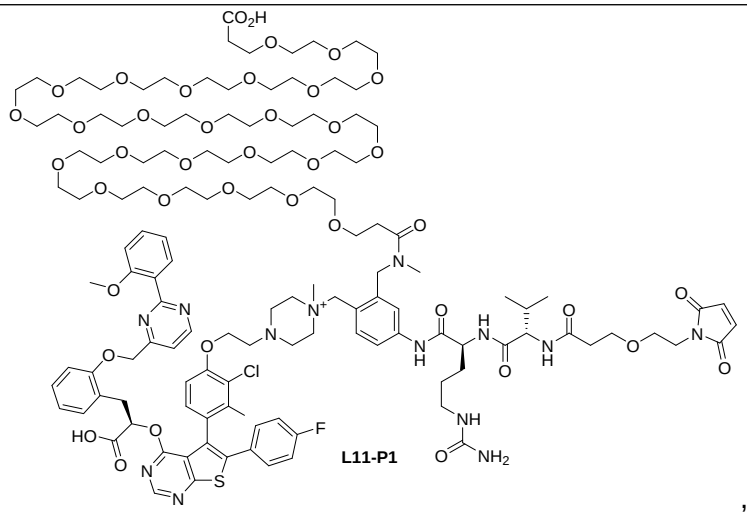
L3-P1

,



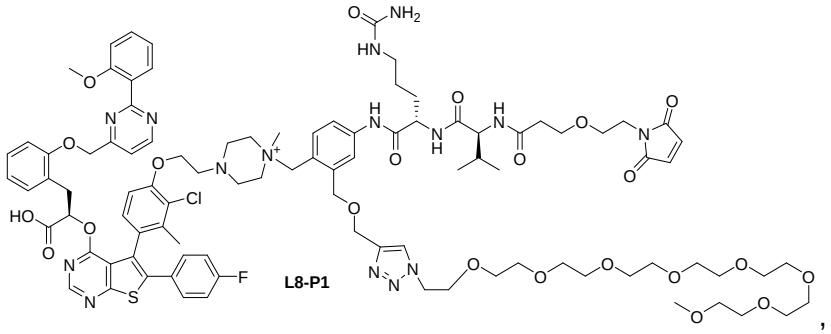
L2-P1

,



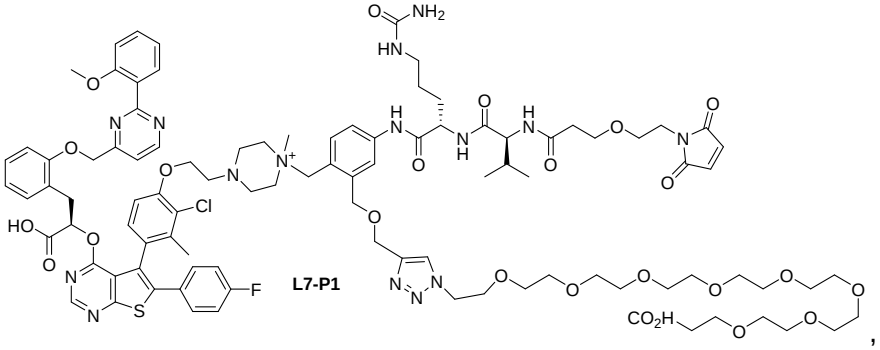
L11-P1

,



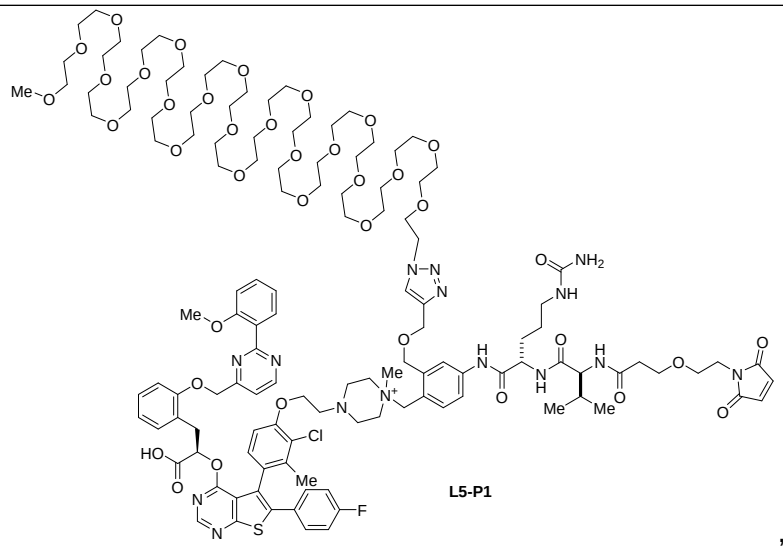
L8-P1

,



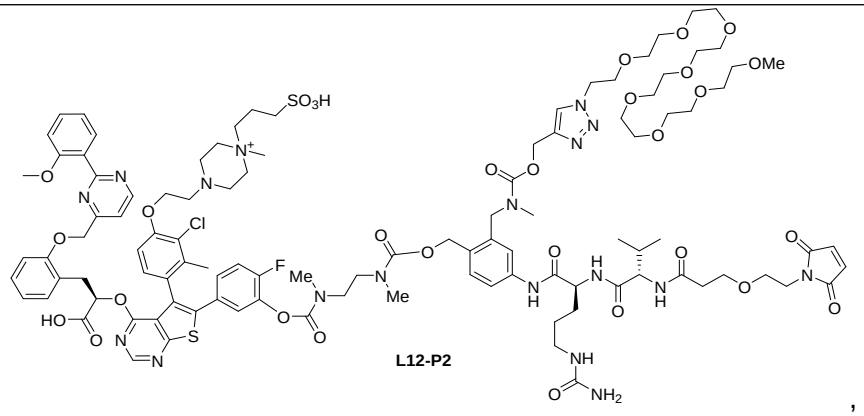
L7-P1

,



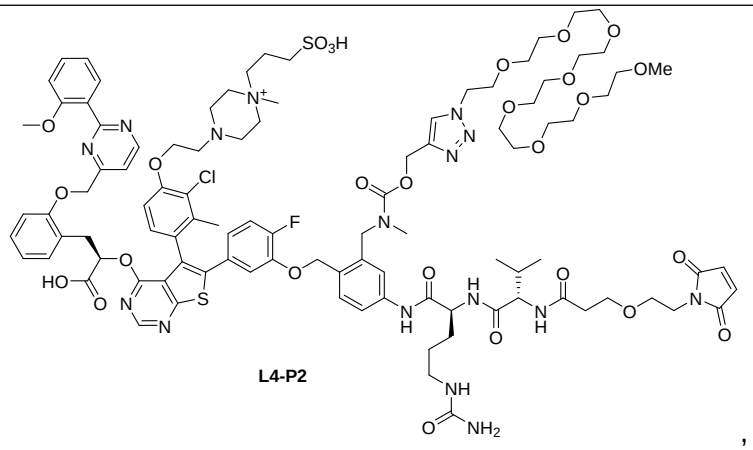
L5-P1

,



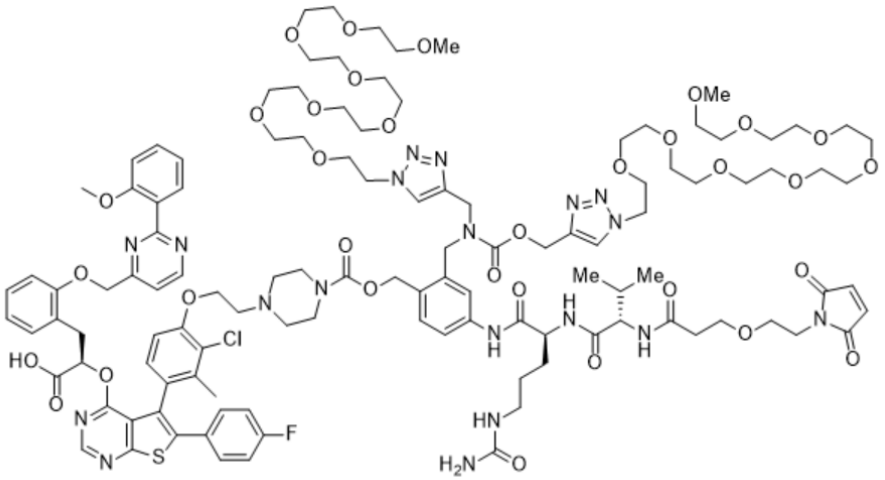
L12-P2

,

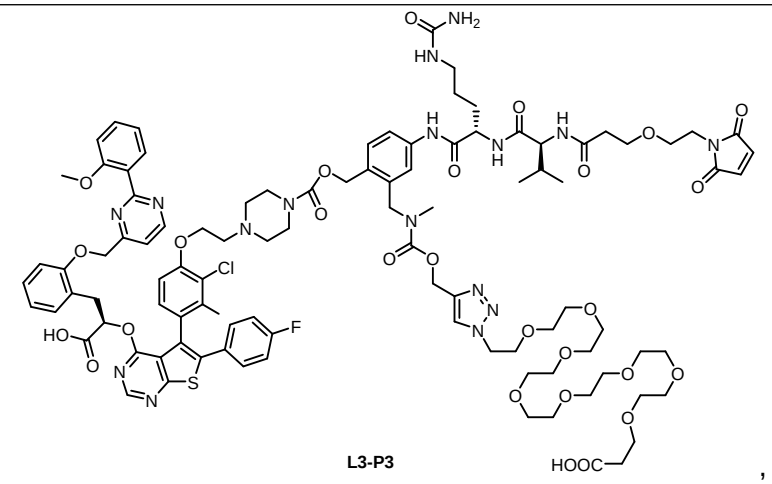


L4-P2

,

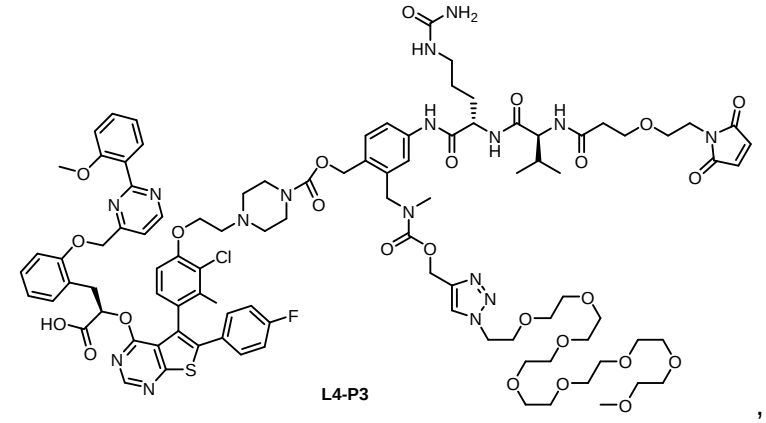


L1-P3,



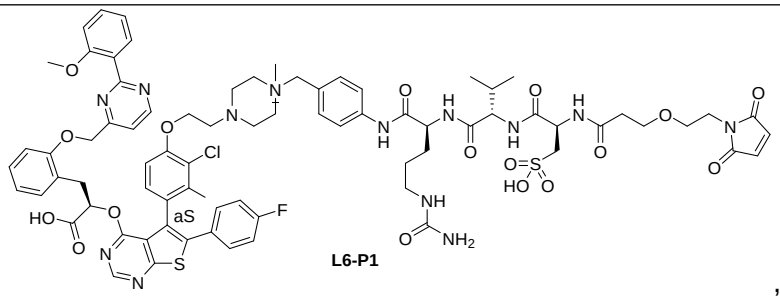
L3-P3

,



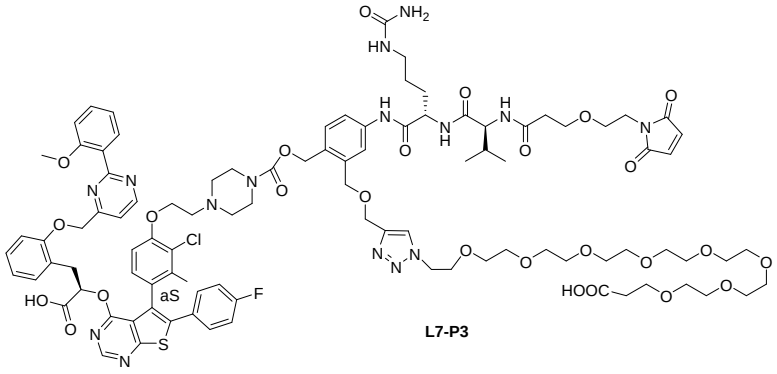
L4-P3

,



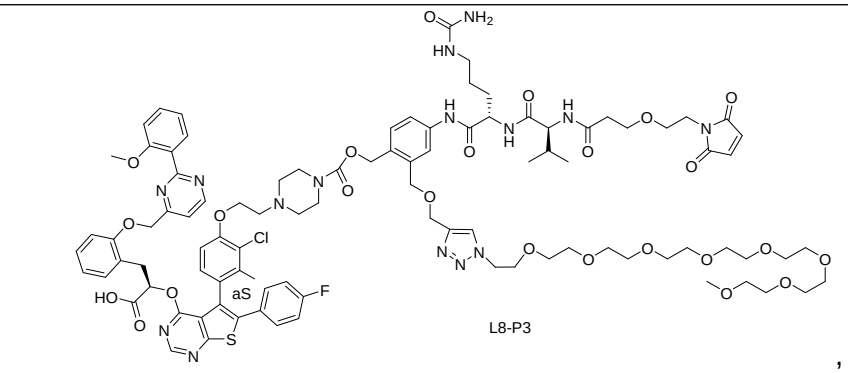
L6-P1

,



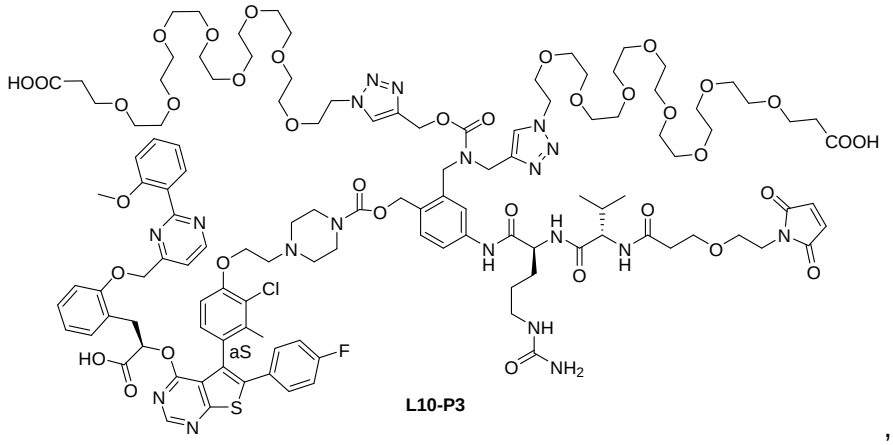
L7-P3

,



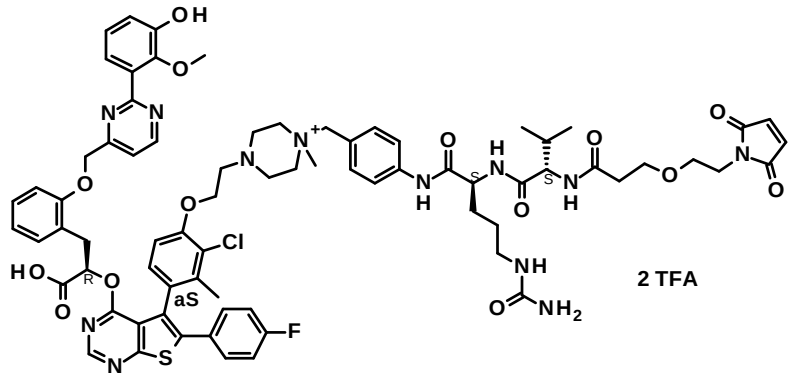
L8-P3

,



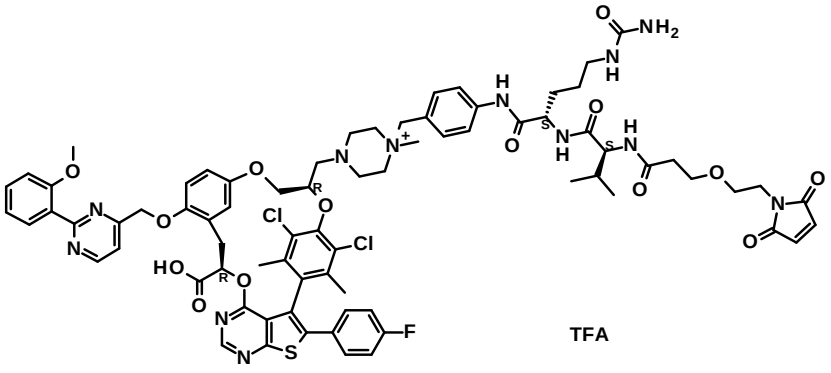
L10-P3

,



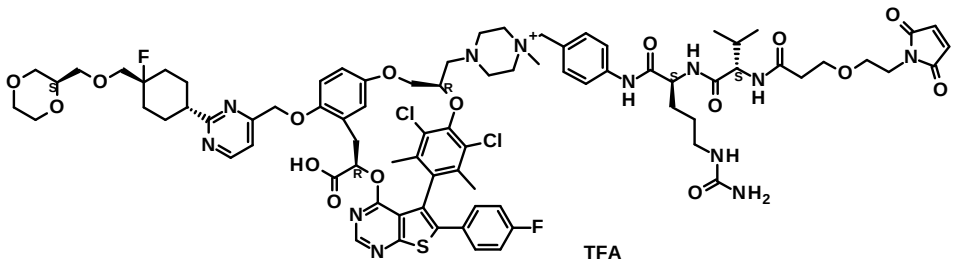
2 TFA

L9-C14,

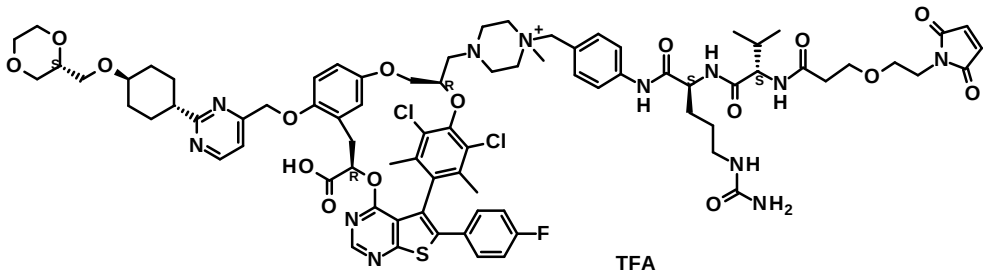


TFA

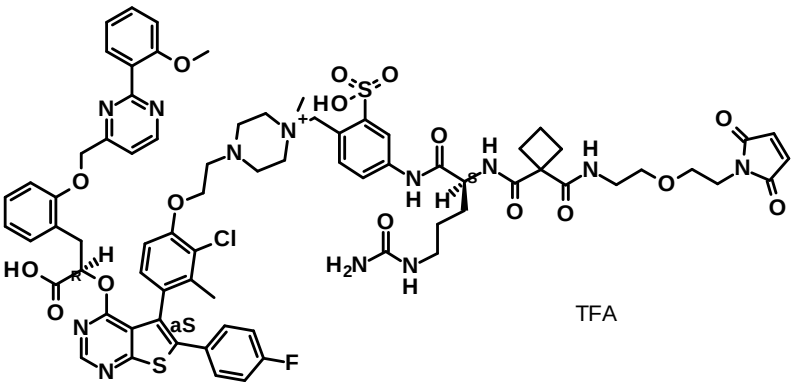
L9-P15,



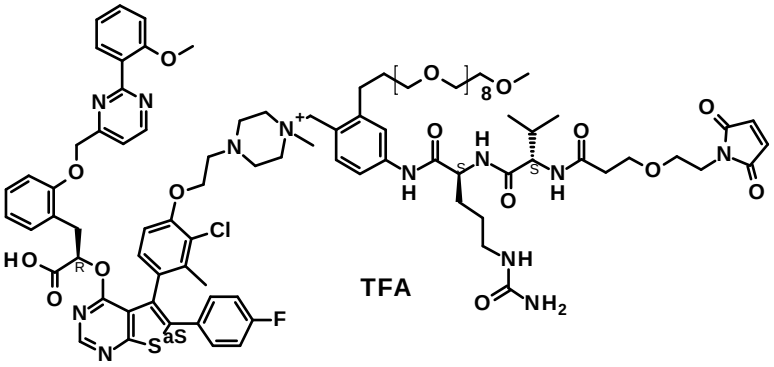
L9-P16,



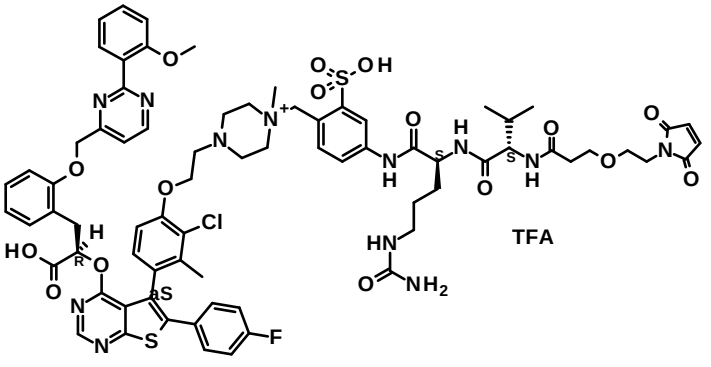
L9-P17,



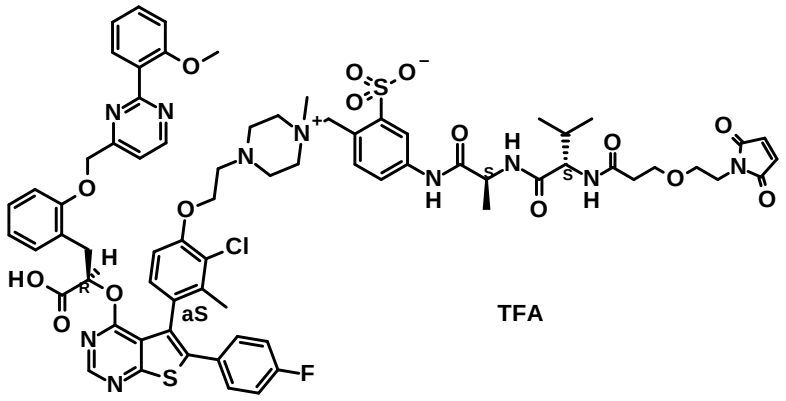
L25-P1.



L26-P1,

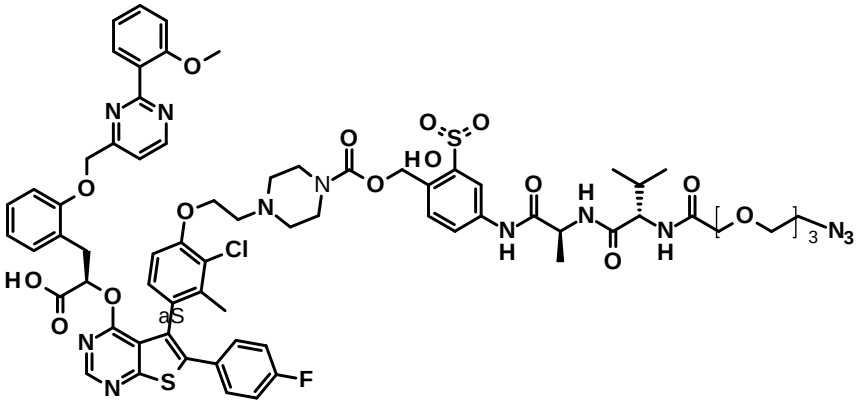


L27-P1,

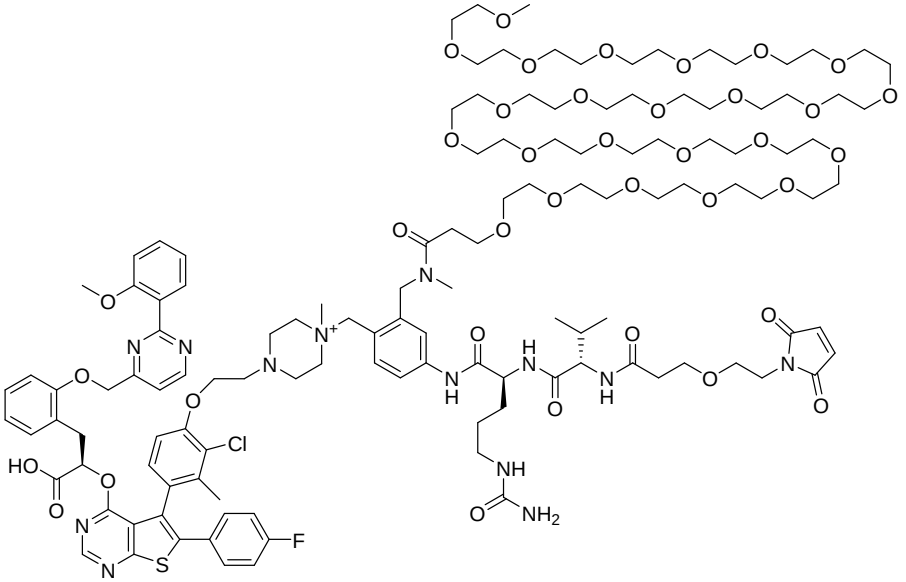


TFA

L28-P1,

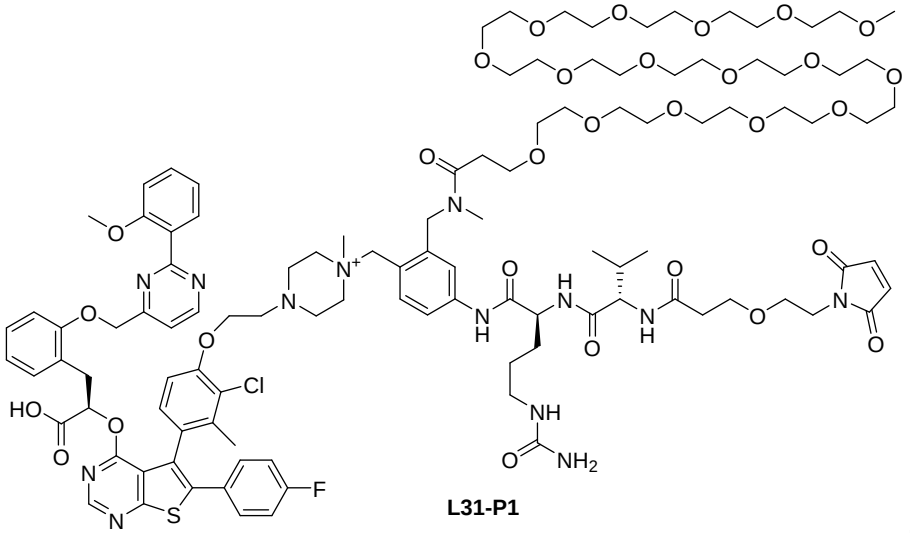


L29-C3,



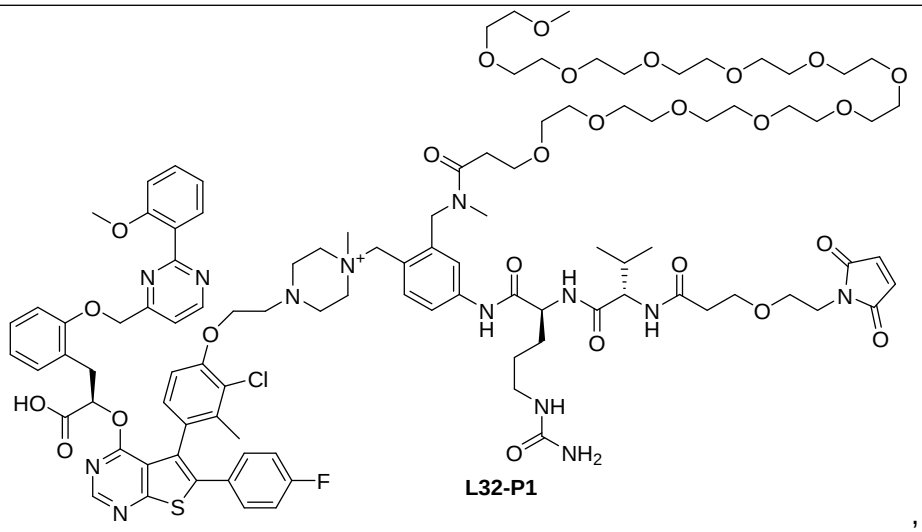
L30-P1

,



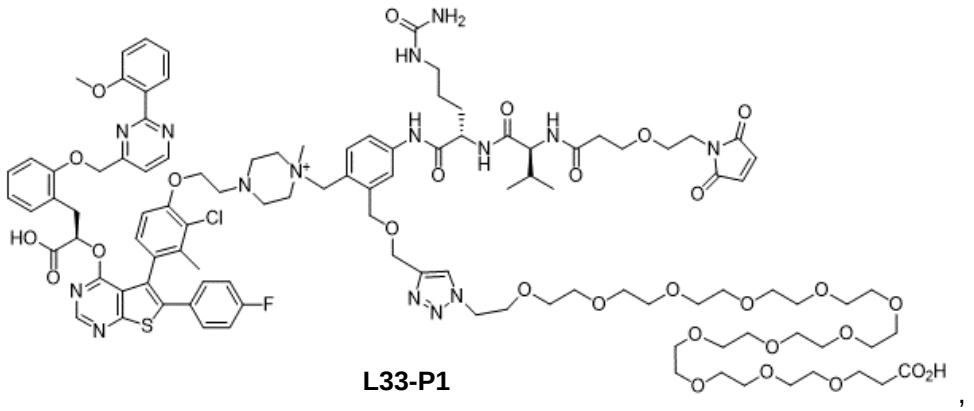
L31-P1

,



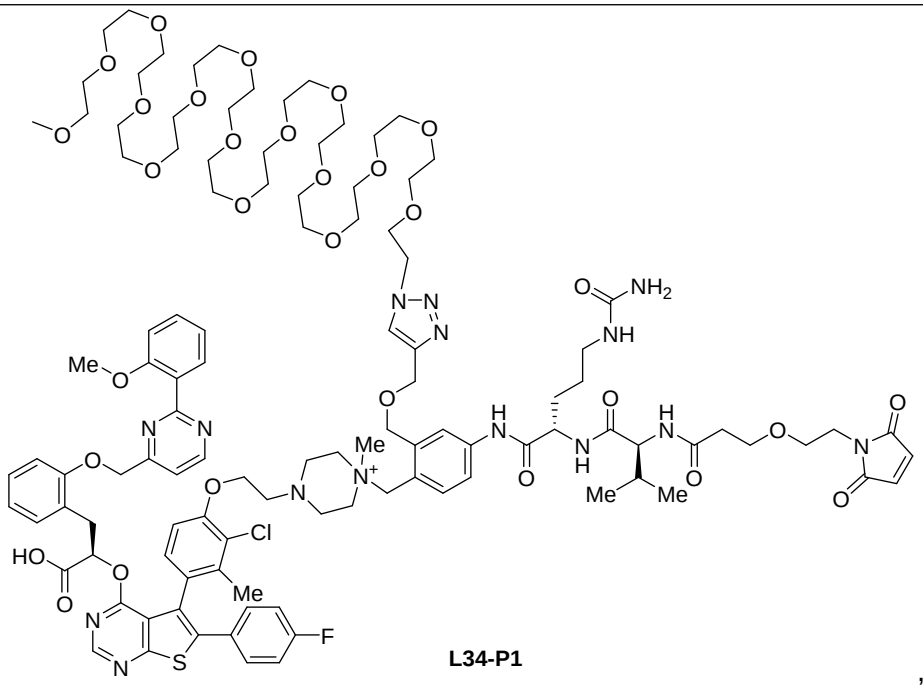
L32-P1

,



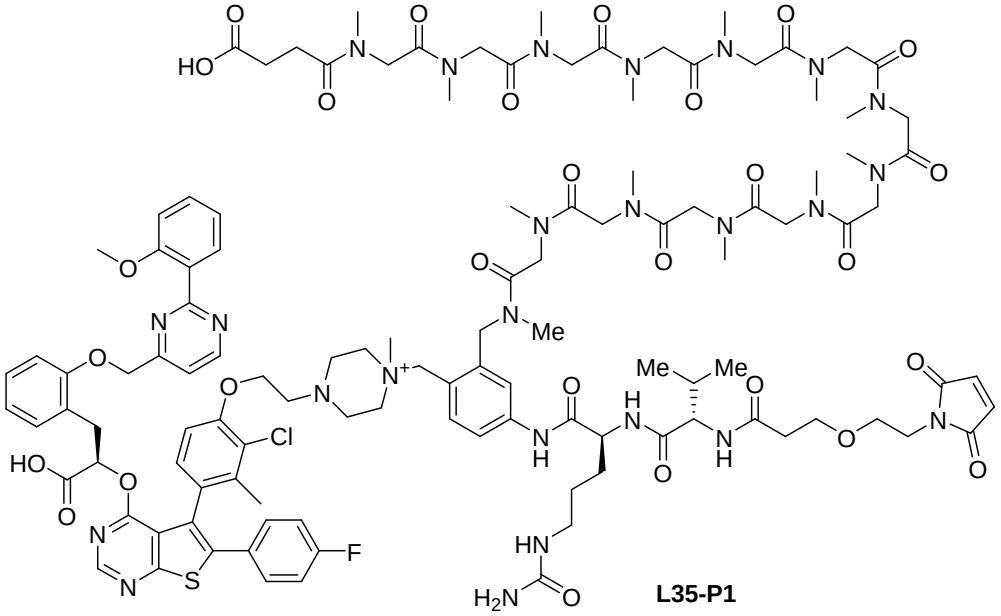
L33-P1

,



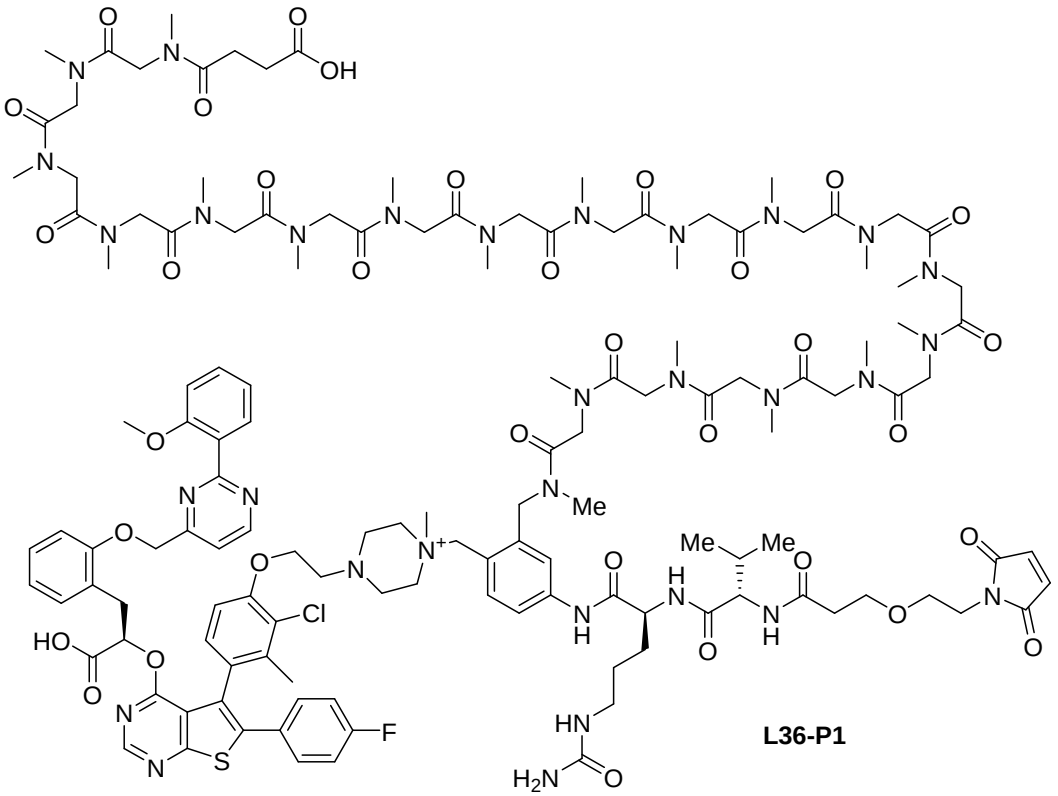
L34-P1

,



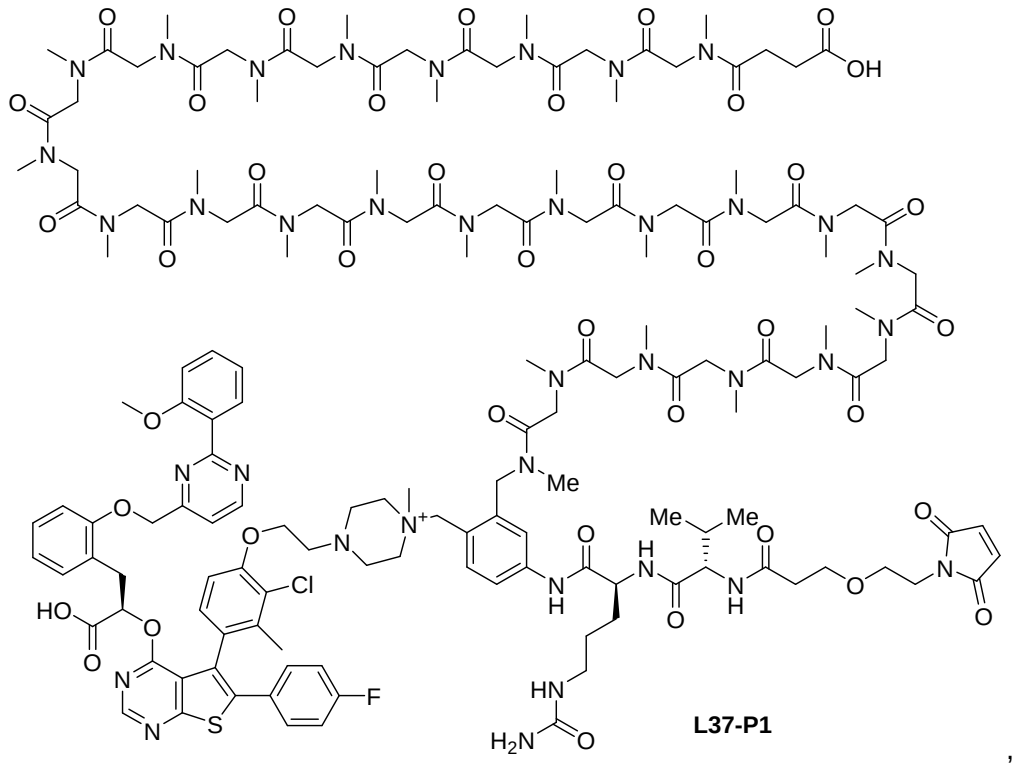
L35-P1

,



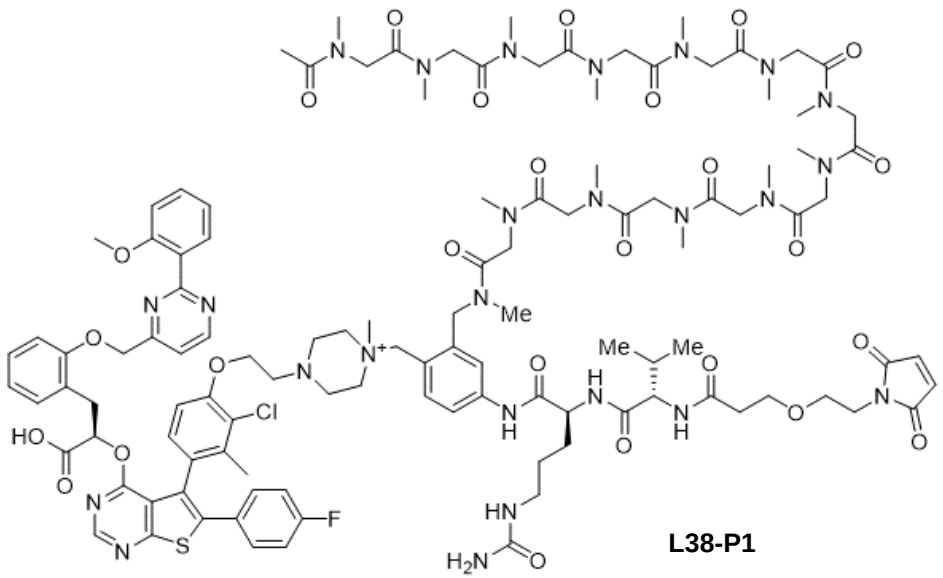
L36-P1

,



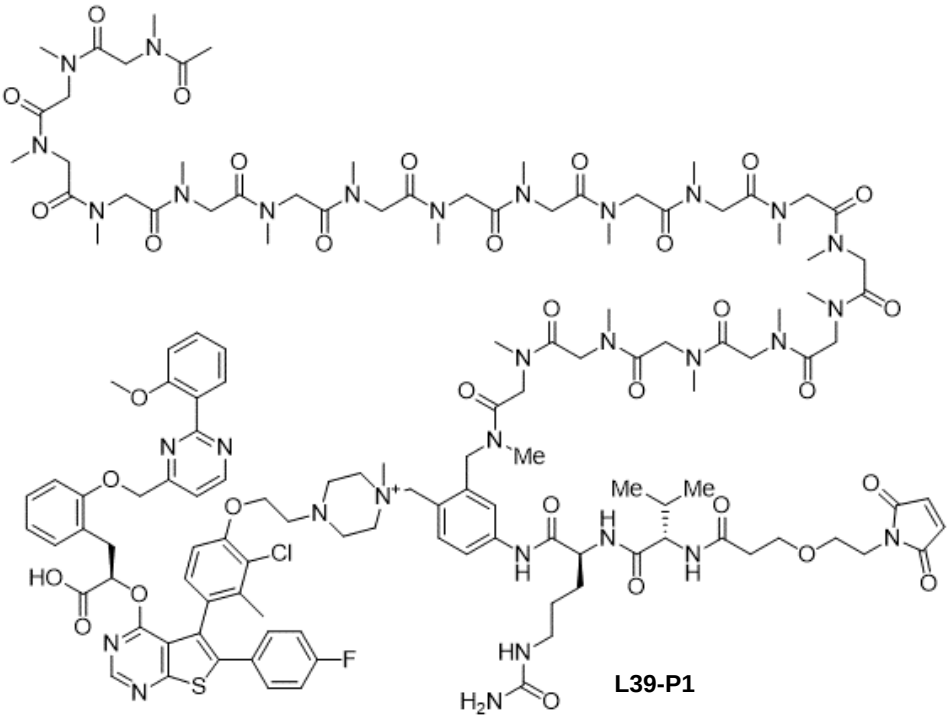
L37-P1

,



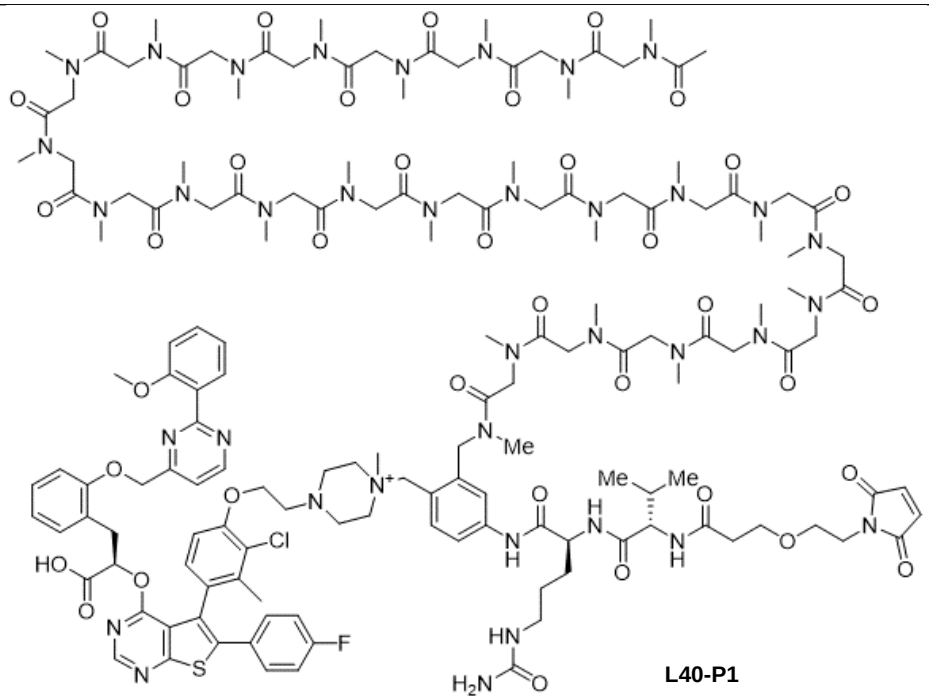
L38-P1

,



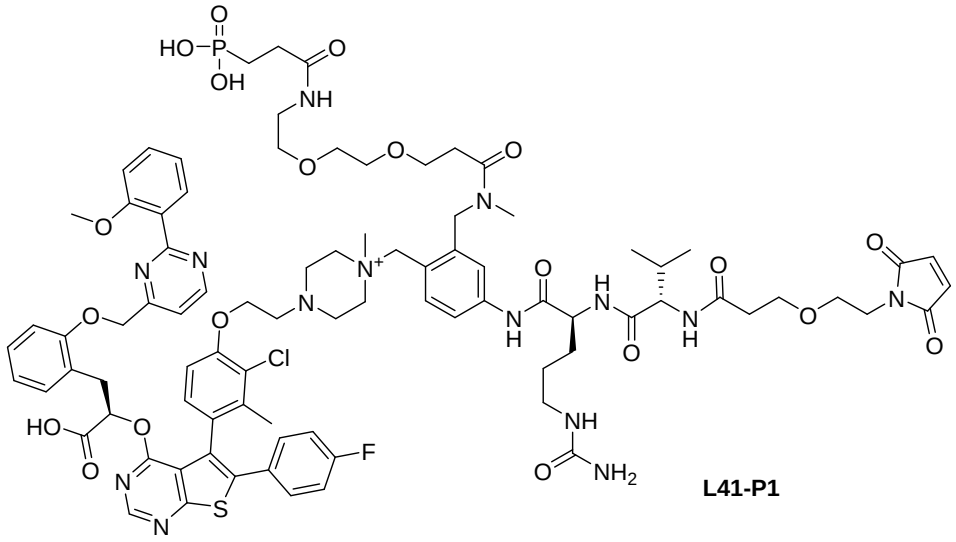
L39-P1

,



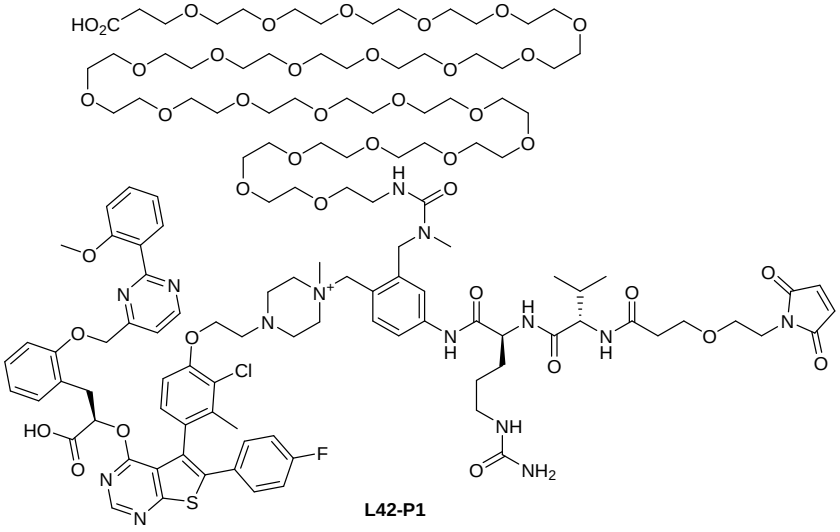
L40-P1

,



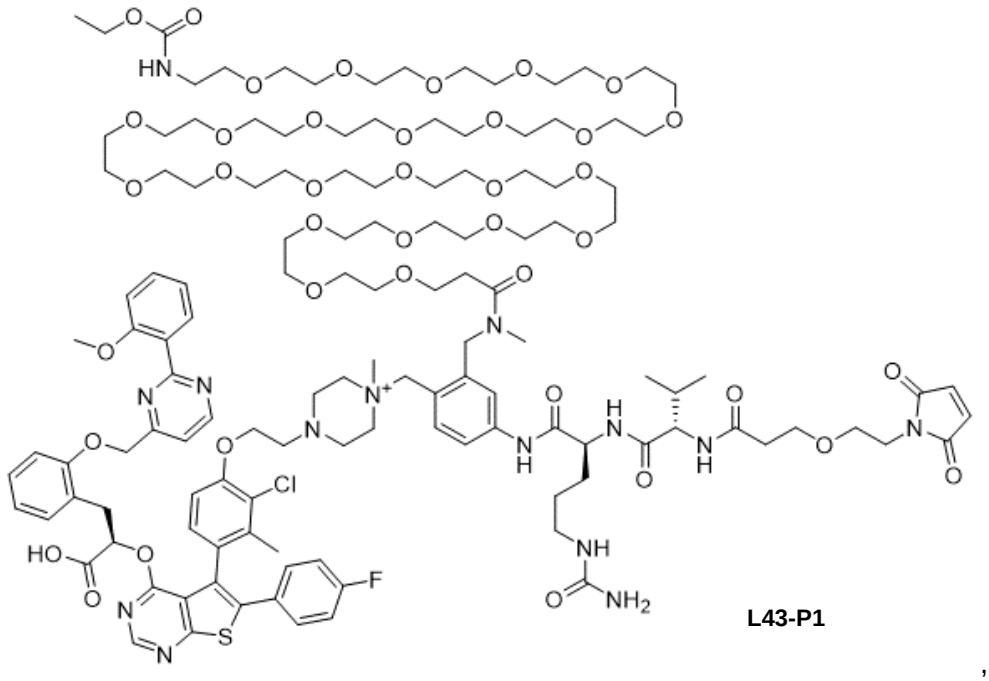
L41-P1

,



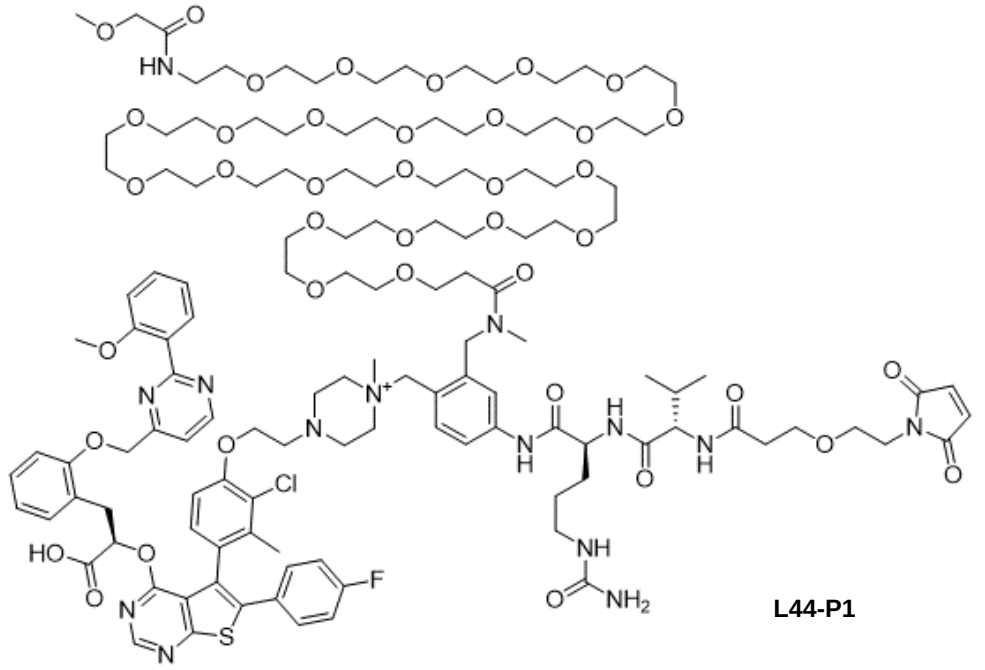
L42-P1

,



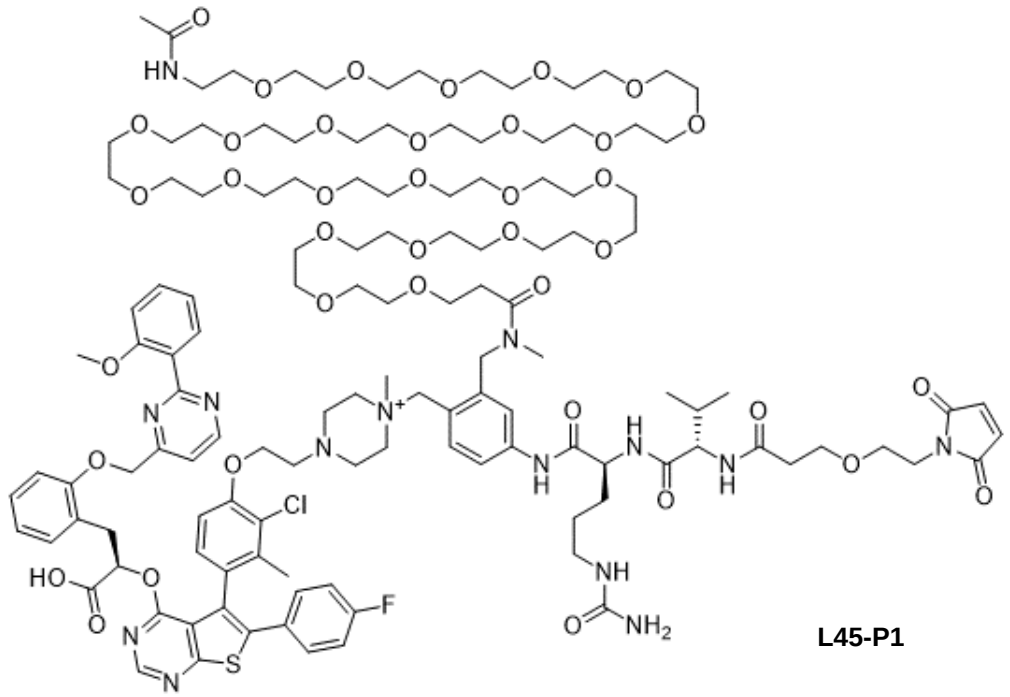
L43-P1

,



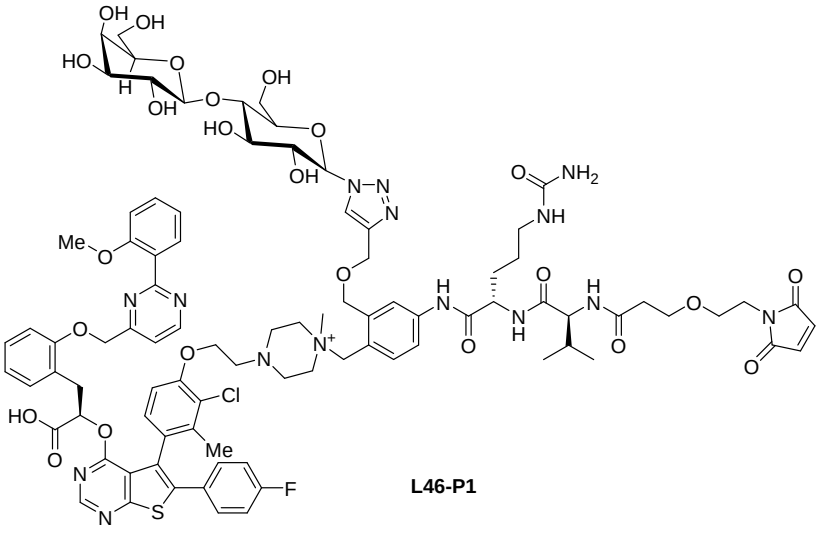
L44-P1

,



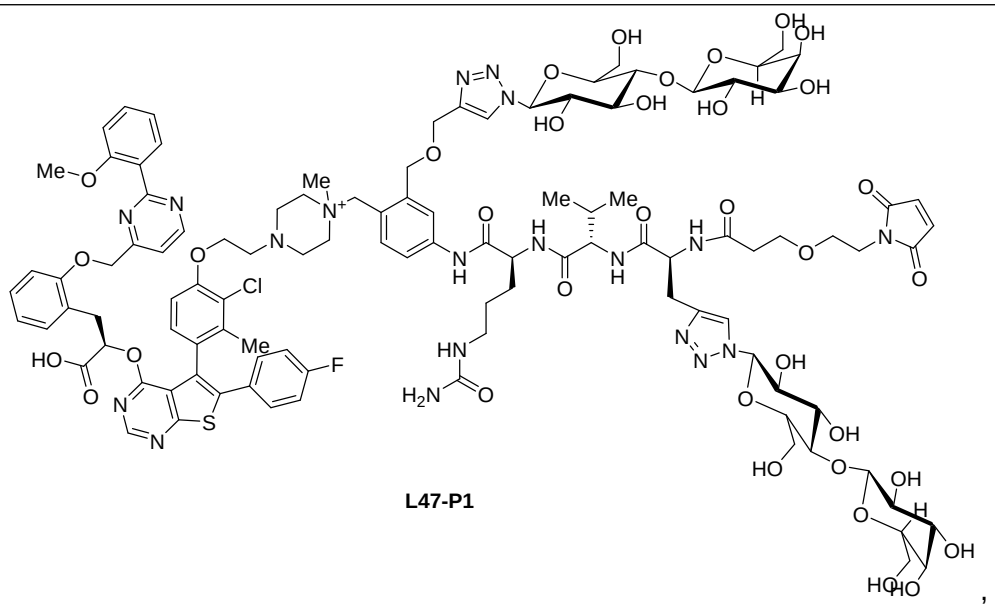
L45-P1

,



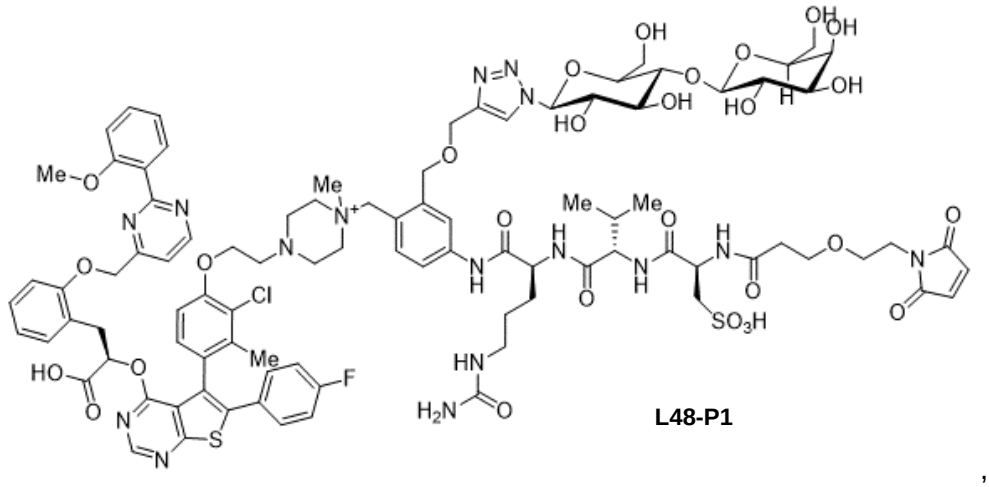
L46-P1

,



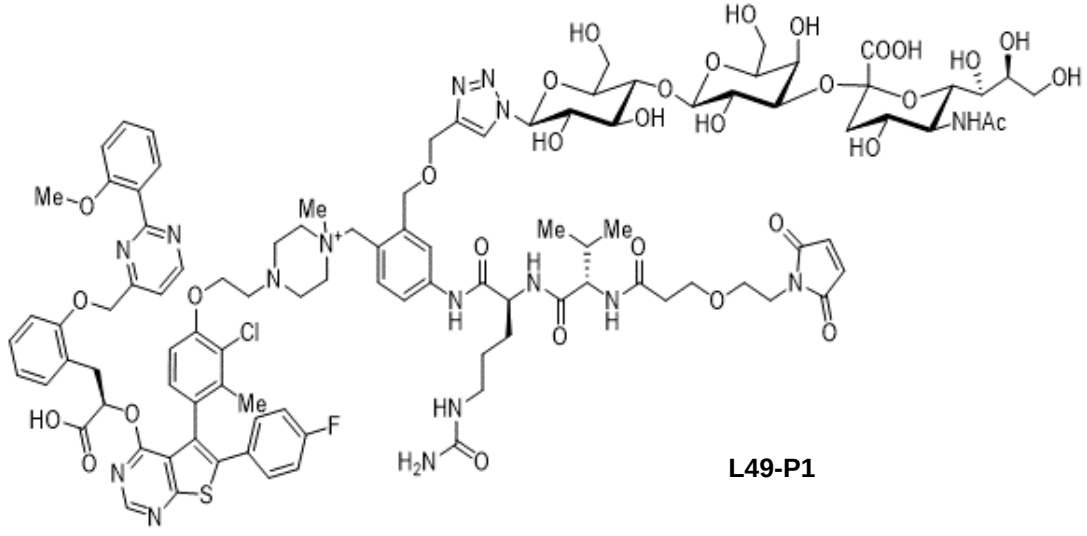
L47-P1

,



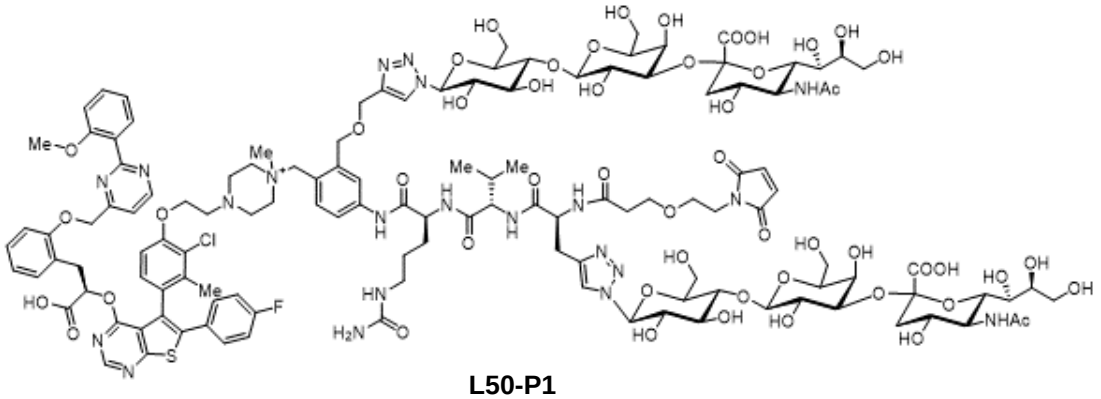
L48-P1

,



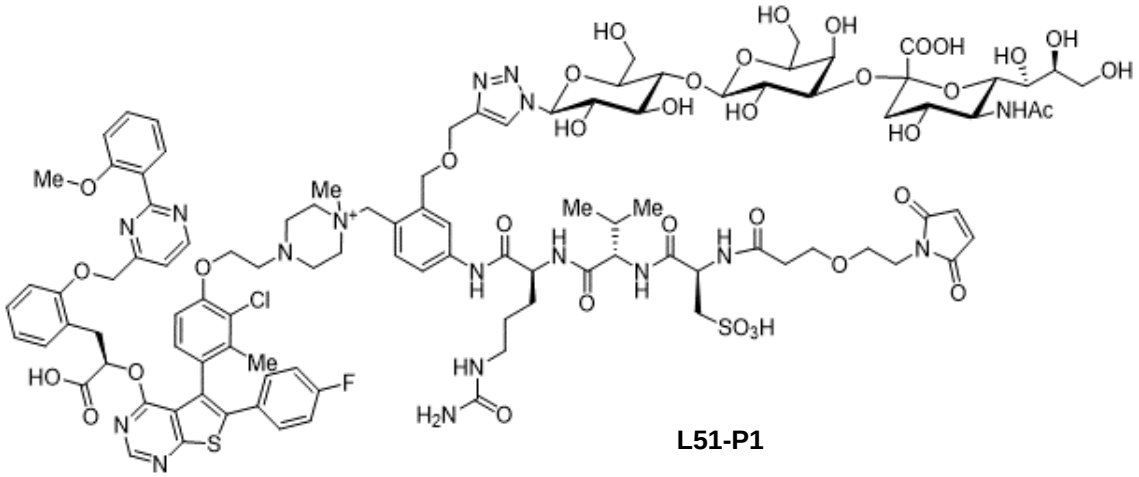
L49-P1

,



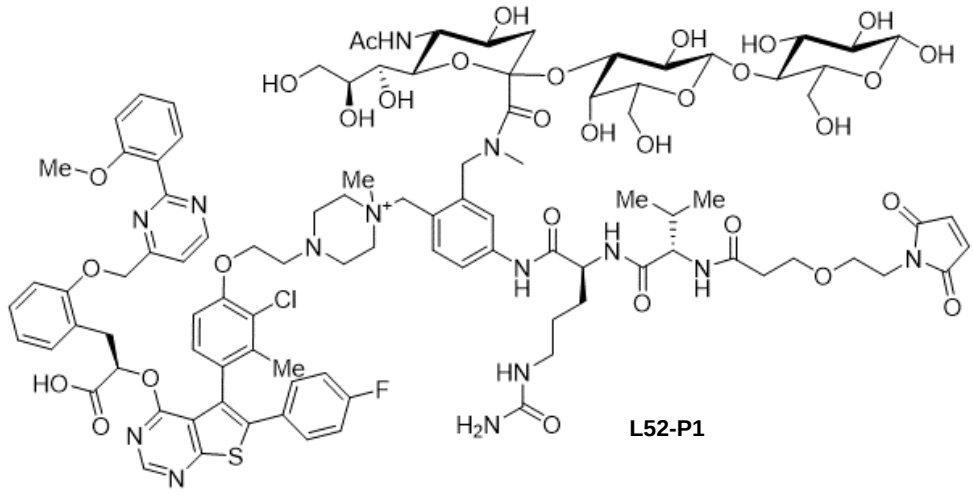
L50-P1

,



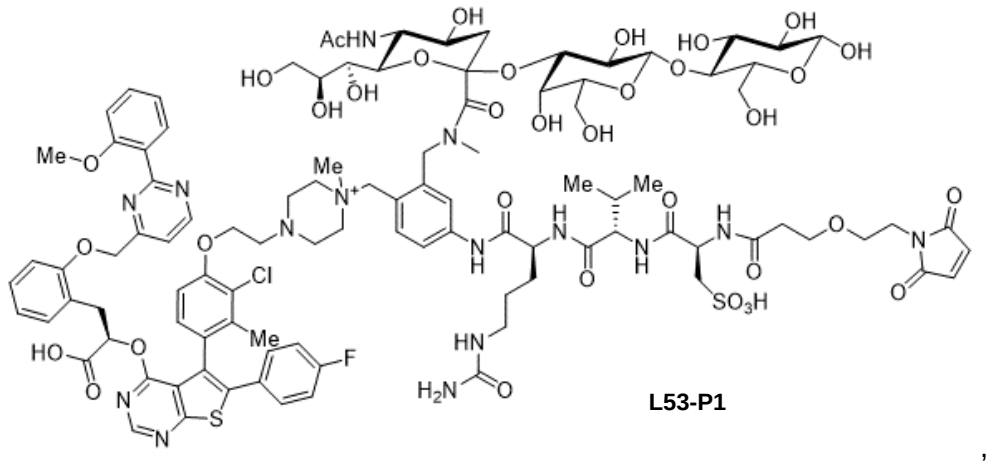
L51-P1

,



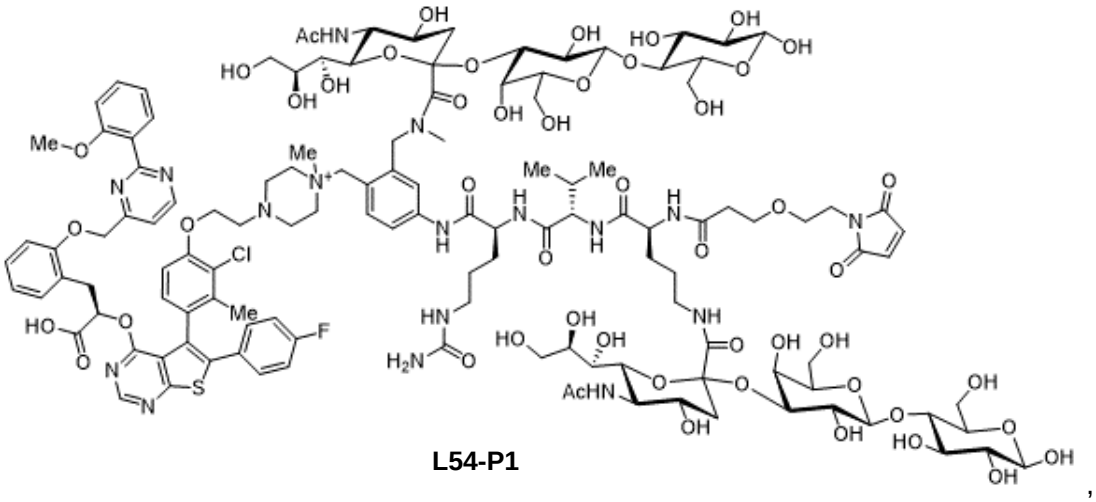
L52-P1

,



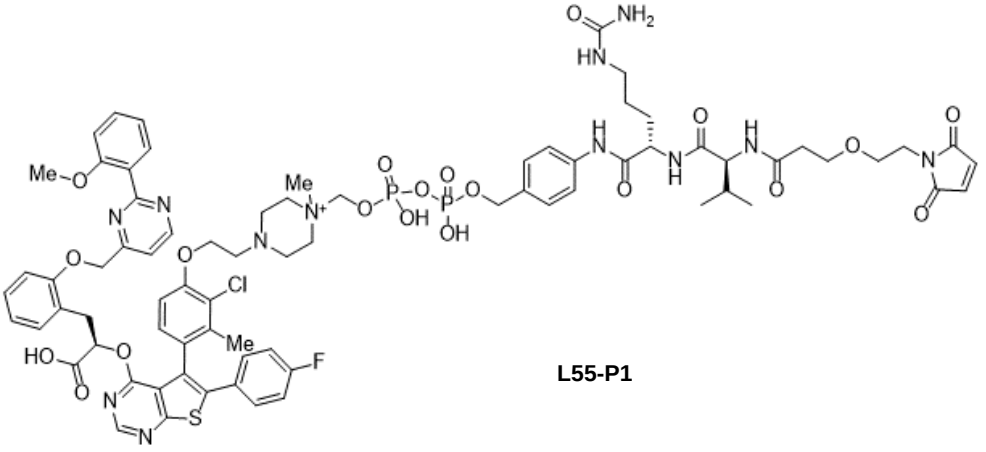
L53-P1

,



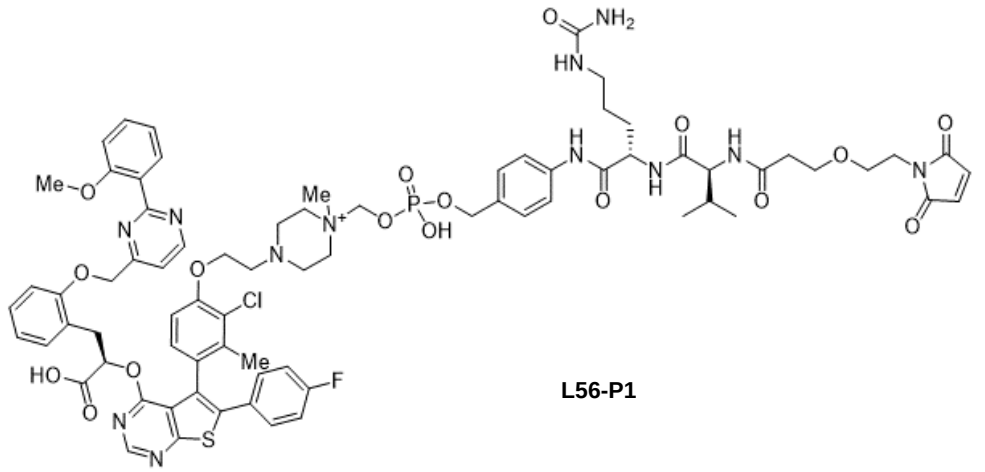
L54-P1

,



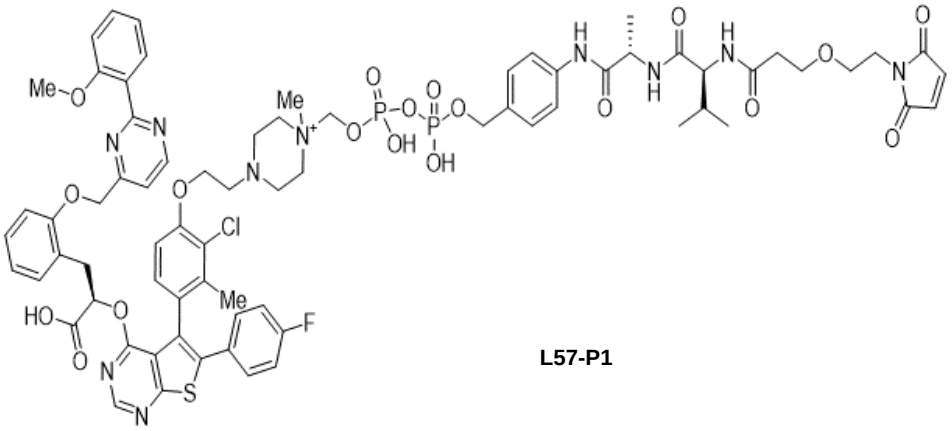
L55-P1

,



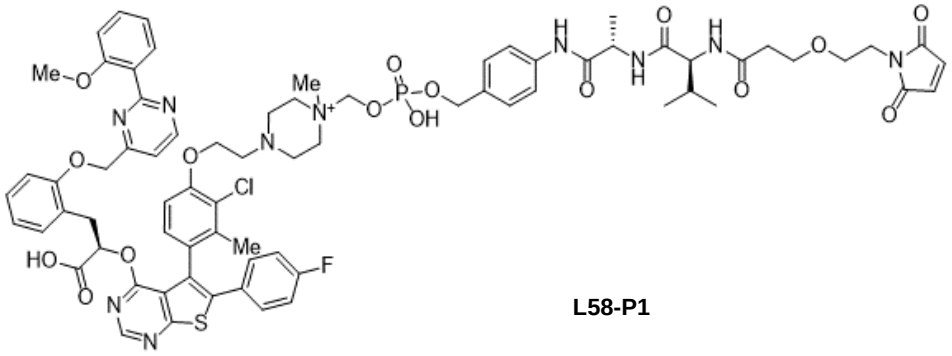
L56-P1

,



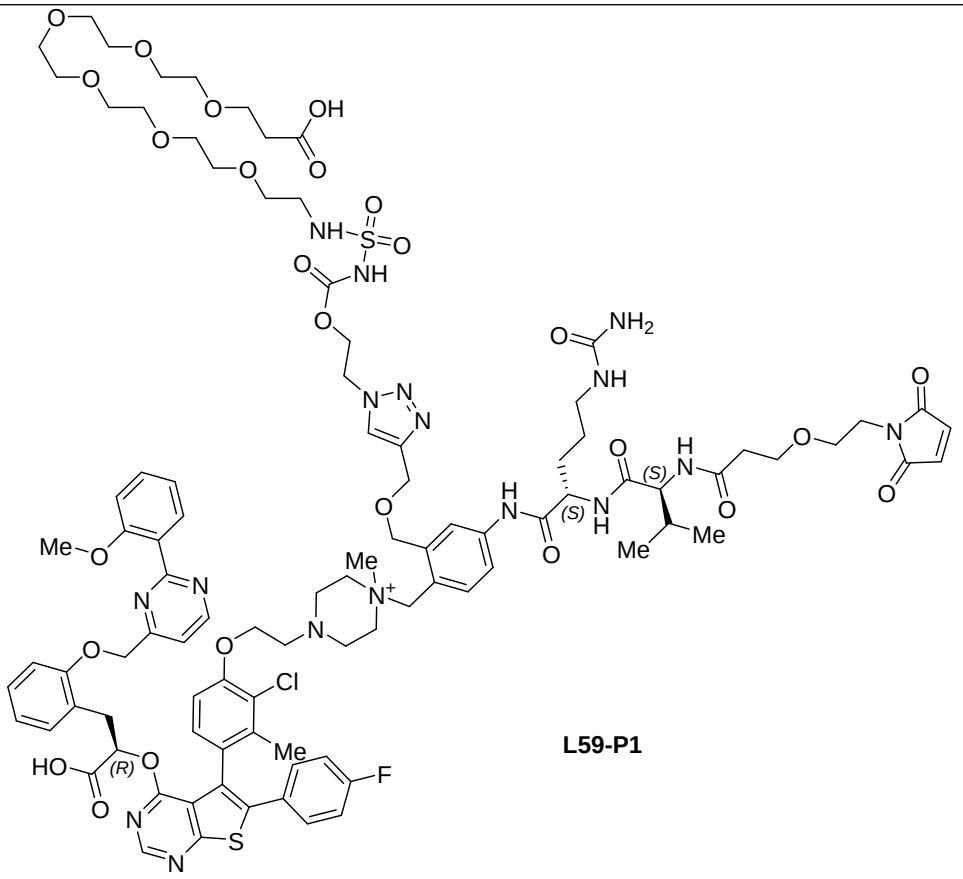
L57-P1

,



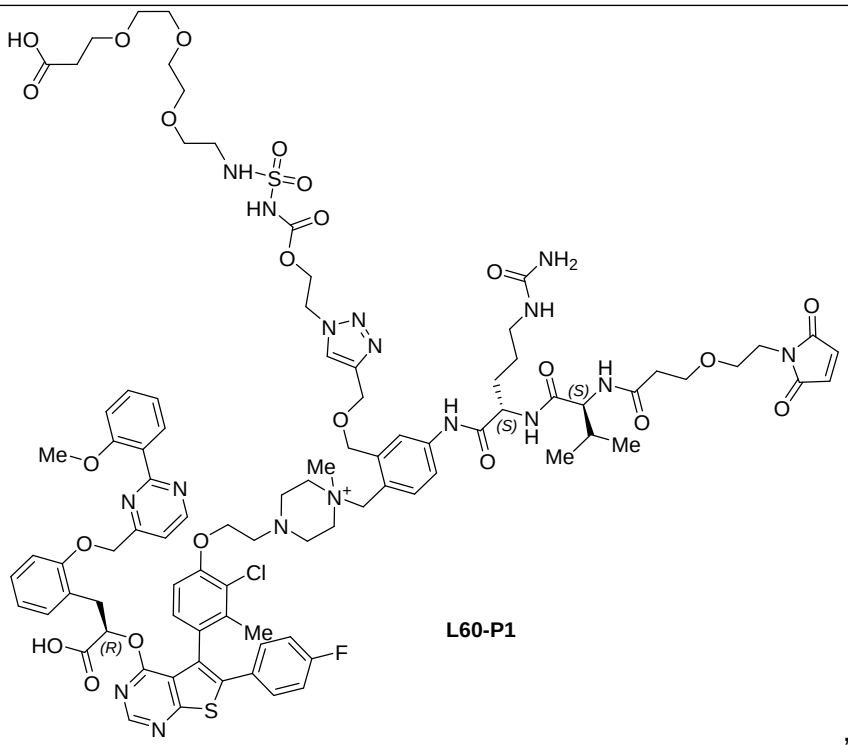
L58-P1

,



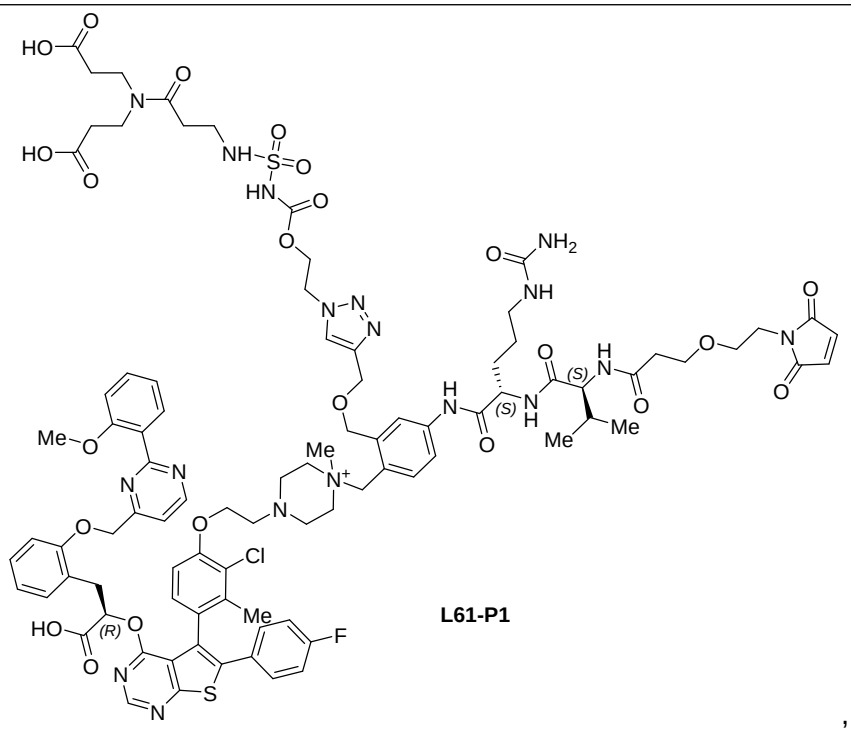
L59-P1

,



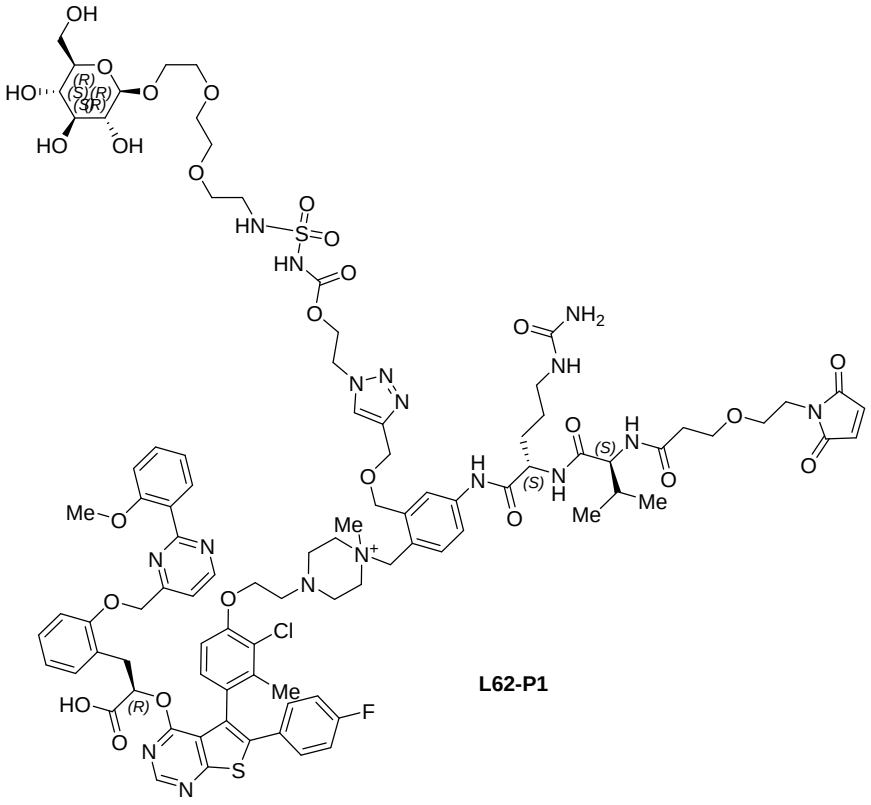
L60-P1

,



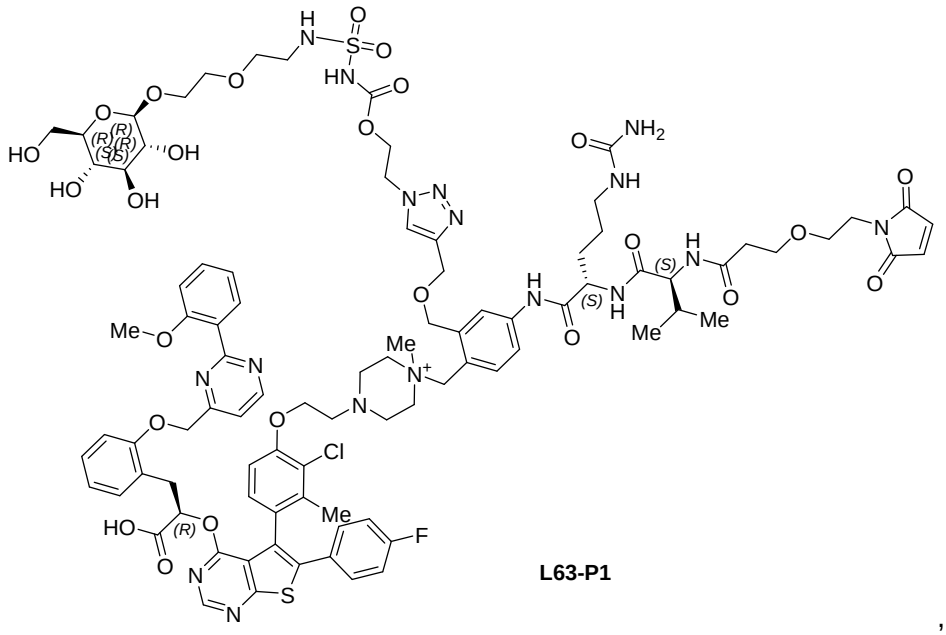
L61-P1

,



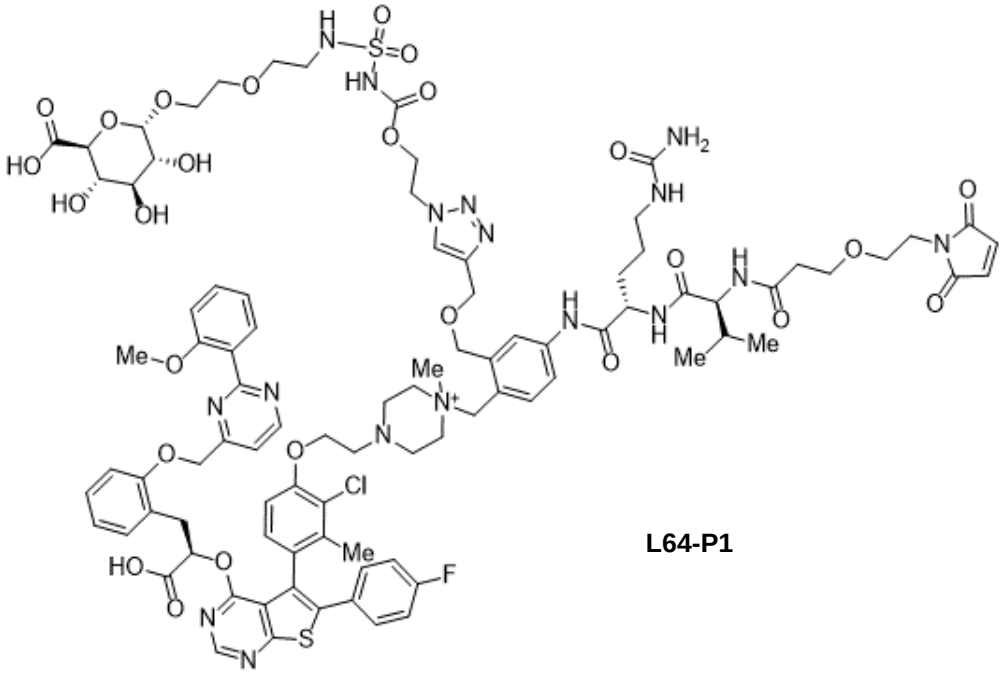
L62-P1

,



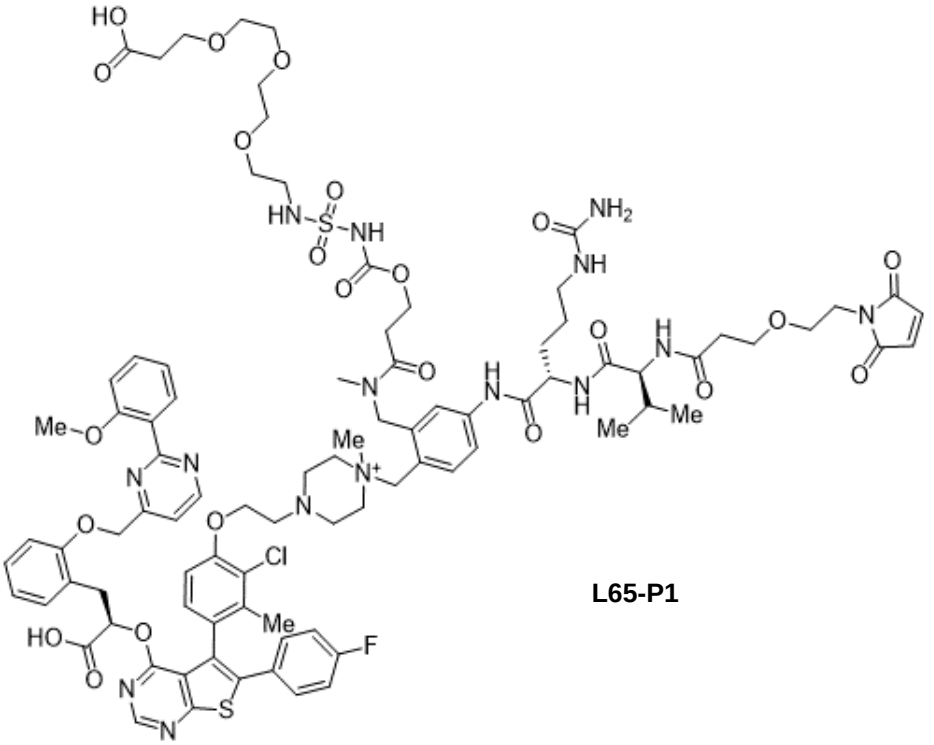
L63-P1

,



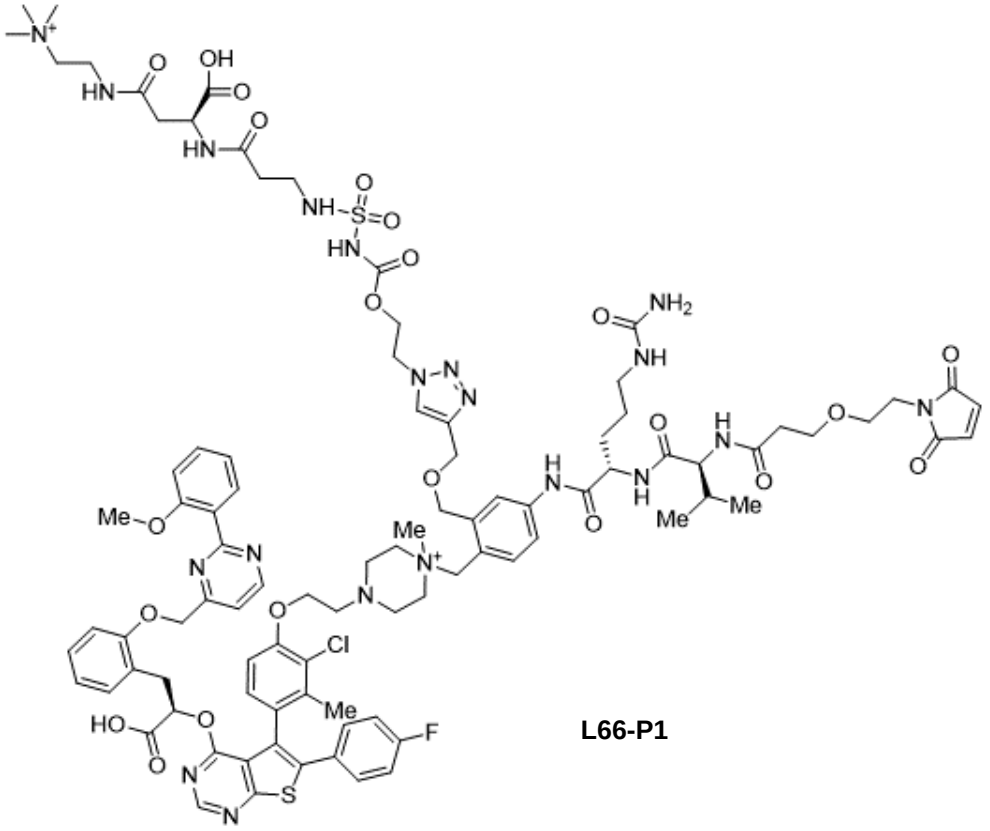
L64-P1

,



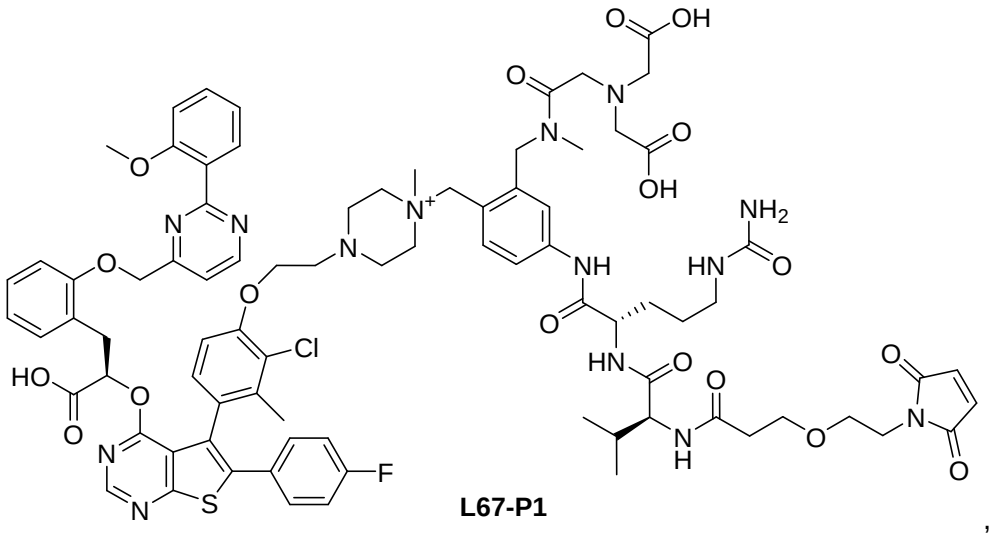
L65-P1

,



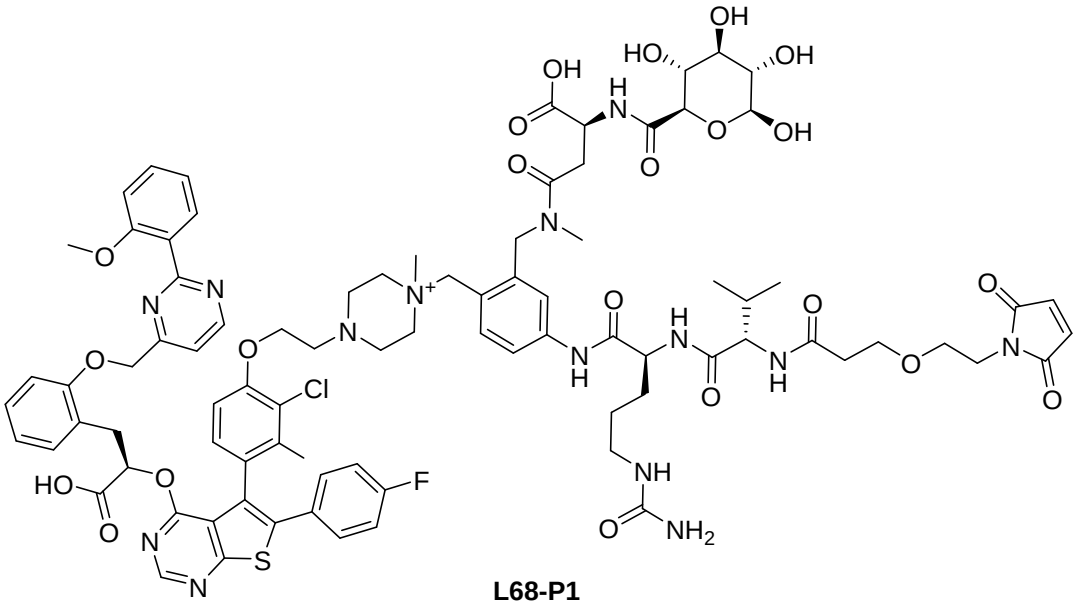
L66-P1

,



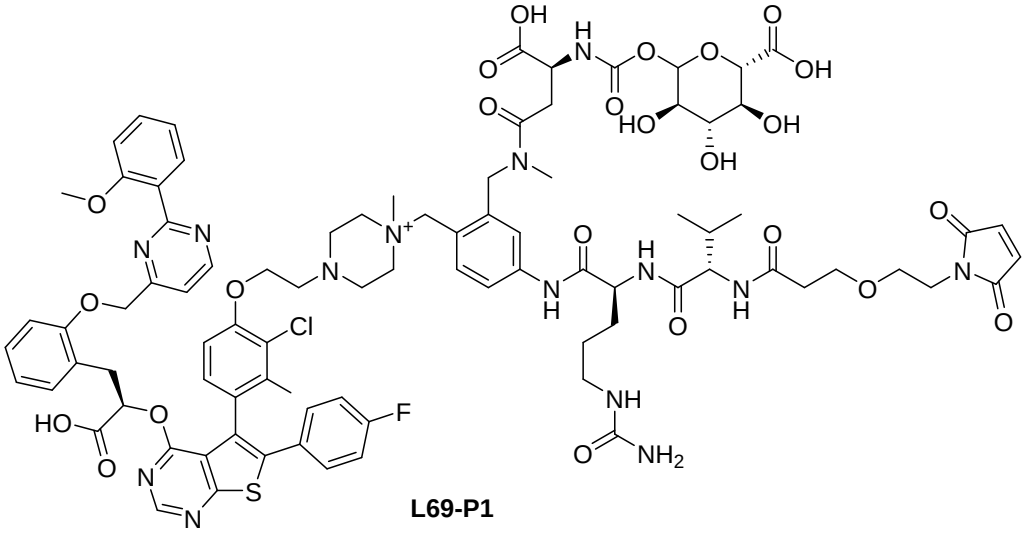
L67-P1

,



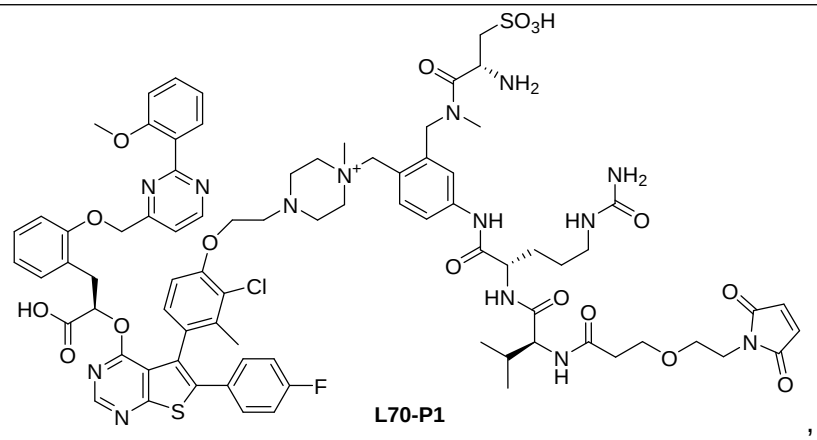
L68-P1

,



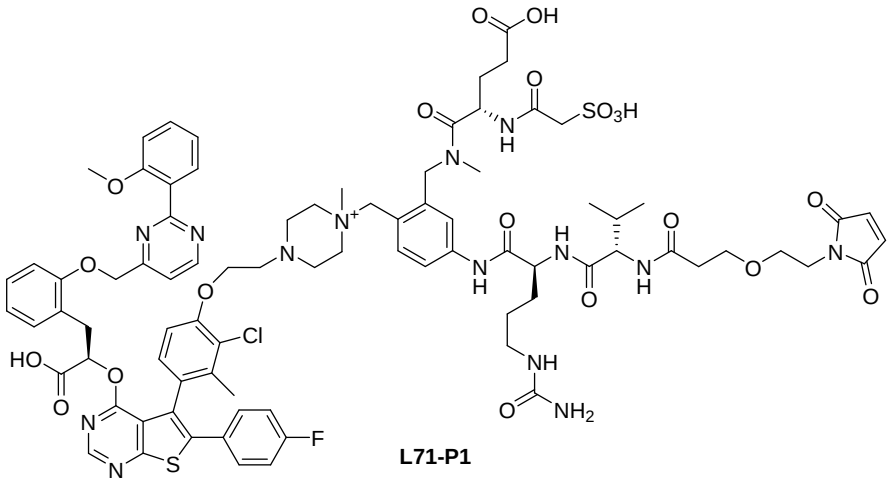
L69-P1

,



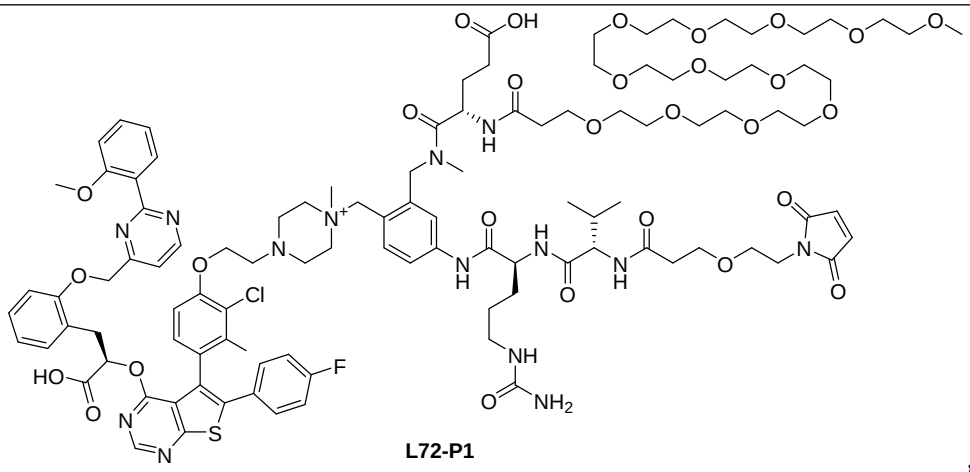
L70-P1

,



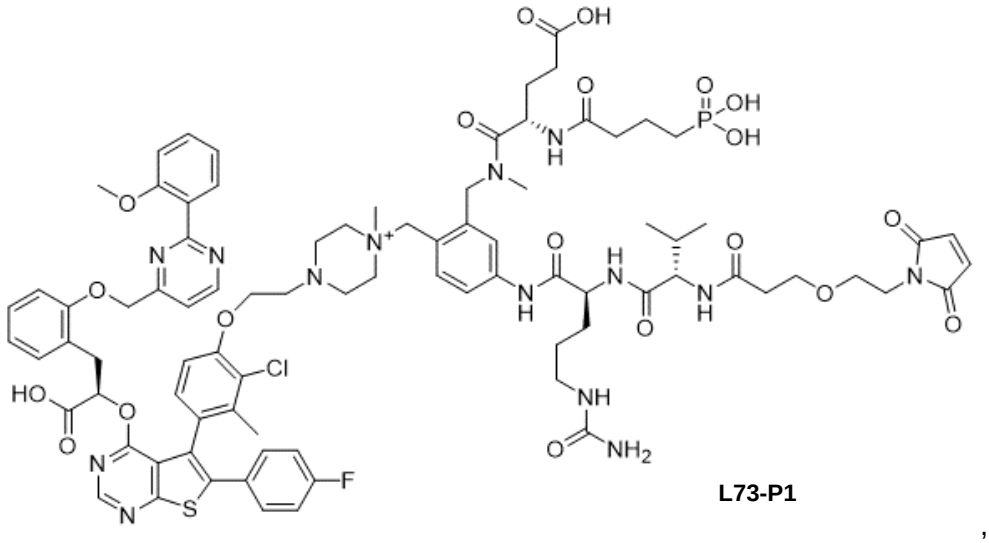
L71-P1

,



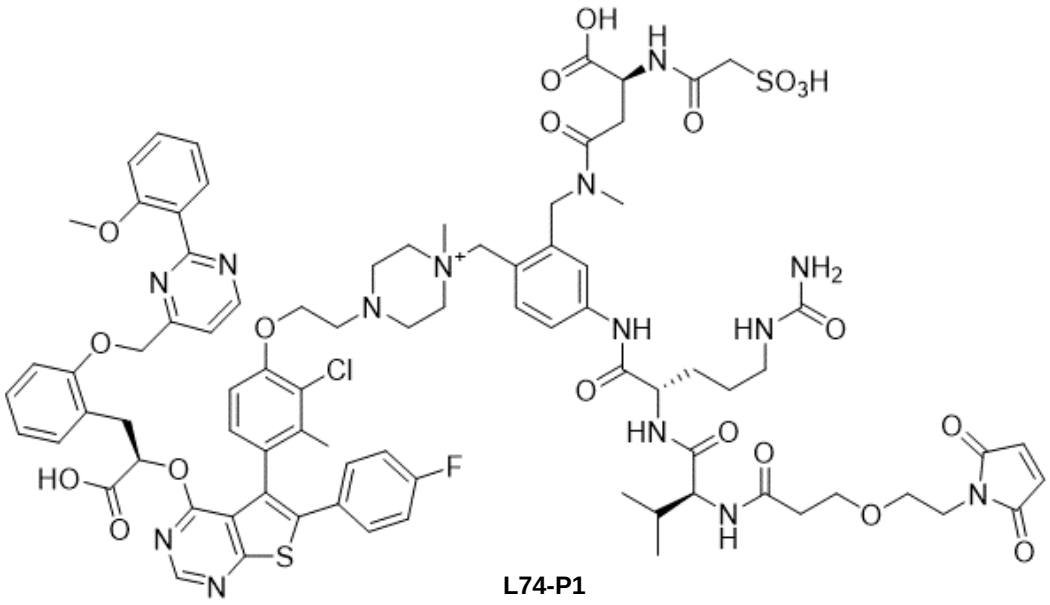
L72-P1

,



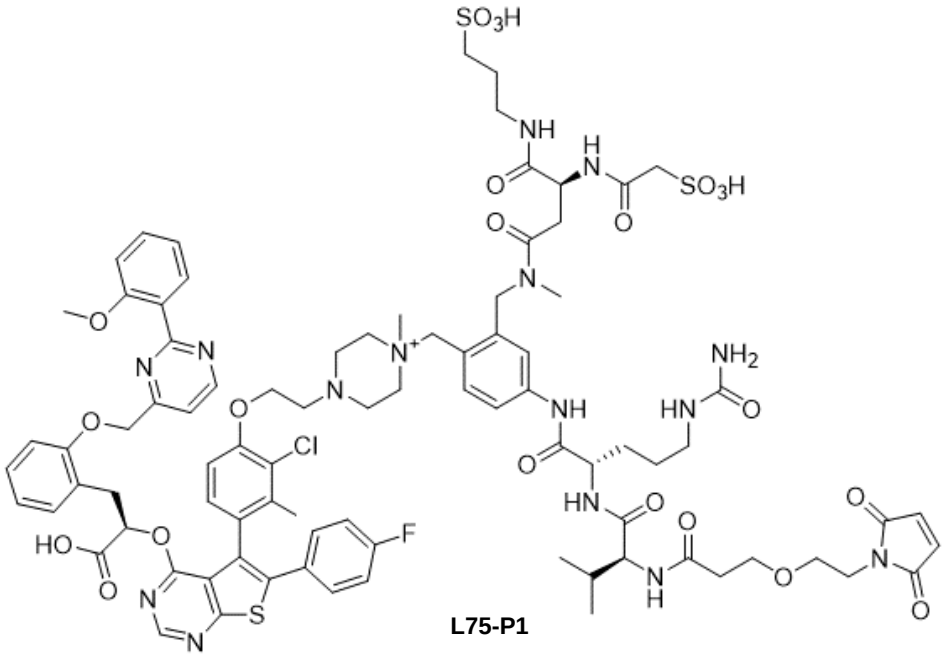
L73-P1

,



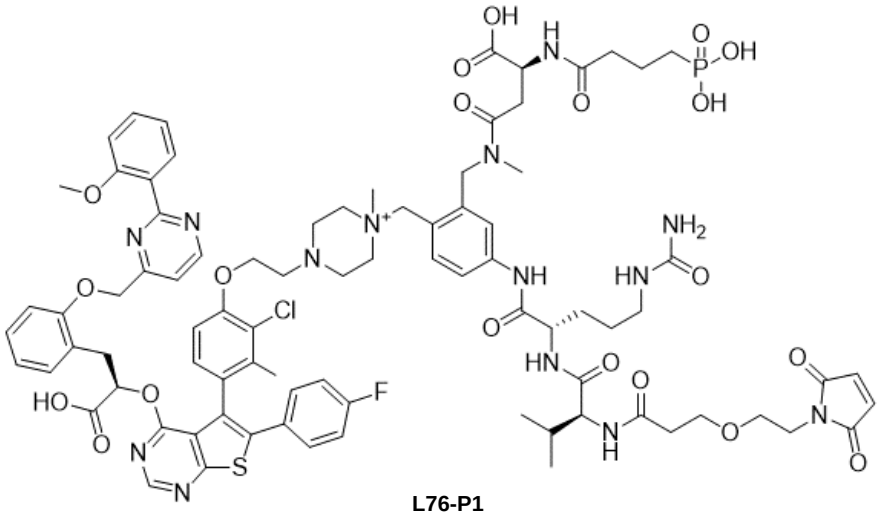
L74-P1

,



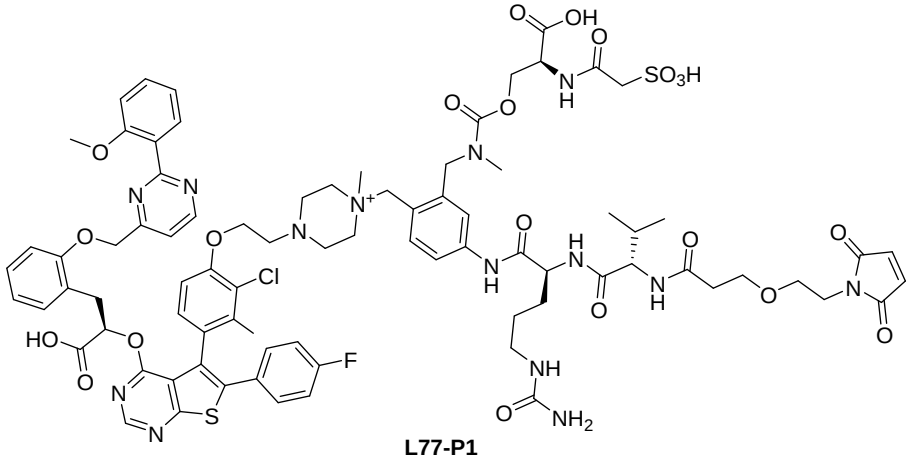
L75-P1

,



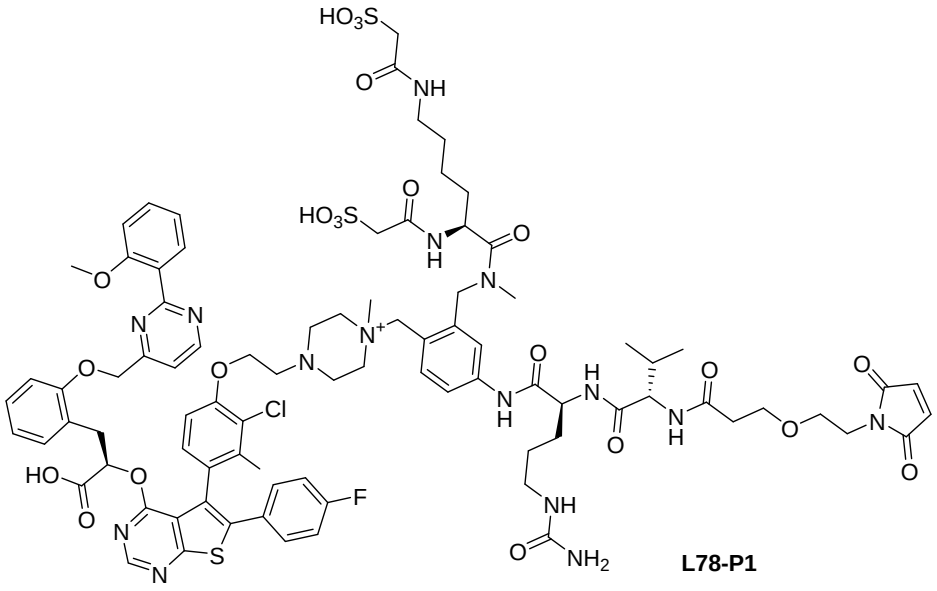
L76-P1

,



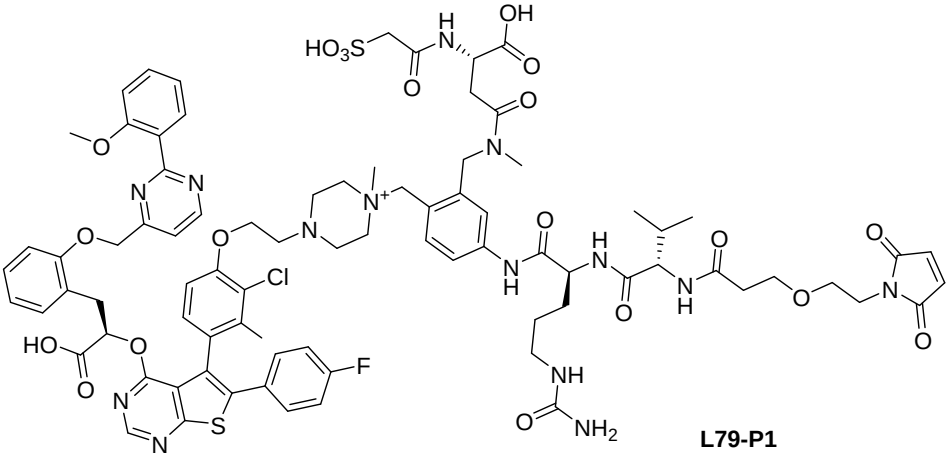
L77-P1

,



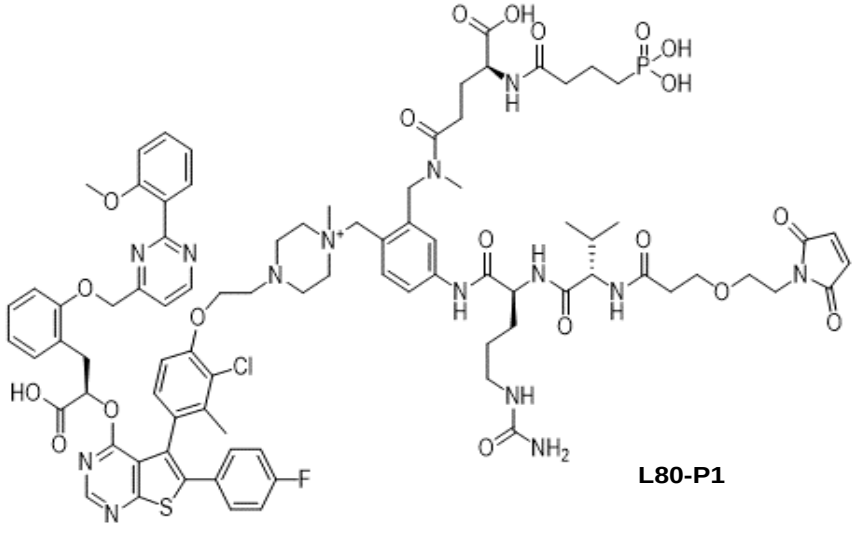
L78-P1

,



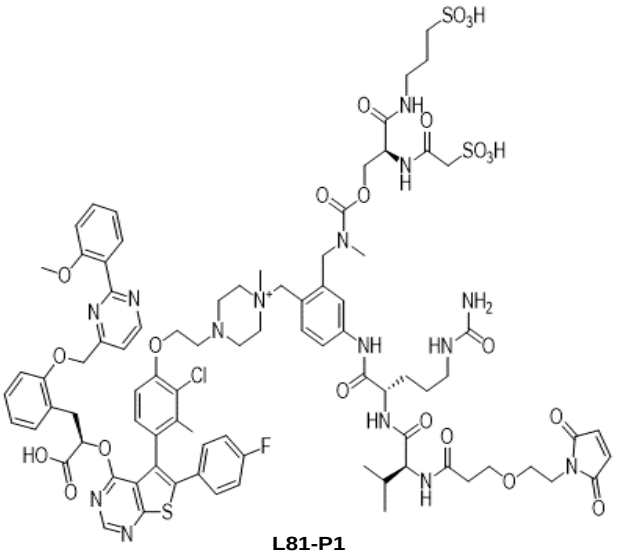
L79-P1

,

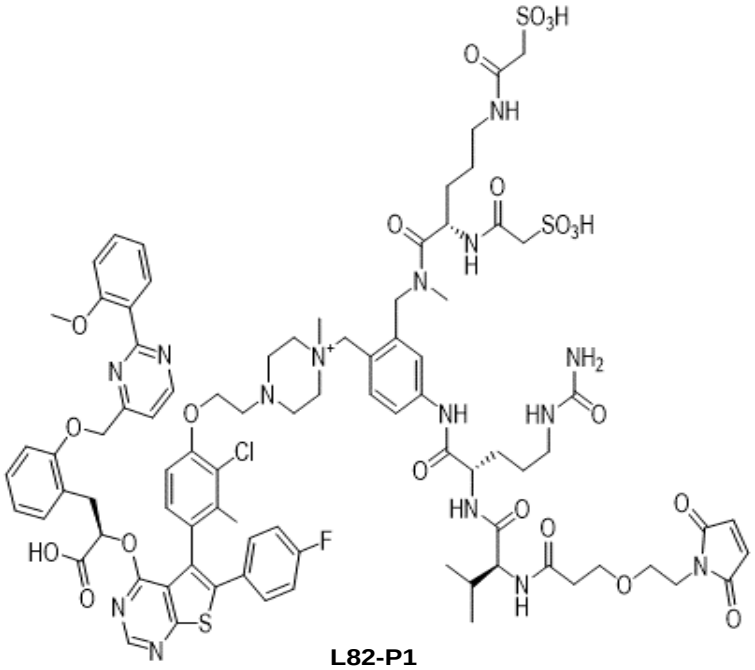


L80-P1

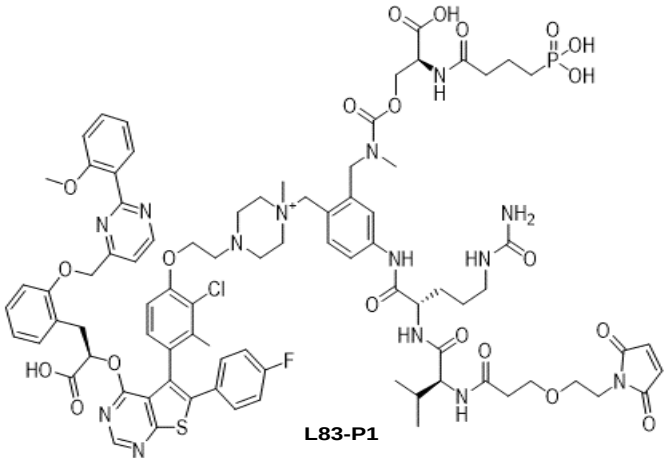
,



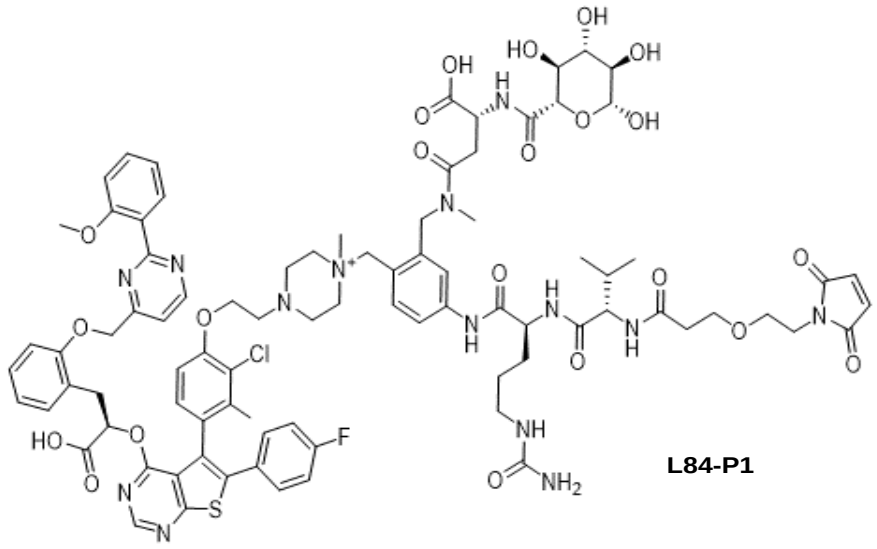
L81-P1 ,



L82-P1 ,

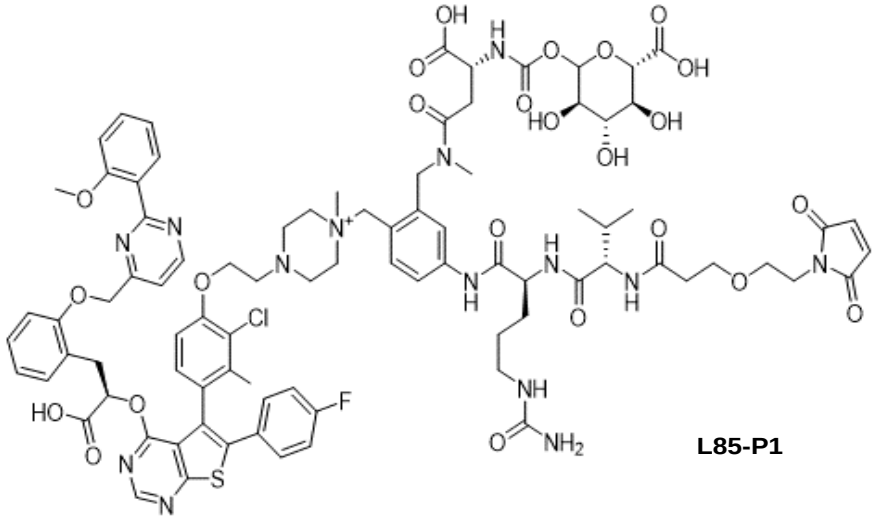


L83-P1 ,



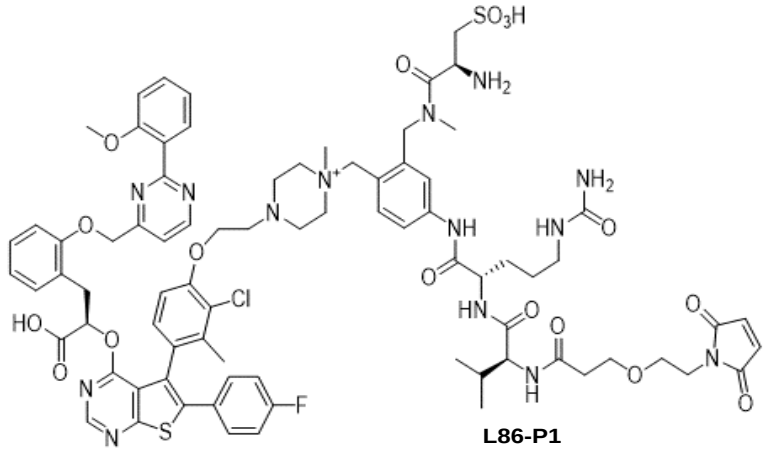
L84-P1

,



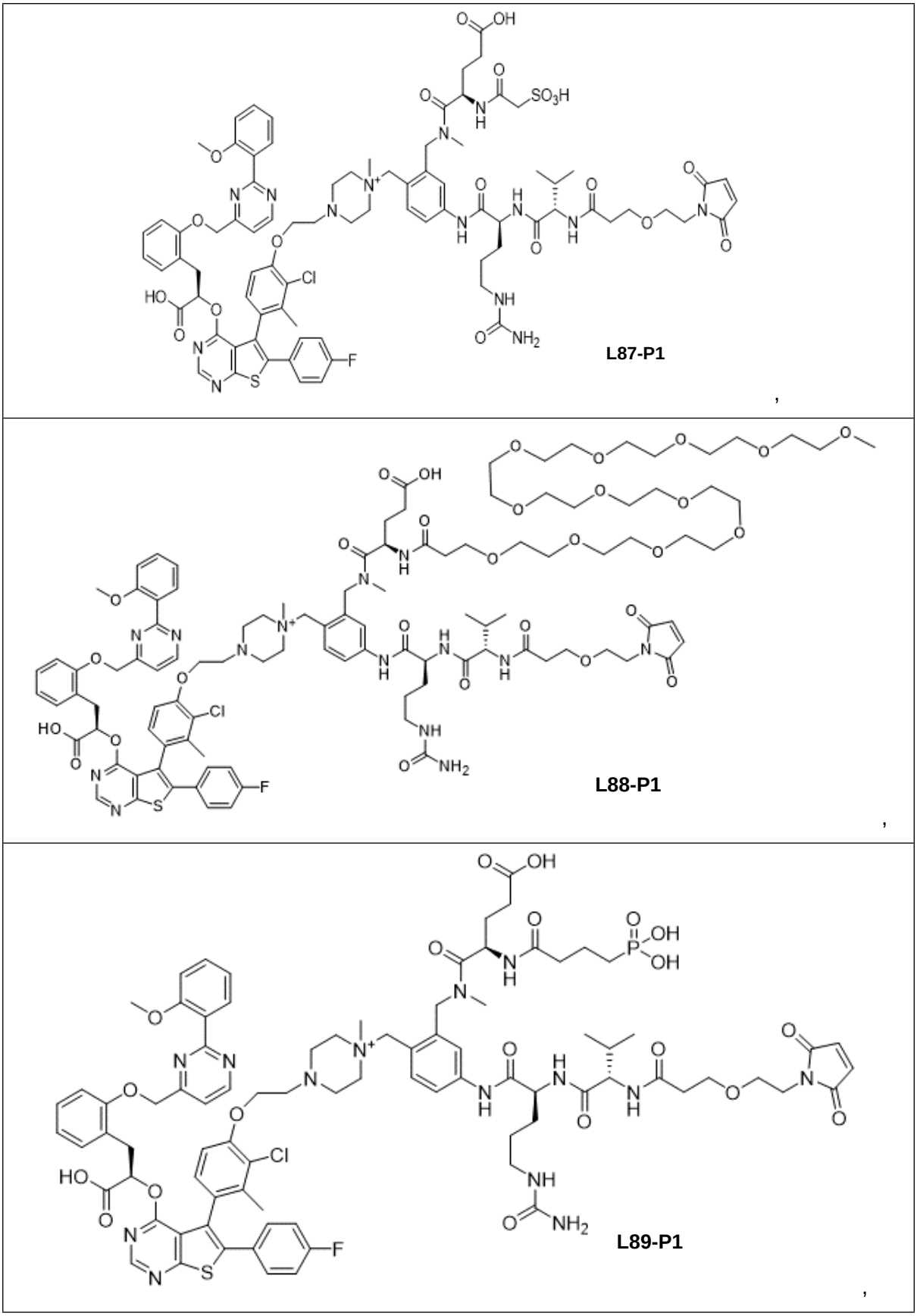
L85-P1

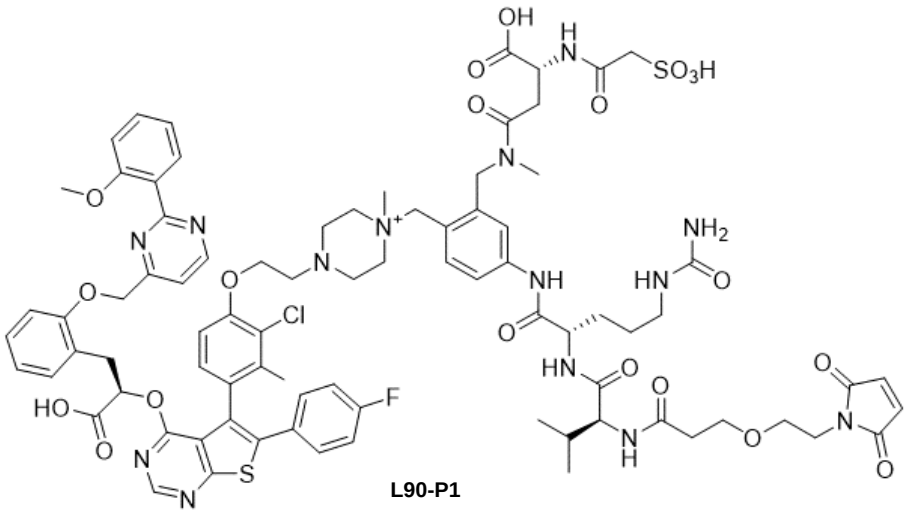
,



L86-P1

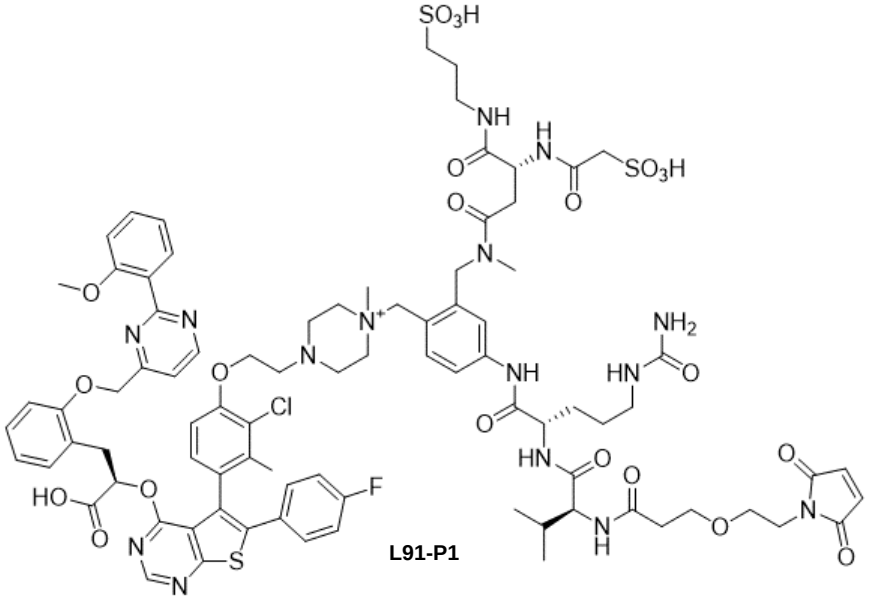
,


L87-P1
L88-P1
L89-P1



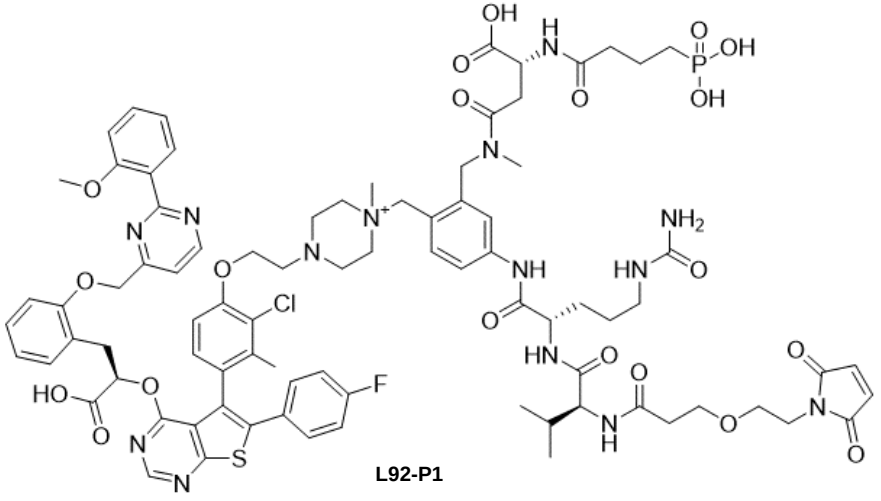
L90-P1

,



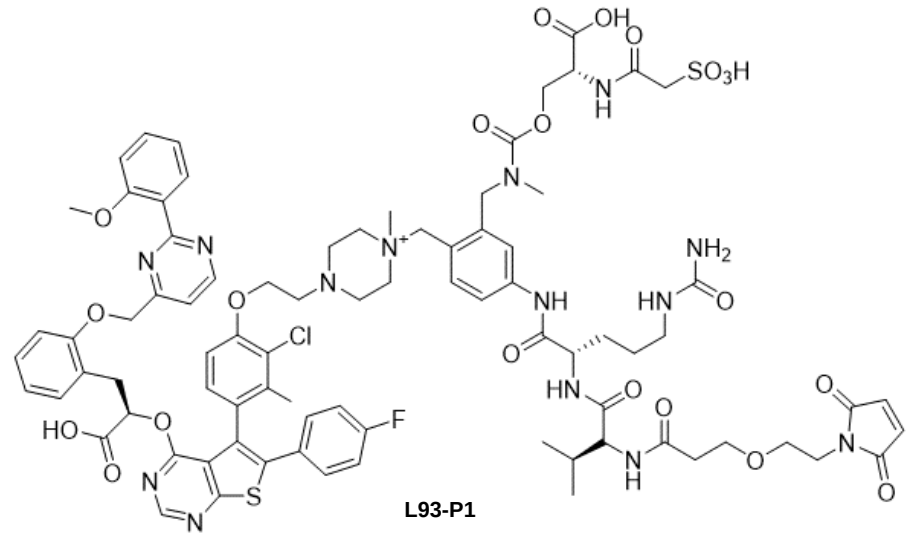
L91-P1

,



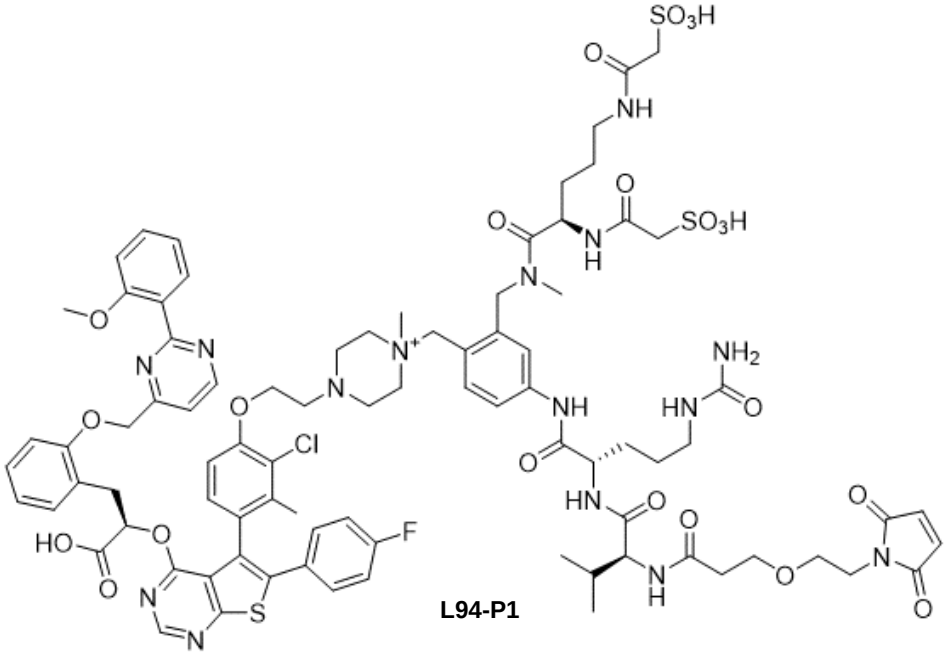
L92-P1

,



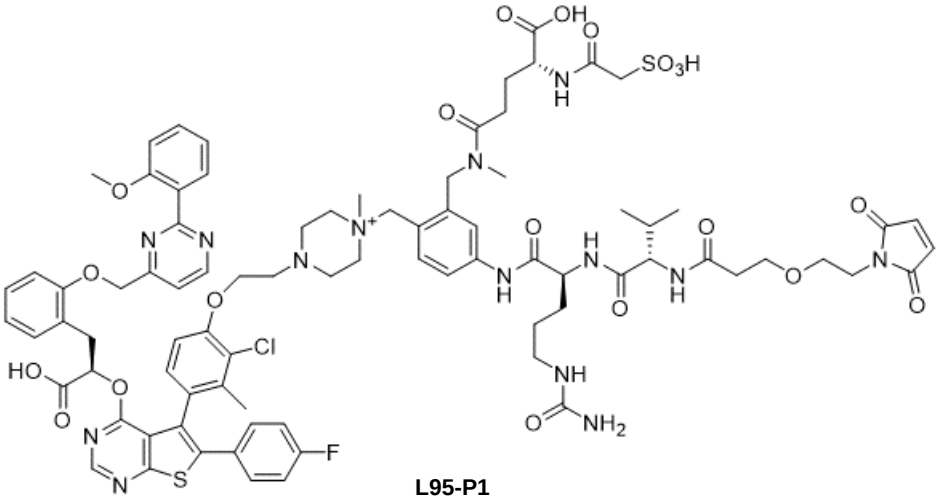
L93-P1

,



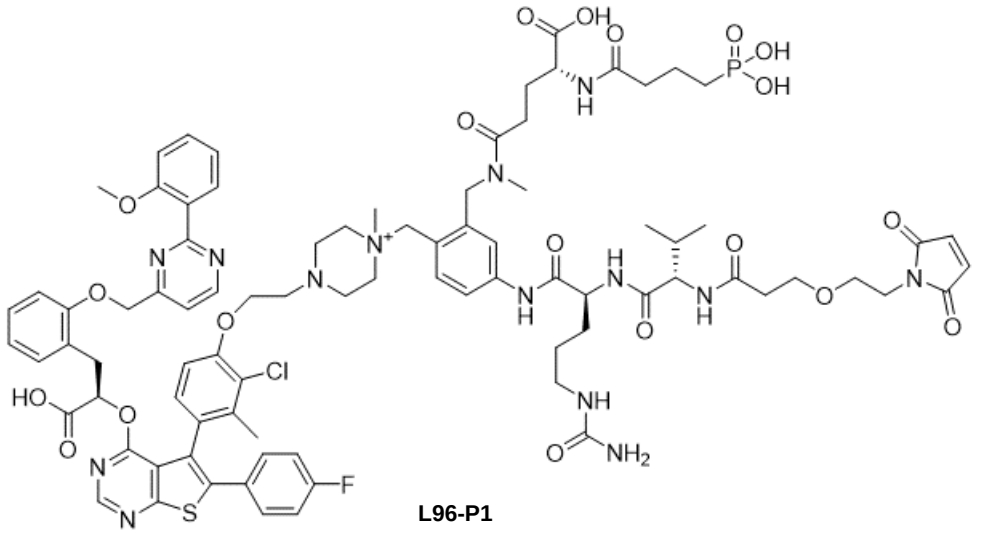
L94-P1

,



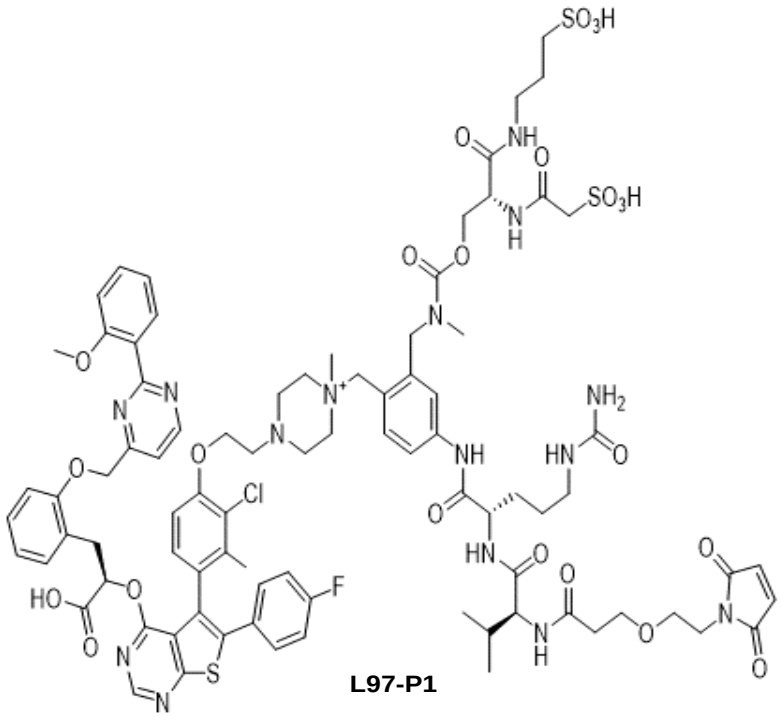
L95-P1

,



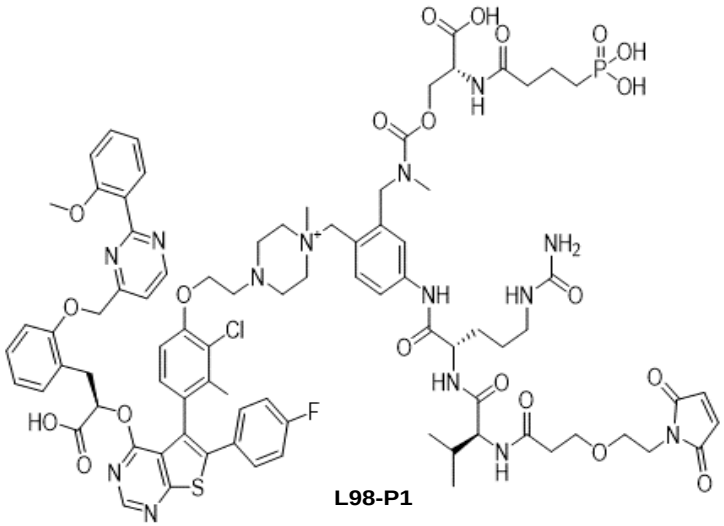
L96-P1

,



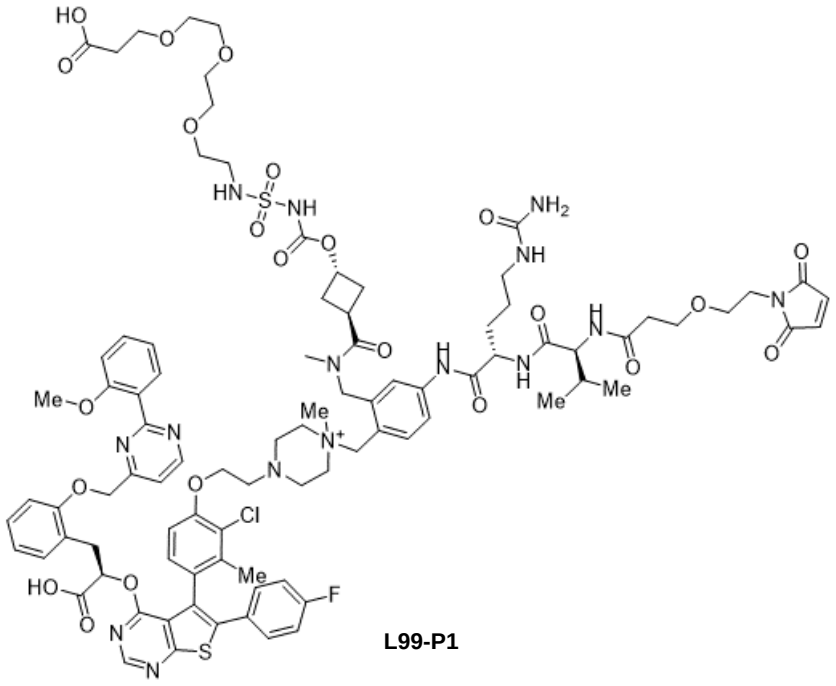
L97-P1

,



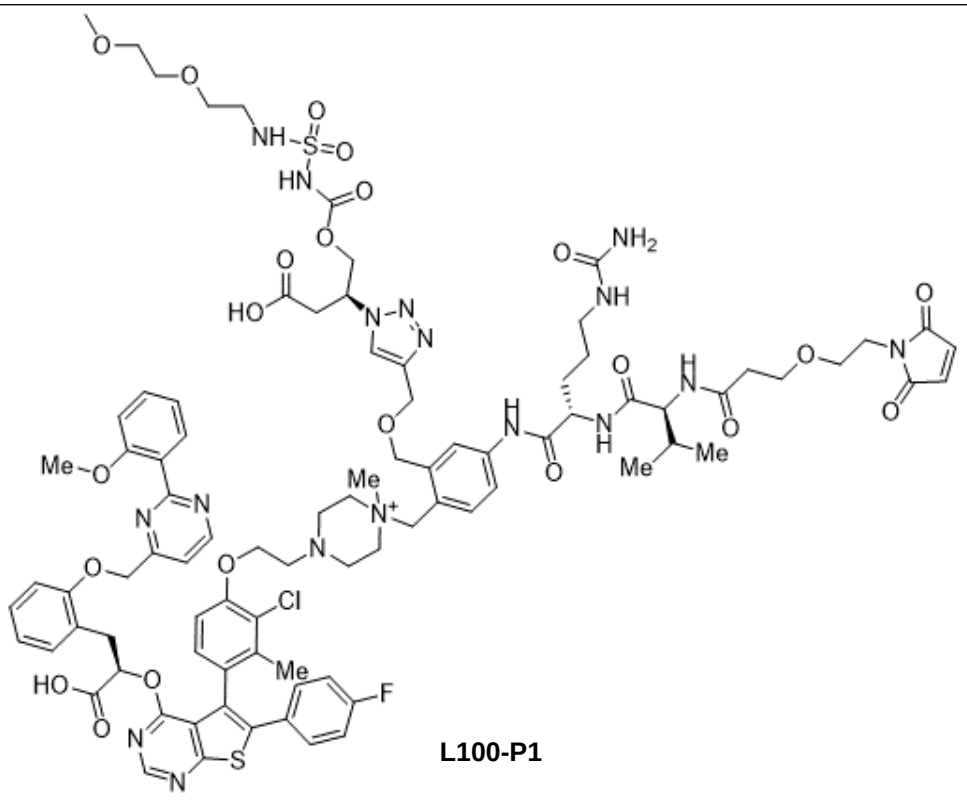
L98-P1

,



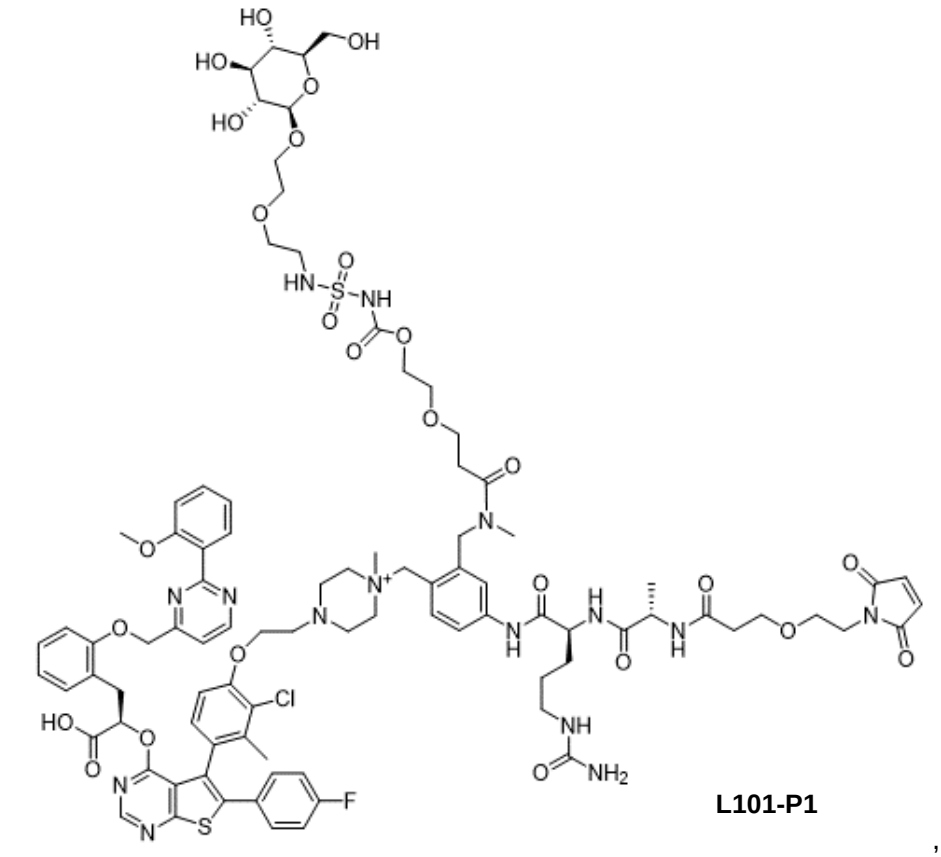
L99-P1

,



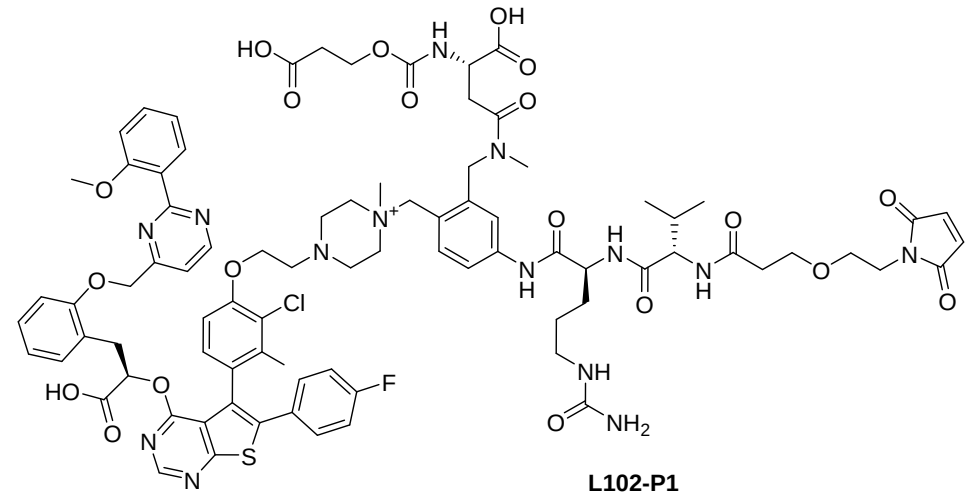
L100-P1

,



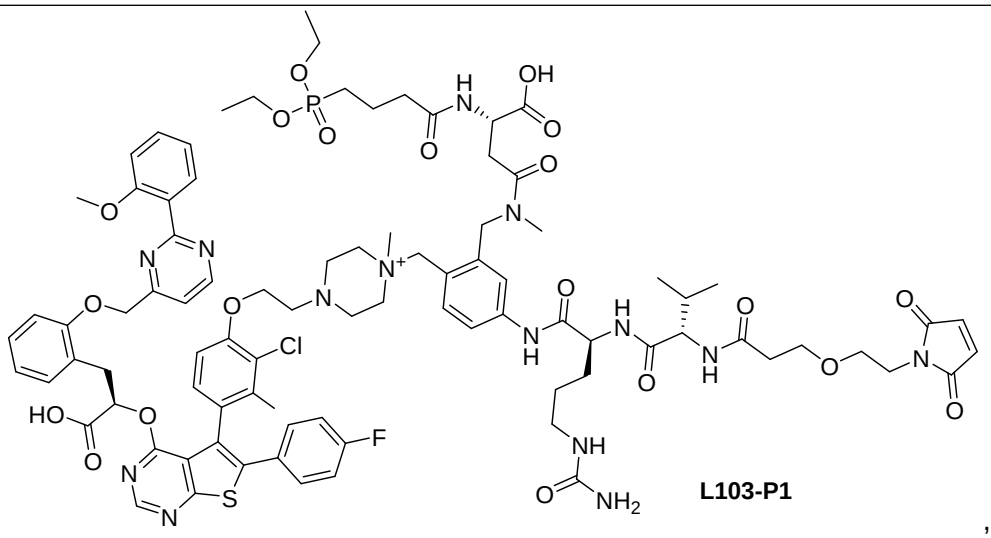
L101-P1

,



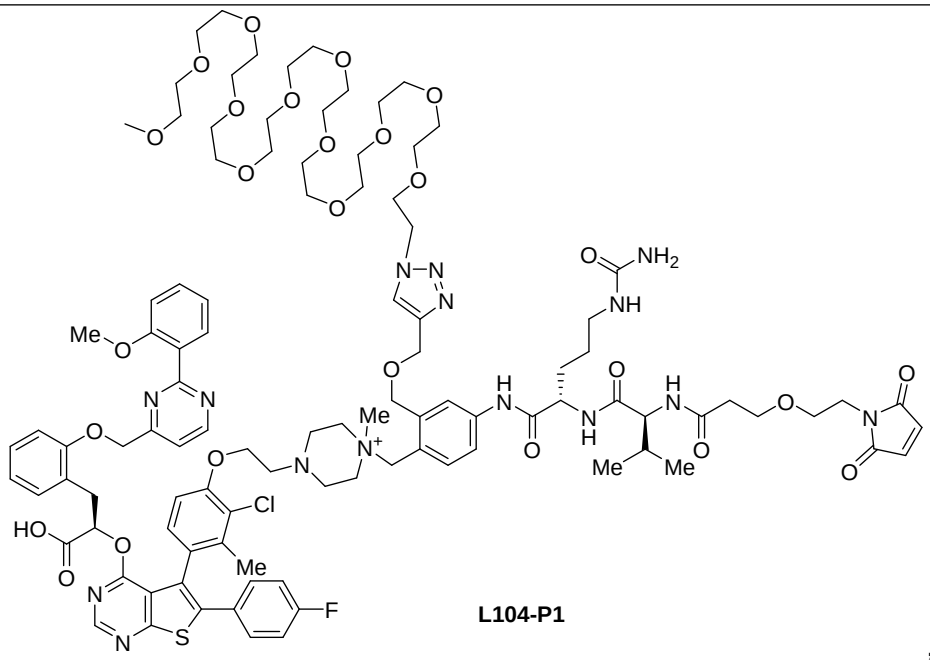
L102-P1

,



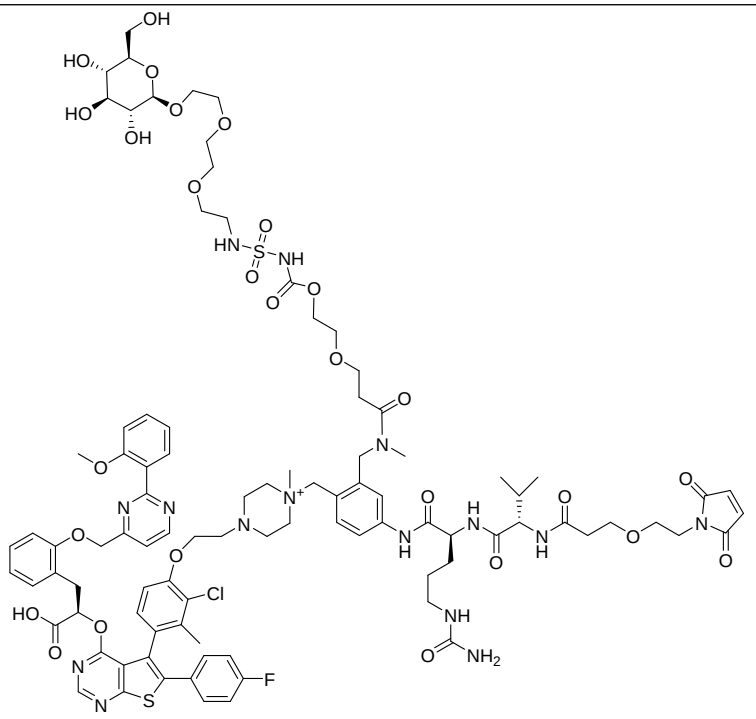
L103-P1

,



L104-P1

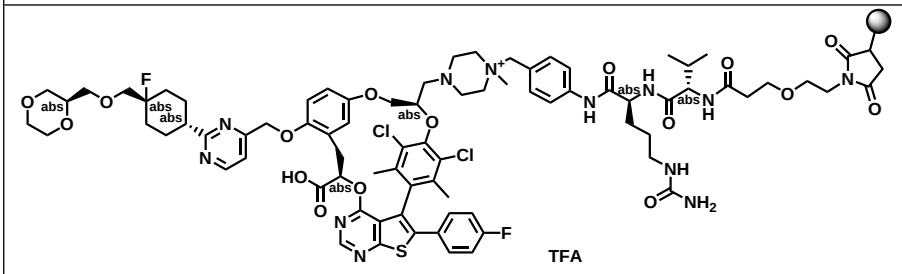
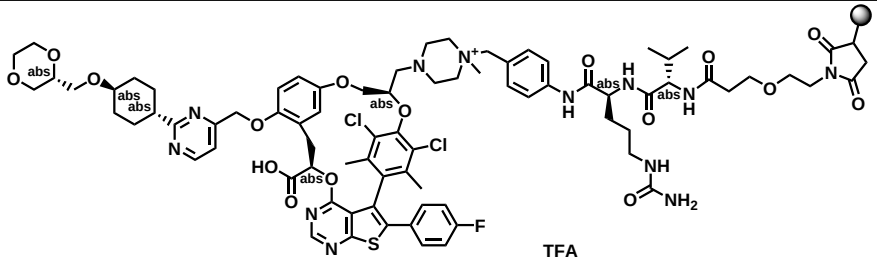
, y

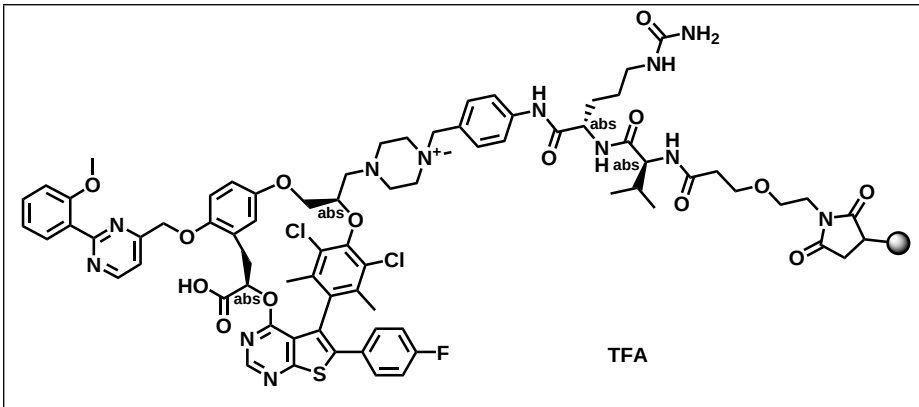
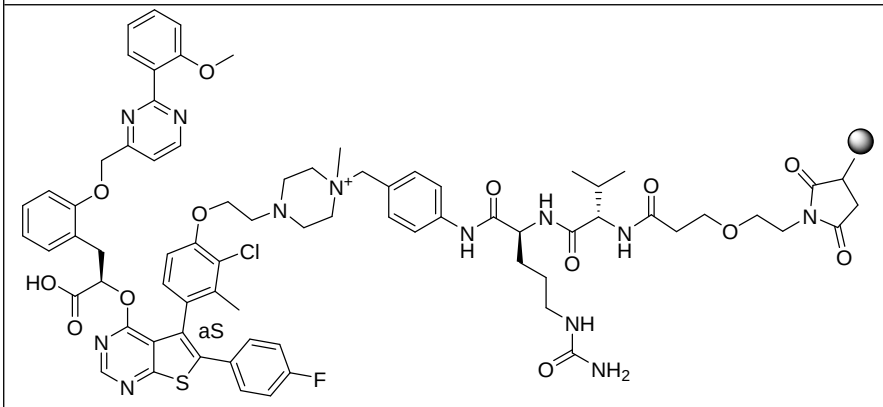
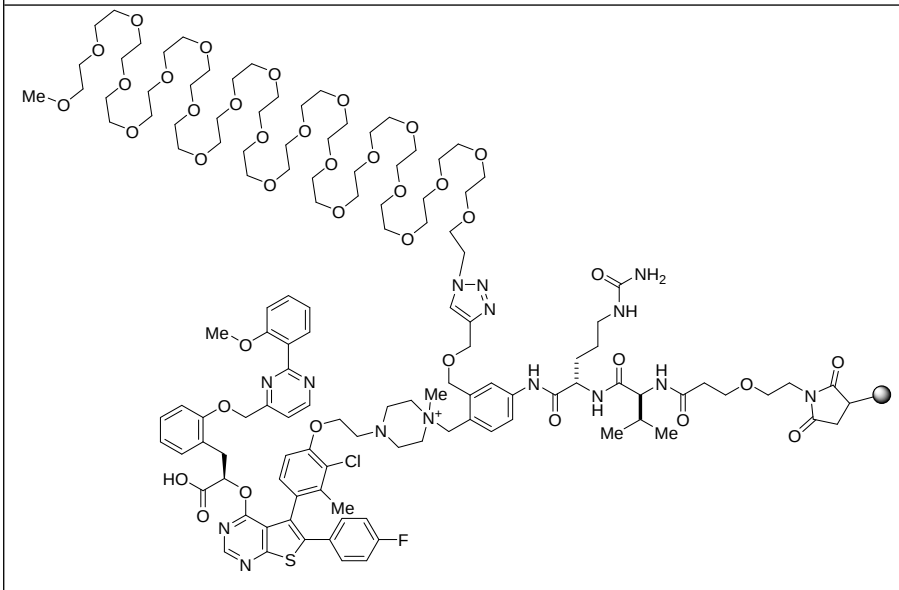


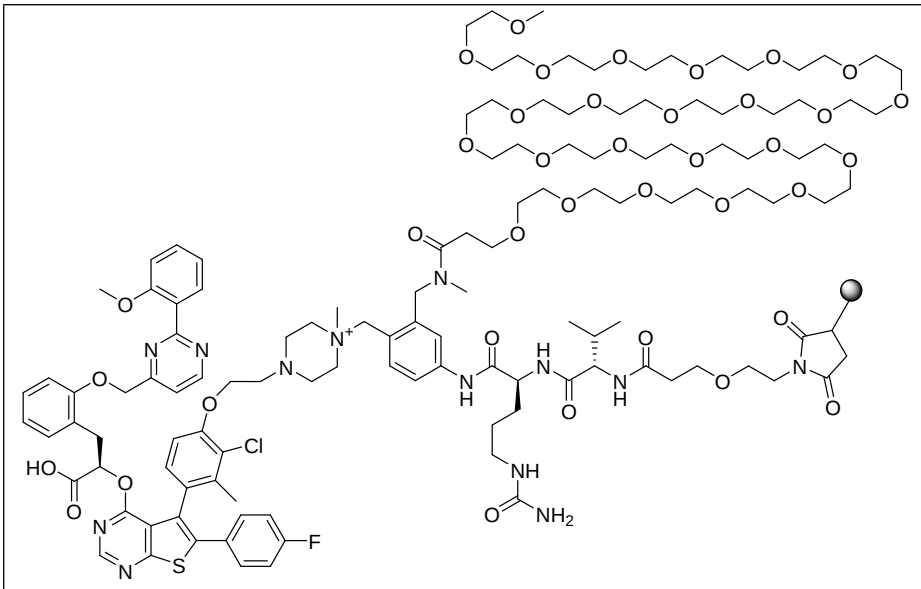
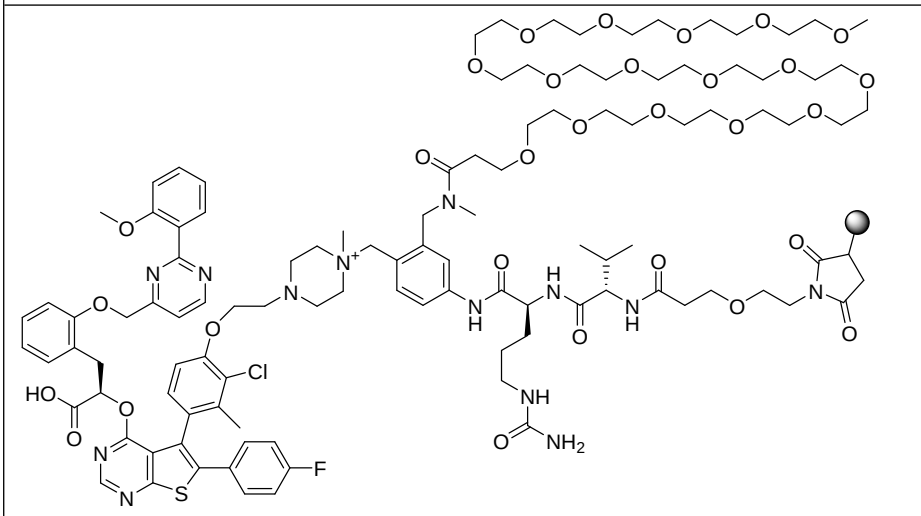
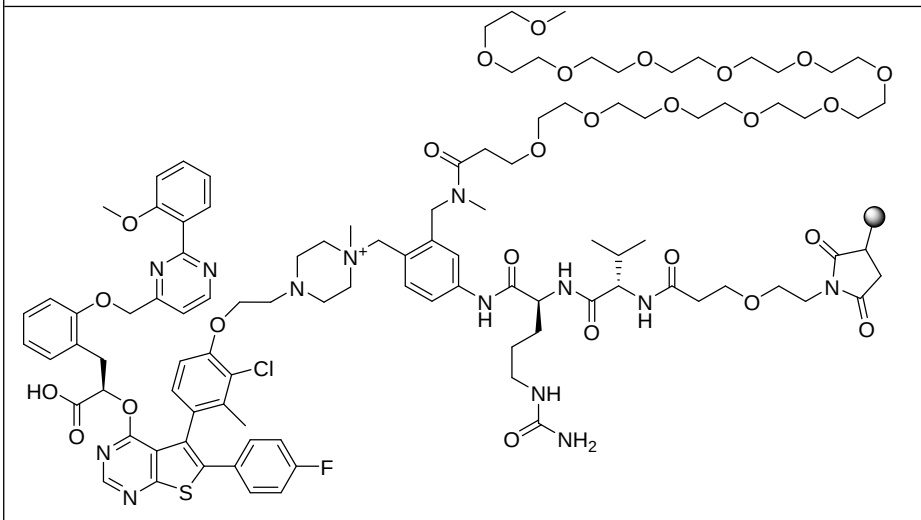
L105-P1

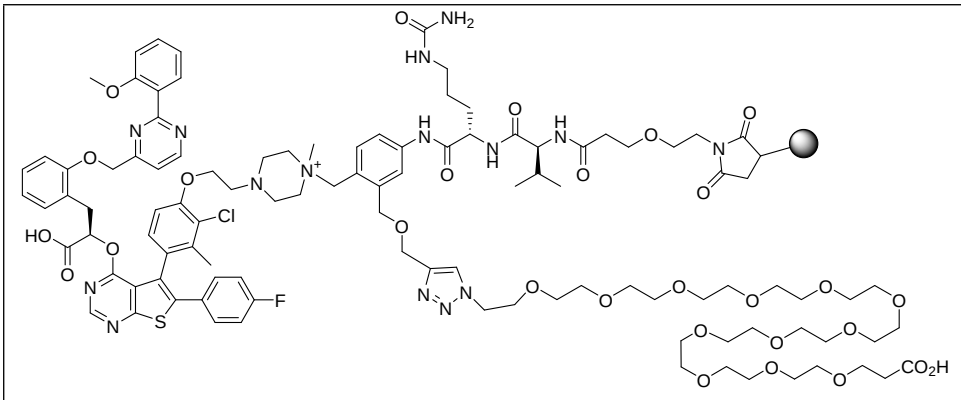
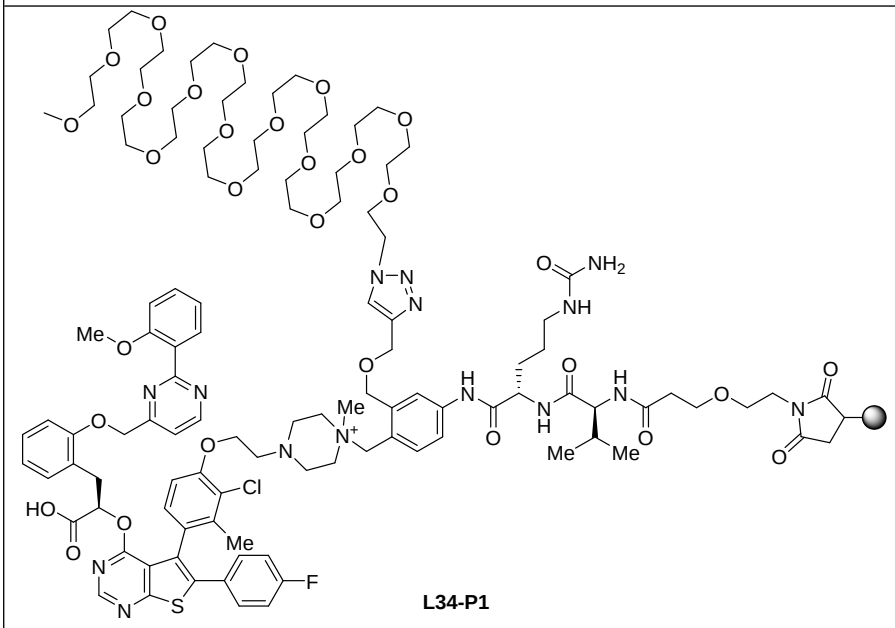
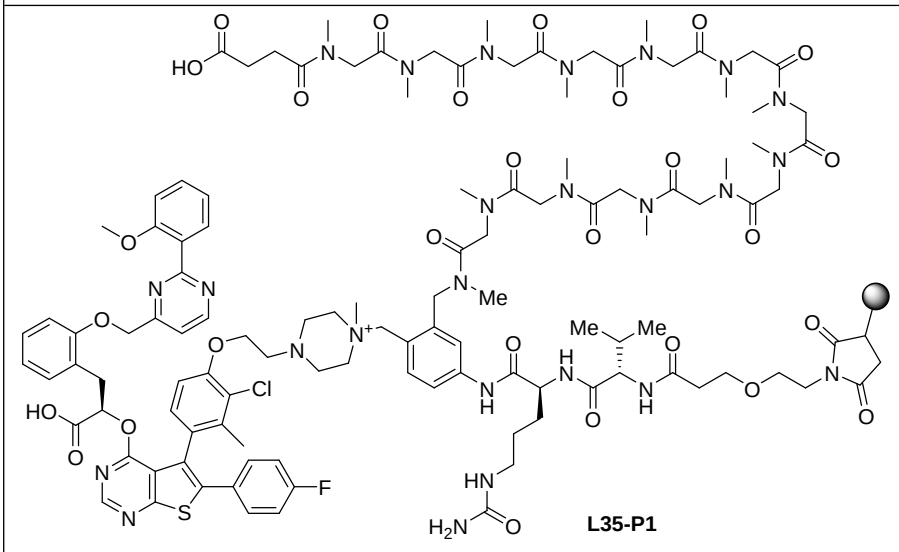
[93] En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco presenta una fórmula de acuerdo con cualquiera de las estructuras que se muestra en la Tabla B.

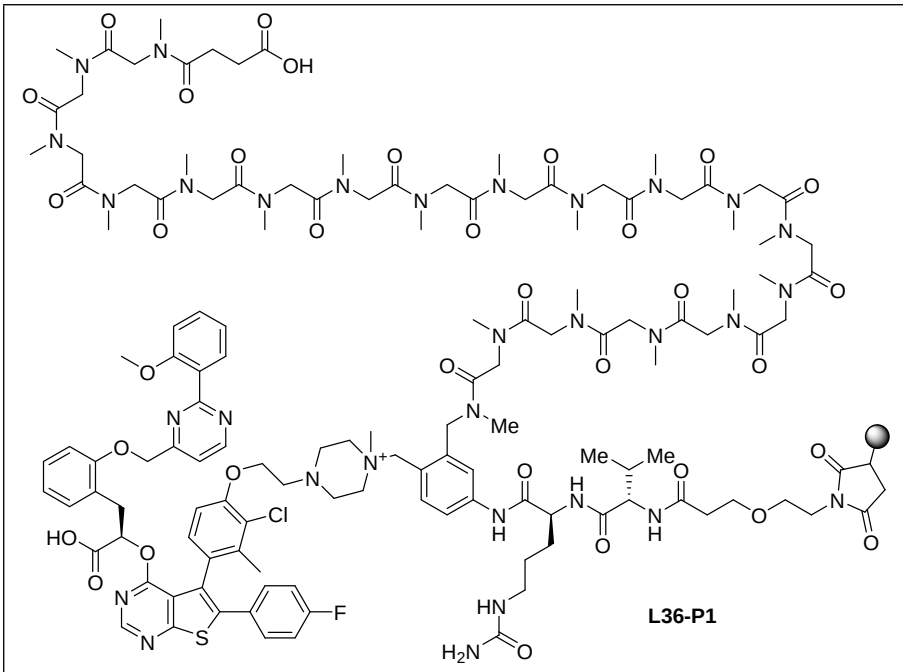
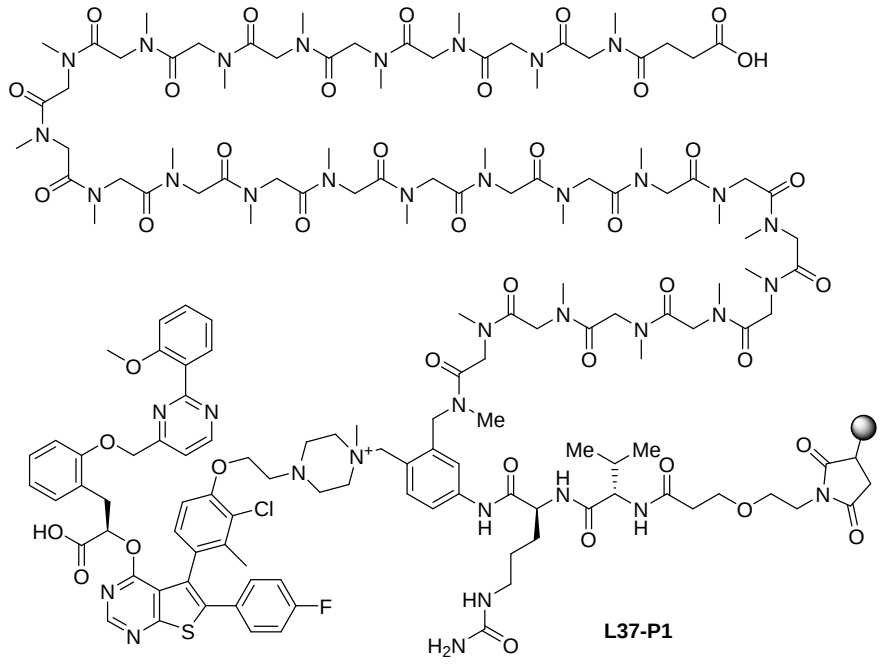
Tabla N: Estructuras de ADC

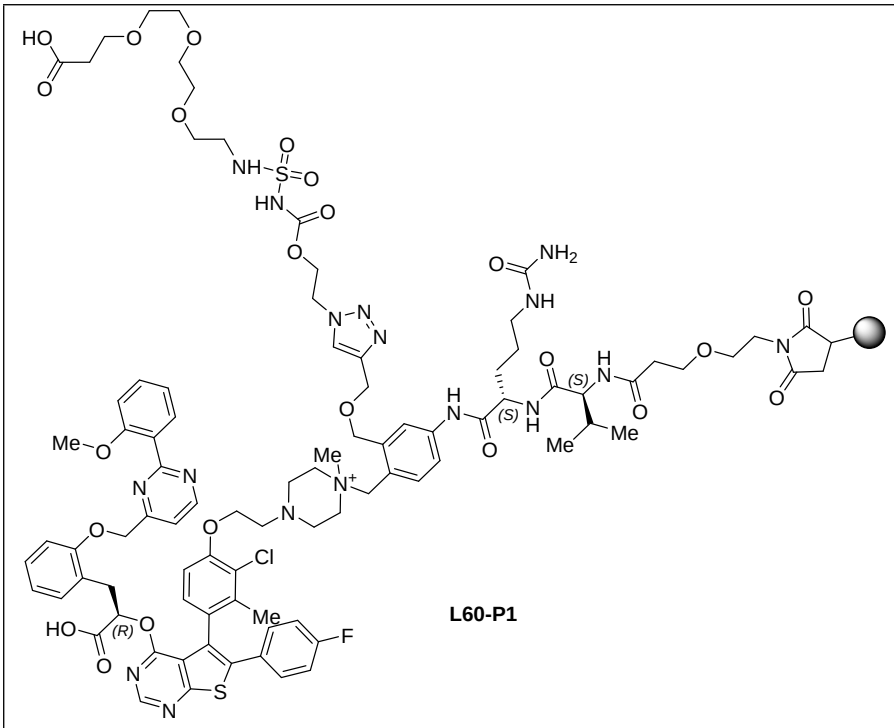
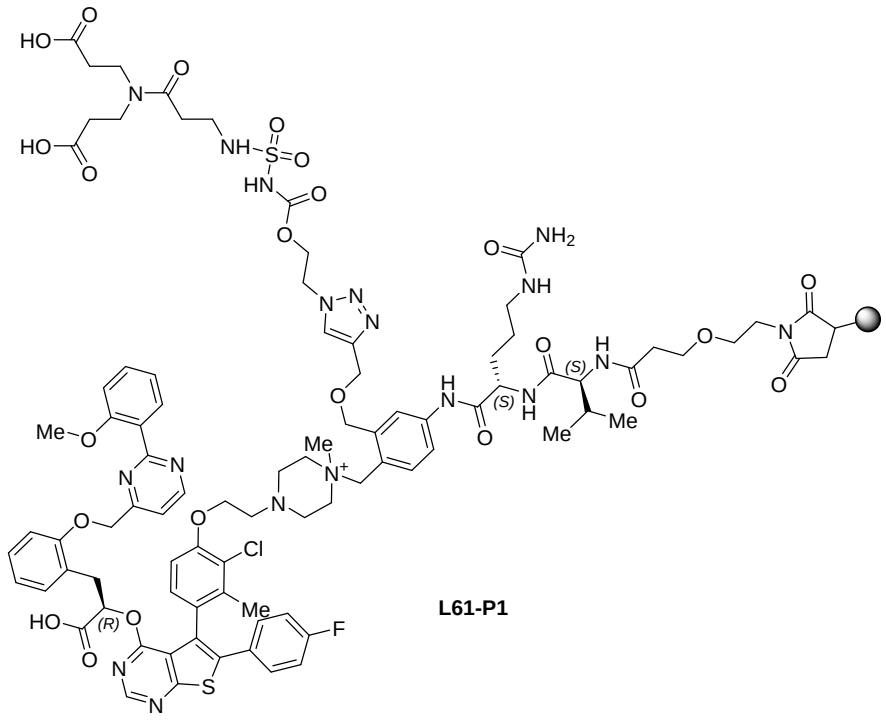
Estructura del ADC	***Nombre de L/P***
 TFA	L9-P16
 TFA	L9-P17

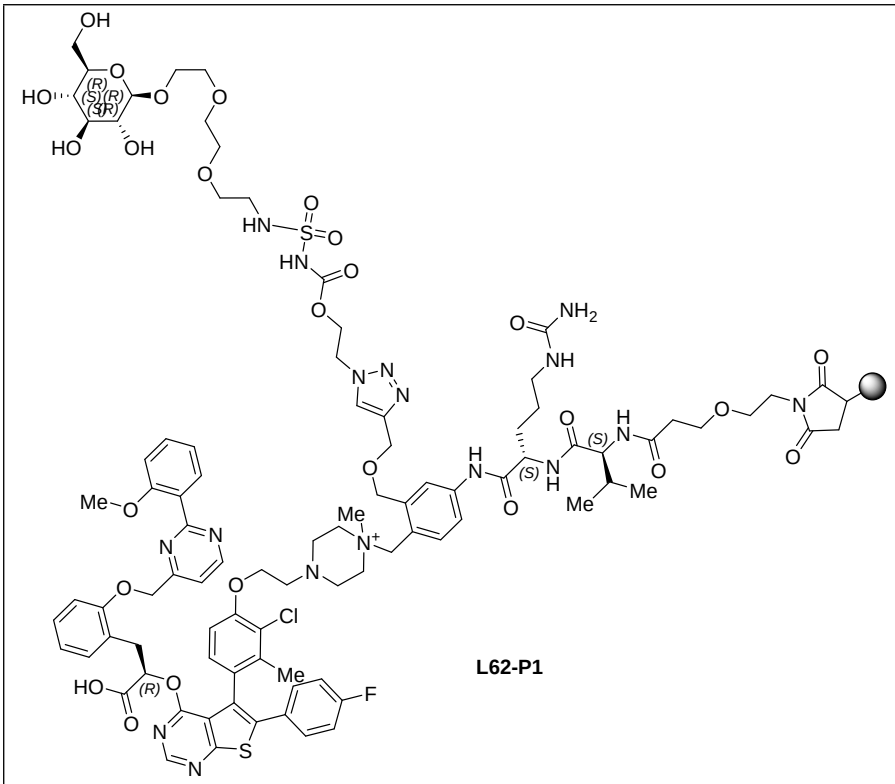
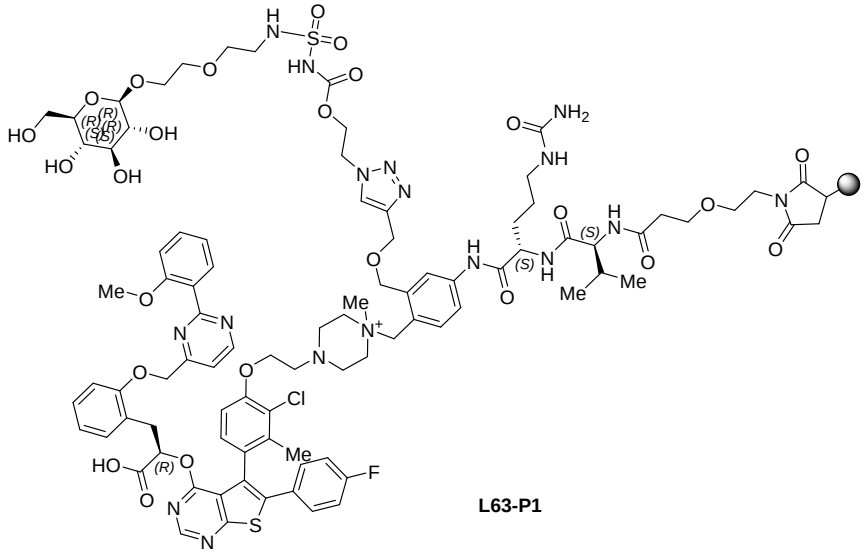
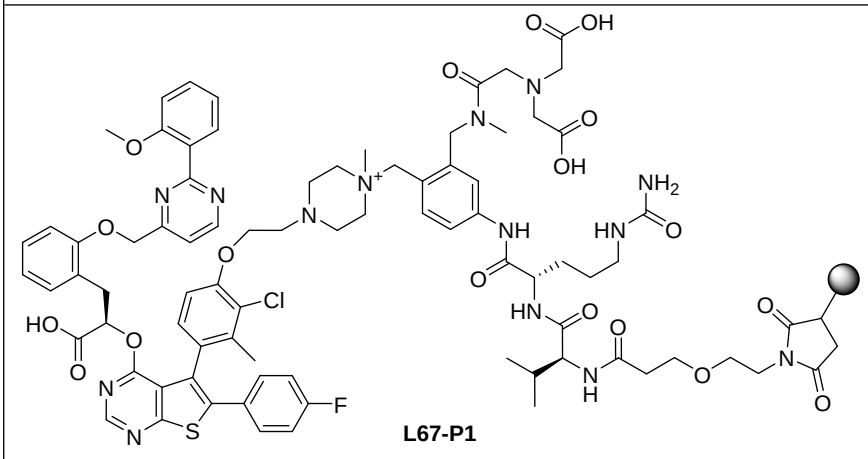
	L9-P15
	L9-C1
	L5-P1

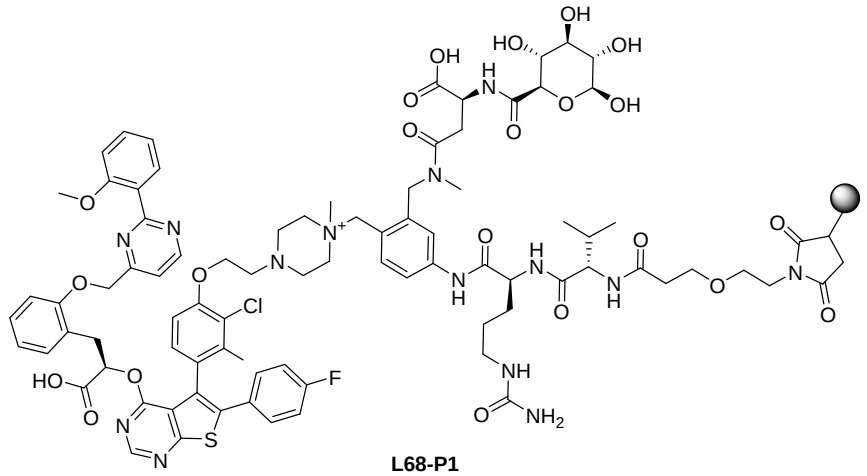
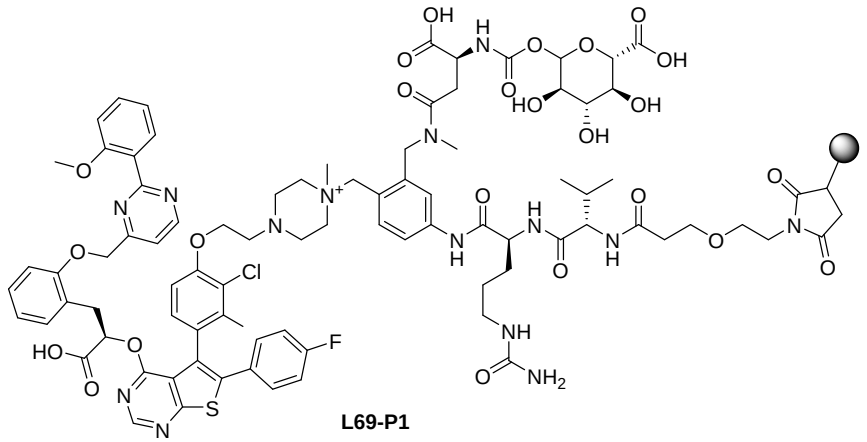
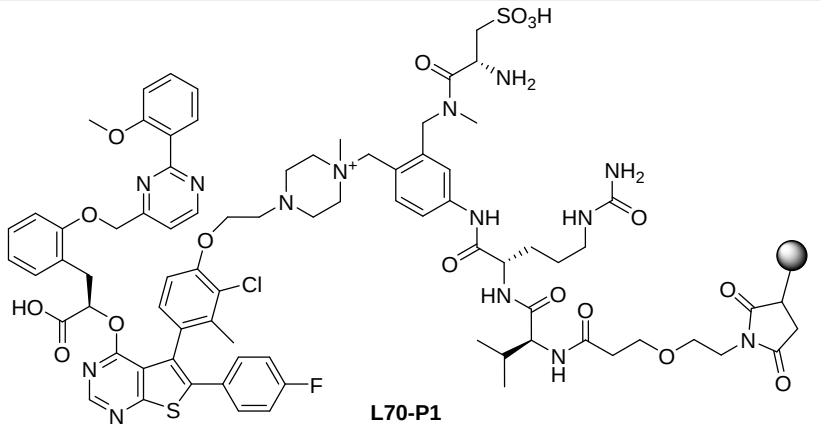
	L30-P1
	L31-P1
	L32-P1

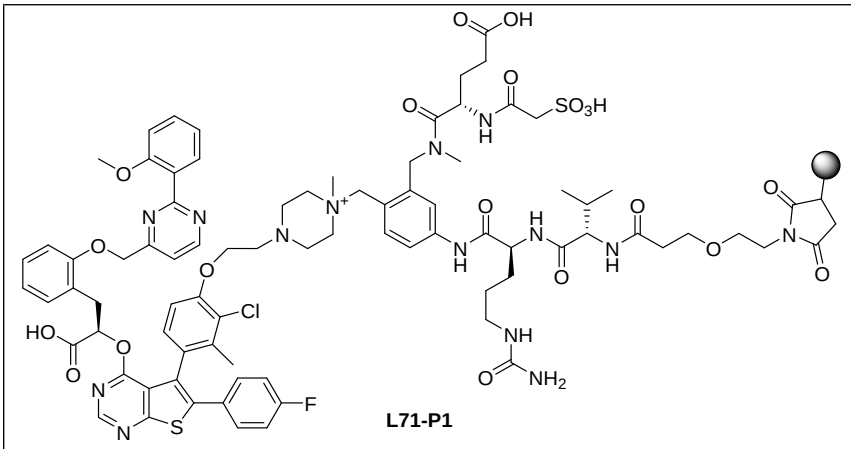
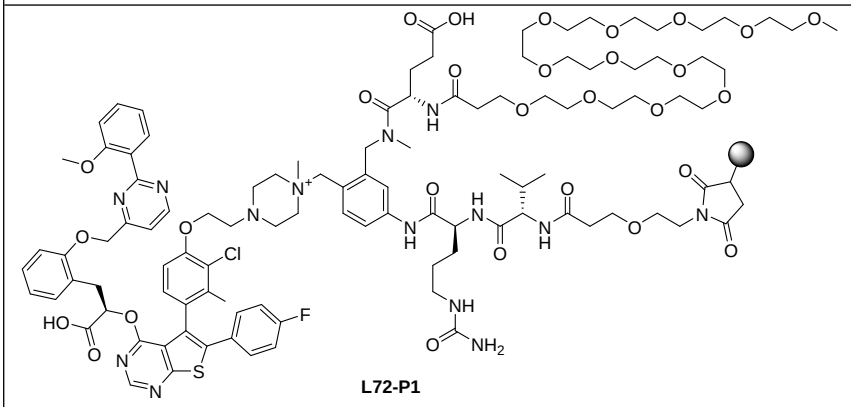
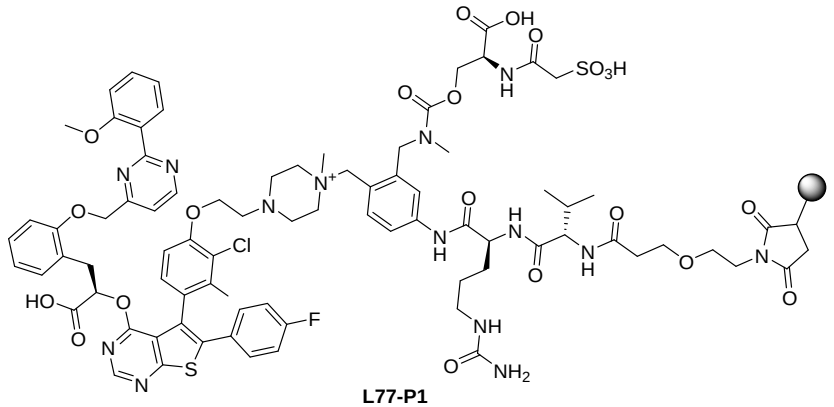
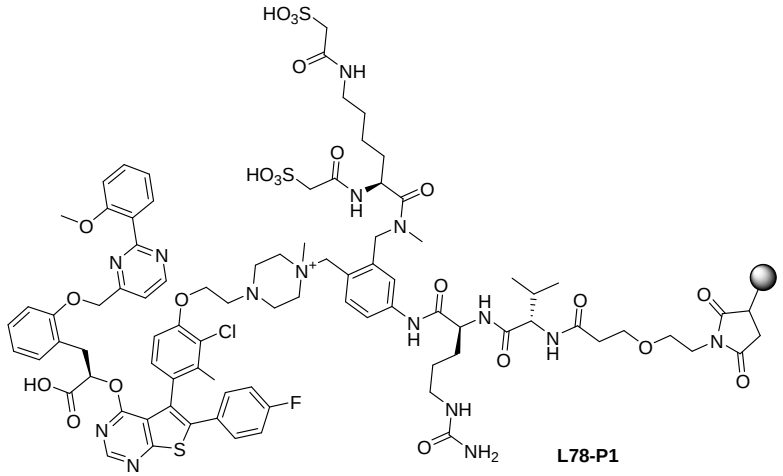
	L33-P1
 **L34-P1**	L34-P1
 **L35-P1**	L35-P1

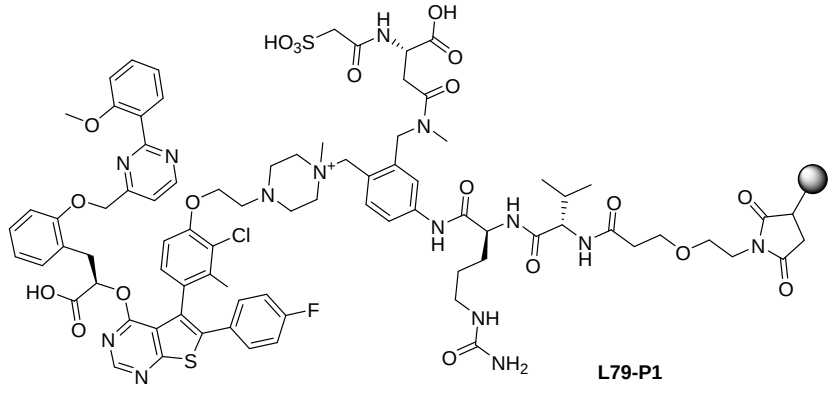
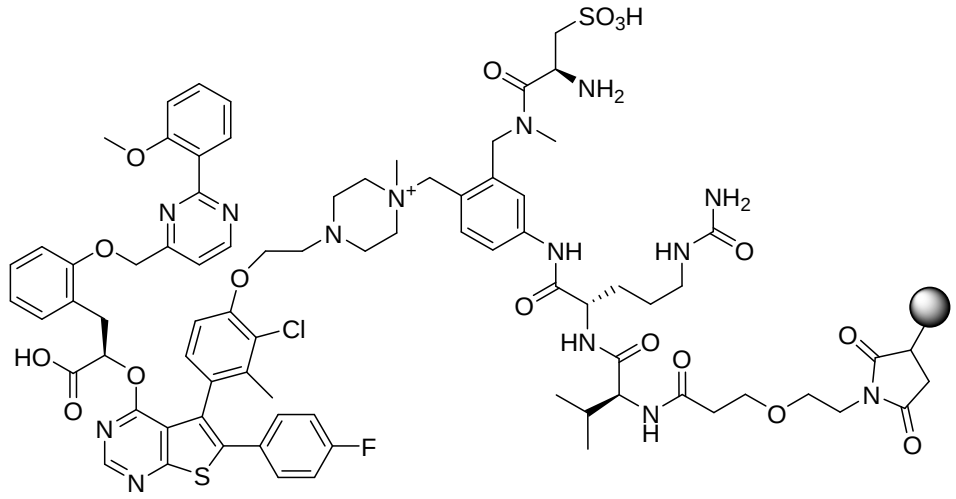
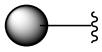
 **L36-P1**	L36-P1
 **L37-P1**	L37-P1

 **L60-P1**	L60-P1
 **L61-P1**	L61-P1

 **L62-P1**	L62-P1
 **L63-P1**	L63-P1
 **L67-P1**	L67-P1

 **L68-P1**	L68-P1
 **L69-P1**	L69-P1
 **L70-P1**	L70-P1

 **L71-P1**	L71-P1
 **L72-P1**	L72-P1
 **L77-P1**	L77-P1
 **L78-P1**	L78-P1

 **L79-P1**	L79-P1
	L86-P1
= anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo Los ADC representados anteriormente también se pueden representar mediante la siguiente fórmula: $Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$, en donde  es un anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión a antígeno del mismo unido covalentemente a la carga útil de enlace (L/P) representada anteriormente; *p* es un número entero entre 1 y 16. En algunas formas de realización, *p* es un número entero entre 1 y 8. En algunas formas de realización, *p* es un número entero entre 1 y 5. En algunas formas de realización, *p* es un número entero entre 2 y 4. En algunas formas de realización, *p* es 2. En algunas formas de realización, *p* es 4. En algunas formas de realización, *p* se determina por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).	

[94] Según se usa en la presente, "L/P" se refiere a los conectores-cargas útiles, conectores-fármacos o conectores-compuestos divulgados en la presente y los términos "L-P#" y "L-C#" se usan indistintamente para hacer referencia a un conector-fármaco específico

divulgado en la presente, en tanto los códigos “P#” y “C#” se usan indistintamente para hacer referencia a un compuesto específico a menos que se especifique de otra manera. Por ejemplo, ambos “L1-C1” y “L1-P1” se refieren a la misma estructura de conector-carga útil divulgado en la presente, en tanto ambos “C1” y “P1” indican el mismo compuesto divulgado en la presente, que incluyen un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

[95] En algunas formas de realización, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno se une al antígeno blanco CD74 sobre una célula cancerosa. En algunas formas de realización, CD74 es una isoforma del CD74 humano. En algunas formas de realización, la isoforma del CD74 humano es la isoforma 1 (NP_001020330,1) que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MHRRRSRSCREDQKPVMDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILVTLL
LAGQATTAYFLYQQQGRLDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPM
GALPQGPMQNATKYGNMTEDHVMHLLQNADPLKVYPPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKV
FESWMHHWLLFEMSRHSLEQKPTDAPPKVLTKCQEEVSHIPAVHPGSFRPKCDENGNYLP
LQCYGSIGYCWCVFPNGTEVPNTRSRGHHNCSESLELEDPSSGLGVTKQDLGPVPM (SEQ ID N°:61).

[96] En algunas formas de realización, la isoforma del CD74 humano es la isoforma 2 (NP_004346.1) que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MHRRRSRSCREDQKPVMDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILVTLL
LAGQATTAYFLYQQQGRLDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPM
GALPQGPMQNATKYGNMTEDHVMHLLQNADPLKVYPPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKV
FESWMHHWLLFEMSRHSLEQKPTDAPPKESLELEDPSSGLGVTKQDLGPVPM (SEQ ID N°:62).

[97] En la presente también se proveen, en algunas formas de realización, composiciones que comprenden múltiple copias de un conjugado de anticuerpo-fármaco (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco que se describen en la presente). En algunas formas de realización, el valor *p* promedio de los conjugados de anticuerpo-fármaco en la composición es de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4.

[98] En la presente también se proveen, en algunas formas de realización, composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de anticuerpo-fármaco (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco que se describen en la presente) o una composición (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de composiciones que se describen en la presente) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[99] Además se proveen en la presente, en algunas formas de realización, usos

terapéuticos para los compuestos y las composiciones de ADC descritos, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer. En algunas formas de realización, la presente divulgación provee métodos de tratamiento de un cáncer (por ejemplo, un cáncer que expresa el antígeno CD74 buscado por el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del ADC). En algunas formas de realización, la presente divulgación provee métodos para reducir o retardar la expansión de una población de células cancerosas en un sujeto. En algunas formas de realización, la presente divulgación provee métodos para determinar si un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer responderá al tratamiento con un compuesto o una composición de ADC divulgado en la presente.

[100] Un ejemplo de una forma de realización es un método de tratamiento de un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco, composiciones, o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente). En algunas formas de realización, el cáncer expresa el antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el cáncer es un linfoma o cáncer gástrico.

[101] Otro ejemplo de la forma de realización es un método para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente). En algunas formas de realización, el tumor expresa el antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el tumor es un cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, melanoma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el tumor es un cáncer gástrico. En algunas formas de realización, la administración del conjugado de anticuerpo-fármaco, una composición o una

composición farmacéutica reduce o inhibe el crecimiento del tumor en por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99%.

[102] Otro ejemplo de la forma de realización es un método para reducir o retardar la expansión de una población de células cancerosas en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente). En algunas formas de realización, la población de células cancerosas expresa el antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, la población de células cancerosas es de un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, la población de células cancerosas es de un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, la población de células cancerosas es de un linfoma o cáncer gástrico. En algunas formas de realización, la administración del conjugado de anticuerpo-fármaco, la composición o la composición farmacéutica reduce la población de células cancerosas en por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99%. En algunas formas de realización, la administración del conjugado de anticuerpo-fármaco, la composición o la composición farmacéutica retarda la expansión de la población de células cancerosas en por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos

aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99%.

[103] Otro ejemplo de la Forma de realización es un conjugado de anticuerpo-fármaco, composición o composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente) para usar en el tratamiento de un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer expresa el antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el cáncer es un linfoma o cáncer gástrico.

[104] Otro ejemplo de la Forma de realización es el uso de un conjugado de anticuerpo-fármaco, composición o composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente) en el tratamiento de un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer expresa el antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el cáncer es un linfoma o cáncer gástrico.

[105] Otro ejemplo de la Forma de realización es el uso de un conjugado de anticuerpo-fármaco, composición o composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente) en un método de elaboración de un medicamento para tratar a un

sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer expresa el antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el cáncer es un linfoma o cáncer gástrico.

[106] Otro ejemplo de la forma de realización es un método para determinar si un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer responderá al tratamiento con un conjugado de anticuerpo-fármaco, composición o composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente) mediante el suministro de una muestra biológica del sujeto; poner la muestra en contacto con el conjugado de anticuerpo-fármaco; y detectar la unión del conjugado de anticuerpo-fármaco a las células cancerosas en la muestra. En algunas formas de realización, las células cancerosas en la muestra expresan un antígeno blanco. En algunas formas de realización, el cáncer expresa el antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el cáncer es un linfoma o cáncer gástrico. En algunas formas de realización, la muestra es una muestra de una biopsia de tejido , una muestra de sangre o una muestra de médula ósea.

[107] También se divulgan métodos para producir los compuestos y las composiciones de ADC descritos. Un ejemplo de una forma de realización es un método para producir un conjugado de anticuerpo-fármaco mediante reacción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con un conector escindible unido a un inhibidor de Mcl-1 bajo condiciones que permitan la conjugación.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[108] En la **Figura 1A** se muestra la actividad in vitro de CD74-L7-P1 y la carga útil de P1 en líneas celulares DLBCL (CTG 72h).

[109] En la **Figura 1B** se muestra la actividad in vitro de CD74-L7-P1, IgG-L7-P1 y la carga útil de P1 en líneas celulares DLBCL (CTG 72h).

[110] En la **Figura 2** se muestra la actividad in vitro de varios ADC CD74 y las correspondientes cargas útiles en la línea celular Monomac1 (CTG 72h).

[111] En la **Figura 3** se muestra la actividad in vitro del conjugado de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1, CD74-L7-P1, un isotipo de IgG-L7-P1 ADC y la carga útil MCL-1 libre P1 contra líneas celulares cancerosas endógenas que incluyen KMS-21BM, KMS-20, MONO-MAC-1, NOMO-1, Kasumi-6 y EOL-1.

[112] En la **Figura 4** se muestra la actividad in vitro del conjugado de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1, CD74-L5-P1, un isotipo IgG-L5-P1 ADC y la carga útil MCL-1 libre P1, solo o en combinación con venetoclax, contra MONO-MAC-1, NOMO-1 y EOL-1.

[113] En la **Figura 5** se muestra la actividad in vitro del conjugado de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1, CD74-L5-P1, un isotipo IgG-L5-P1 ADC y la carga útil MCL-1 libre P1, solo o en combinación con el Compuesto A1, contra MONO-MAC-1, NOMO-1 y EOL-1.

[114] En la **Figura 6** se muestra el volumen tumoral (mm3) de ratones SCID hembra con injerto de Nomo1 tras el tratamiento con IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg, administrados una vez por vía IV), solos o en combinación con venetoclax (50 mpk, administrados 4SÍ/3NO/4SÍ PO) (n = 6). Los triángulos y rombos indican los programas de tratamiento con venetoclax y anticuerpos, respectivamente.

[115] En la **Figura 7** se muestra el % de pérdida de peso corporal de ratones SCID hembra con injerto de Nomo1 tras el tratamiento con IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg, administrados una vez por vía IV), solos o en combinación con venetoclax (50 mpk, administrados 4SÍ/3NO/4SÍ PO) (n = 6).

[116] En la **Figura 8** se muestra el volumen tumoral (mm3) de ratones NSG hembra con injerto de Karpas422 tras el tratamiento con IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg, administrados una vez por vía IV), solos o en combinación con venetoclax (50 mpk, administrados 4SÍ/3NO/4SÍ PO) (n = 6). Los triángulos y rombos indican los programas de tratamiento con venetoclax y anticuerpos, respectivamente.

[117] En la **Figura 9** se muestra el % de pérdida de peso corporal de ratones NSG hembra con injerto de Karpas422 tras el tratamiento con IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-

CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg, administrados una vez por vía IV), solos o en combinación con venetoclax (50 mpk, administrados 4SÍ/3NO/4SÍ PO) (n = 6).

[118] En la **Figura 10** se muestra el volumen tumoral (mm3) de ratones SCID hembra con injerto de Monomac1 tras el tratamiento con IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg, administrados una vez por vía IV), solos o en combinación con venetoclax (50 mpk, administrados 2SÍ/2NO/5SÍ/2NO/4SÍ PO) (n = 6). Los triángulos y rombos indican los programas de tratamiento con venetoclax y anticuerpos, respectivamente.

[119] En la **Figura 11** se muestra el % de pérdida de peso corporal de ratones SCID hembra con injerto de Monomac1 tras el tratamiento con IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg, administrados una vez por vía IV), solos o en combinación con venetoclax (50 mpk, administrados 2SÍ/2NO/5SÍ/2NO/4SÍ PO) (n = 6).

[120] En la **Figura 12** se muestra el volumen tumoral (mm3) de ratones SCID hembra con injerto de leucemia (eosinofílica) mieloide aguda humana EOL1 tras el tratamiento con CD74-L5-P1 Fc silente en combinación con venetoclax junto con varios grupos control.

[121] En la **Figura 13** se muestra el % de pérdida de peso corporal de ratones SCID hembra con injerto de leucemia (eosinofílica) mieloide aguda humana EOL1 tras el tratamiento con CD74-L5-P1 Fc silente en combinación con venetoclax junto con varios grupos control.

[122] En la **Figura 14** se muestra el volumen tumoral (mm3) de ratones SCID hembra con xenoinjerto de leucemia (eosinofílica) mieloide aguda humana EOL1 tras el tratamiento con los CD74-ADC con diferentes cargas útiles de conector (L5-P1, L30-P1, L31-P1, L32-P1, L33-P1 y L34-P1).

[123] En la **Figura 15** se muestra el % de pérdida de peso corporal de ratones SCID hembra con xenoinjerto de leucemia (eosinofílica) mieloide aguda humana EOL1 tras el tratamiento con los CD74-ADC con diferentes cargas útiles de conector (L5-P1, L30-P1, L31-P1, L32-P1, L33-P1 y L34-P1).

[124] En la **Figura 16** se muestra un ejemplo de conjugación de anticuerpo específica del sitio usando una transglutaminasa bacteriana (BTG).

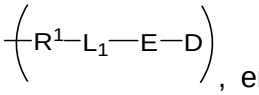
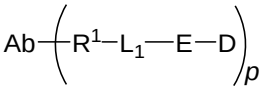
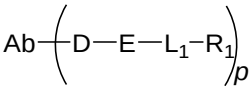
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

[125] Las composiciones y los métodos que se divulgan se comprenderán más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada junto con las figuras adjuntas, que forman parte de esta divulgación.

[126] En todo este texto, las descripciones se refieren a composiciones y métodos para usar las composiciones. Cuando la divulgación describe o reivindica una característica o forma de

realización asociada con una composición, dicha característica o forma de realización es igualmente aplicable a los métodos para usar la composición. Asimismo, cuando la divulgación describe o reivindica una característica o forma de realización asociada con un método para usar una composición, dicha característica o forma de realización es aplicable igualmente a la composición.

[127] Cuando se expresa un rango de valores, incluye formas de realización que utilizan cualquier valor particular dentro de dicho rango. Además, la referencia a los valores definidos en rangos incluyen cada uno y todos los valores incluidos en dicho rango. Todos los rangos incluyen sus puntos de valoración finales y combinables. Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del término "aproximadamente" precedente, se comprenderá que dicho valor específico constituye otra forma de realización. La referencia a un valor numérico particular incluye por lo menos dicho valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El uso de "o" significa "y/o" a menos que el contexto específico de su uso indique lo contrario. Todas las referencias citadas en la presente se incorporan a modo de referencia para todo fin. Si se produjera un conflicto entre una referencia y la descripción, prevalecerá la descripción.

[128] A menos que el contexto de una descripción indique lo contrario, por ejemplo, en ausencia de símbolos que indiquen punto(s) específicos de conectividad, cuando se dibuja una estructura o un fragmento de una estructura, se puede usar por sí misma o unida a otros componentes de un ADC, y se puede realizar en cualquier orientación, por ejemplo, con el anticuerpo unido en cualquier punto de unión adecuado a una unidad química tal como un conector-fármaco. Sin embargo, cuando se indican, los componentes de un ADC se unen en la orientación indicada en una fórmula dada. Por ejemplo, si la Fórmula (1) se describe como Ab-$(L\text{-}D)_p$ y el grupo "-(L-D)" se describe como  , entonces la estructura elaborada de la Fórmula (1) es  . No es  .

[129] Se podrá apreciar que algunas características de las composiciones y los métodos divulgados se describen en la presente a efectos de una mayor claridad, en el contexto de las Formas de realización separadas, y también se pueden proveer combinadas en una única forma de realización. Del mismo modo, varias características de las composiciones y los métodos que, por razones de brevedad, se describen en el contexto de una única forma de realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación.

[130] Según se usa en toda esta solicitud, los conjugados de anticuerpo-fármaco se pueden identificar usando una convención para nombrarlos en el formato general de "antígeno blanco/anticuerpo-conector-carga útil". Por ejemplo solo en el caso en que un conjugado de

anticuerpo-fármaco se refiera como “X-L0-P0 blanco”, dicho conjugado comprenderá un anticuerpo que se une a X blanco, un conector denominado L0 y una carga útil denominada P0. Como alternativa, si un conjugado de anticuerpo-fármaco se designa “anti-X-L0-P0 blanco”, dicho conjugado comprenderá un anticuerpo que se une a X blanco, un conector denominado L0 y una carga útil denominada P0. En otra alternativa, si un conjugado de anticuerpo-fármaco se designa “AbX-L0-P0”, dicho conjugado comprenderá al anticuerpo designado como AbX, un conector designado como L0 y una carga útil designada como P0. Un conjugado de anticuerpo-fármaco control que comprende un anticuerpo control de isotipo no específico, se puede denominar “control de isotipo IgG1-L0-P0” o “IgG1-L0-P0”.

[131] Cualquier fórmula indicada en la presente también representará las formas no marcadas, así como las formas marcadas isotópicamente de los compuestos. Los compuestos marcados isotópicamente tienen las estructuras representadas por las fórmulas indicadas en la presente excepto que se reemplaza uno o más átomos por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico seleccionado. Los isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{18}F y ^{36}Cl. Por lo tanto, se comprenderá que la presente divulgación incluye compuestos que incorporan uno o más de cualquiera de los isótopos mencionados precedentemente incluyendo por ejemplo, isótopos radioactivos, tales como ^{3}H y ^{14}C, o aquellos que incluyen isótopos no radioactivos, tales como ^{2}H y ^{13}C. Dichos compuestos marcados isotópicamente pueden ser útiles en estudios metabólicos (con ^{14}C), estudios de cinética de reacción (por ejemplo, con ^{2}H o ^{3}H), técnicas de detección o de imágenes, tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computada de emisión de fotón simple (SPECT) que incluyen ensayos de distribución en tejidos de fármacos o sustratos o en el tratamiento radiactivo de pacientes. En particular, se desea particularmente un compuesto marcado con ^{18}F o ^{11}C para los estudios de PET o SPECT. Los compuestos marcados isotópicamente en general se pueden preparar mediante técnicas convencionales conocidas por los especialistas en el arte, por ejemplo, usando reactivos isotópicamente marcados apropiados en lugar de los reactivos no marcados empleados previamente.

Definiciones

[132] En toda la Descripción y en las reivindicaciones se utilizarán diversos términos relacionados con los aspectos de la divulgación. Dichos términos tendrán el significado que habitualmente tienen en el arte, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente se interpretarán de una manera coherente con las definiciones provistas en la presente.

[133] Según se usan en la presente, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “ella” incluyen

las formas en plural, a menos que en el contexto se indique claramente lo contrario. Los términos, "que comprende", "que tiene", “que es de” como en “que es de la fórmula química”, "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique de otra manera. Adicionalmente cada vez que se utilice “que comprende” u otro término abierto en una forma de realización, se comprenderá que es misma forma de realización puede ser reivindicada más estrechamente usando el término intermedio “que consiste esencialmente en” o el término cerrado “que consiste en”.

[134] El término "aproximadamente" o "alrededor de”, cuando se usa en el contexto de valores y rangos numéricos, se refiere a valores o rangos que se aproximan o son próximos a los valores o rangos indicados de manera tal que se pueda desarrollar la forma de realización según lo pretendido, como será evidente para el especialista a partir de las descripciones contenidas en la presente. En algunas formas de realización, aproximadamente significa más o menos 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5% o 0,1% de una cantidad numérica. En una forma de realización, el término “aproximadamente” se refiere a un rango de valores que comprende un 10% más o menos que el valor especificado. En otra forma de realización, el término “aproximadamente” se refiere a un rango de valores que comprende un 5% más o menos que el valor especificado. En otra forma de realización, el término “aproximadamente” se refiere a un rango de valores que comprende un 1% más o menos que el valor especificado.

[135] Los términos “conjugado de anticuerpo-fármaco”, “conjugado de anticuerpo”, “conjugado”, “inmunoconjugado” y “ADC” se usan indistintamente, y se refieren a uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1) que está unido a uno o más anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno. En algunas formas de realización, el ADC está definida por la fórmula genérica: Ab-(L-D)$_p$ (Fórmula 1), en donde Ab = un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, L = una unidad conectora, D = una unidad de fármaco (por ejemplo, una unidad de un fármaco inhibidor de Mcl-1) y p = la cantidad de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En los ADC que comprenden una unidad de un fármaco inhibidor de Mcl-1, “p” se refiere a la cantidad de compuestos inhibidores de Mcl-1 ligados al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

[136] El término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplia para hacer referencia a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un blanco, tal como una proteína, un polipéptido, un carbohidrato, un polinucleótido, un lípido o combinaciones de ellos por medio de por lo menos un sitio de reconocimiento del antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Un anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, de cadena múltiple o simple, o una inmunoglobulina intacta, y puede derivar de fuentes

naturales o de fuentes recombinantes. Un anticuerpo “intacto” es una glicoproteína que típicamente comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) unidas entre sí mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (cuya abreviatura en la presente documentación es VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (abreviada como VL en la presente) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse además en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco de trabajo (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y liviana contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunológico (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo camelizado o un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

[137] El término “fragmento de anticuerpo” o “fragmento de unión al antígeno” o “fragmento de anticuerpo funcional”, según se usa en la presente, se refiere a por lo menos uno porción de un anticuerpo que retiene la capacidad para interactuar específicamente (por ejemplo, mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) con un epitope de un antígeno (por ejemplo, CD74). Los fragmentos de unión al antígeno también pueden retener la capacidad para internalizarse en una célula que expresa un antígeno. En algunas formas de realización, los fragmentos de unión al antígeno también retienen la actividad inmunoefectora. Los términos anticuerpo, fragmento de anticuerpo, fragmento de unión al antígeno y semejantes, pretenden abarcar el uso de los dominios de unión de los anticuerpos en el contexto de macromoléculas más grandes tales como los ADC. Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa puede desempeñar la función de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero en un sentido no taxativo, los fragmentos Fab, Fab’, F(ab’)2, Fv, fragmentos de anticuerpo scFv, Fv ligados con disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales,

anticuerpos de dominio simple tal como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo tal como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra y una CDR aislada u otros fragmentos de unión al epitope de un anticuerpo. También se puede incorporar un fragmento de unión al antígeno en anticuerpos de dominio simple, *maxibodies*, *minibodies*, *nanobodies*, *intrabodies*, *diabodies*, *triabodies*, *tetrabodies*, construcciones de anticuerpos bispecíficos o multiespecíficos, ADC, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson (2005) *Nat Biotechnol*. 23(9): 1126-36). También se pueden injertar fragmentos de unión al antígeno en andamiajes basados en polipéptidos tal como una fibronectina tipo III (Fn3) (véase la Patente de los EEUU N°: 6.703.199, donde se describen minibodies del polipéptido fibronectina). El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende por lo menos un fragmento de unión al antígeno que comprende una región variable de una cadena liviana y por lo menos un fragmento de unión al antígeno que comprende una región variable de una cadena pesada, en donde las regiones variables de las cadenas liviana y pesada está unidas contiguamente, por ejemplo, mediante un conector sintético, por ejemplo un conector polipeptídico flexible corto, y que se puede expresar como un polipéptido de cadena simple, y en donde el scFv retiene la especificidad del anticuerpo intacto del cual deriva. A menos que se especifique, un scFv puede comprender las regiones variables VL y VH en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender: VL-conector-VH o puede comprender VH-conector-VL. Los fragmentos de unión al antígeno se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los especialistas en el arte, y los fragmentos de unión se seleccionan por su utilidad (por ejemplo, afinidad de unión, internalización) de la misma manera que los anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión al antígeno se pueden preparar, por ejemplo, mediante escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante escisión química o con proteasas.

[138] El término "región determinante de complementariedad" o "CDR", según se usan en la presente, se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de los anticuerpos, que confieren especificidad y afinidad de unión al antígeno. Por ejemplo, en general, hay tres CDR en cada región variable de la cadena pesada (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres CDR en cada región variable de la cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar usando cualquiera de numerosos esquemas bien conocidos, que incluyen los que describieron Kabat et al., (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"); Al-Lazikani et al., (1997) *J Mol Biol*., 273(4): 927-48 (esquema de numeración "Chotia"); numeración ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc (2001) *Nucleic Acid Res*. 29(1): 207-

9; Lefranc et al., (2003) *Dev Comp Immunol*. 27(1): 55-77) (esquema de numeración “IMGT”); o una combinación de los mismos. En un esquema de numeración combinado de Kabat y Chotia para una región CDR dada (por ejemplo, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 o LC CDR3), en algunas formas de realización, las CDR corresponden a los residuos de aminoácidos que se definen como parte de la CDR de Kabat, junto con los residuos de aminoácidos que se definen como parte de la CDR de Chotia. Según se usa en la presente, las CDR definidas de acuerdo con el esquema de numeración “Chotia” a veces también se denominan “bucles hipervariables”.

[139] En algunas formas de realización, según Kabat, los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de la cadena pesada (VH) se numeran como 31-35 (HCDR1) (por ejemplo, como una o más inserciones después de la posición 35), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de la cadena liviana (VL) se numeran como 24-34 (LCDR1) (por ejemplo, una o más inserciones después de la posición 27), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). En algunas formas de realización, según Chotia, los aminoácidos de CDR en el VH se numeran como 26-32 (HCDR1) (por ejemplo, una o más inserciones después de la posición 31), 52-56 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos en VL se numeran como 26-32 (LCDR1) (por ejemplo, una o más inserciones después de la posición 30), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3). Al combinar las definiciones de CDR de ambos Kabat y Chotia, en algunas formas de realización, las CDR comprenden o consisten en, por ejemplo, los residuos de aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en el VH humano y los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en el VL humano. En algunas formas de realización, según IMGT, los residuos de aminoácidos de CDR en el VH se numeran aproximadamente como 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) y 93-102 (CDR3), y los residuos de aminoácidos de CDR en el VL se numeran aproximadamente como 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) y 89-97 (CDR3). En algunas formas de realización, según IMGT, las regiones CDR de un anticuerpo se pueden determinar usando el programa IMGT/DomainGap Align.

[140] El término "anticuerpo monoclonal", según se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un solo epitope antigénico. Por el contrario, las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) típicamente incluyen una pluralidad de anticuerpos dirigidos contra (o específico de) diferentes epitopes. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo de haberse obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe considerarse que requiere de una producción de anticuerpos usando ningún método

particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación se pueden obtener por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., (1975) *Nature*, 256: 495, o se pueden obtener mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas que se describen, por ejemplo, en Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks et al., (1991) *J. Mol. Biol*. 222: 581-597. El término también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpo de composición molecular simple. Una composición de un anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad y afinidad de unión por un epitope particular.

[141] Los anticuerpos monoclonales que se describen en la presente pueden ser no humanos, humanos o humanizados. El término incluye específicamente a los anticuerpos "quiméricos", en donde una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, en tanto el resto de una o más de las cadenas es idéntico u homólogo de las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que se unan específicamente al antígeno blanco y/o presenten la actividad biológica deseada.

[142] El término “anticuerpo humano”, según se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo producido por un anticuerpo humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo producido por un ser humano. El término incluye anticuerpos que tiene regiones variables en donde ambas regiones de marco y CDR derivan de secuencias de origen humano. Aún más, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de dichas secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o un anticuerpo que contiene secuencias del marco consenso derivadas de un análisis de secuencias del marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik et al., ((2000) *J Mol Biol*. 296(1): 57-86). Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, las CDR, se pueden definir usando esquemas de numeración bien conocidos, por ejemplo, el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chotia o una combinación de Kabat y Chotia, y/o la numeración ImMunoGenTics (IMGT). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos que no están codificados por secuencias humanas (por ejemplo, con mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o mediante una mutación somática in vivo, o con una sustitución conservadora para promover la estabilidad o la elaboración). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, según se usa

en la presente, no incluye anticuerpos en los cuales se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de ratón, en las secuencias de regiones de marco humanas.

[143] El término "anticuerpo humano recombinante", según se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo humano que se prepara, expresa, crea o aísla con medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos, recombinante, combinatoria, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados utilizando cualquier otro medio que comprende el procesamiento por corte y empalme de todo o una porción de un gen de una inmunoglobulina humana, con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales las regiones de marco y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en algunas formas de realización, estos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a una mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*), por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan y están relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal, pueden no existir en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo* bajo condiciones naturales.

[144] El término “anticuerpo quimérico”, según se usa en la presente, se refiere a anticuerpos en los la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina deriva de dos o más especies. En algunos casos, las regiones variables de ambas cadenas pesada y liviana corresponden a las regiones variables de anticuerpos derivada de una especie con la especificidad, afinidad y actividad deseadas, en tanto las regiones constantes son homólogas de anticuerpos derivados de otra especie (por ejemplo, de humanos) para minimizar una respuesta inmunológica en esta última especie.

[145] Según se usa en la presente, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murinos) así como de anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos son un tipo de anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en donde todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de marco (FR) son las de una secuencia de

inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también se puede modificar mediante la sustitución de residuos, ya sea en la región de marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o actividad del anticuerpo.

[146] El término “región Fc”, según se usa en la presente, se refiere a un polipéptido que comprende CH3, CH2 y por lo menos una porción de la región de bisagra de un dominio constante de un anticuerpo. Opcionalmente, una región Fc puede incluir un dominio CH4, presente en algunas clases de anticuerpo. Una región Fc puede comprender toda la región de bisagra de un dominio constante de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región Fc y una región CH1 de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región Fc de una región CH3 de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región Fc, una región CH1 y una región kappa/lambda del dominio constante de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región constante, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada y/o una región constante de la cadena liviana. En algunas formas de realización, dicha región constante está modificada en comparación con una región constante de tipo salvaje. Es decir, el polipéptido puede comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio de la región constante de la cadena liviana (CL). Los ejemplos de modificaciones incluyen adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Dichos cambios se pueden incluir para optimizar la función efectora, vida media, etc.

[147] La “internalización”, según se usa en la presente con referencia a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que puede ser llevada a través de la bicapa lipídica de la membrana de una célula a un compartimento interno (es decir, “internalizada”) tras la unión a la célula, preferiblemente a un compartimento de degradación en la célula. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2 de internalización es un anticuerpo que puede ser incorporado en la célula después de la unión a HER2 sobre la membrana celular. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno usado en los ADC que se divulgan en la presente buscan un antígeno sobre la superficie celular (por ejemplo, CD74) y es un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión al antígeno internalizante (es decir, el ADC es transferido a través de la membrana celular después de la unión al antígeno). En algunas formas de realización, el anticuerpo internalizante, o fragmento de unión al antígeno, se une a un receptor sobre la

superficie celular. Un anticuerpo internalizante o un fragmento de unión al antígeno internalizante que busca un receptor sobre la membrana celular puede inducir endocitosis mediada por el receptor. En algunas formas de realización, el anticuerpo internalizante o un fragmento de unión al antígeno internalizante es tomada por la célula por medio de endocitosis mediada por receptor.

[148] La “no internalización”, según se usa en la presente con referencia a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que permanece en la superficie celular tras la unión con la célula. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno usado en los ADC divulgados en la presente buscan un antígeno de la superficie celular y es un anticuerpo no internalizante o un fragmento de unión al antígeno no internalizante (es decir, el ADC permanece en la superficie celular y no hay transferencia a través de la membrana celular después de la unión al antígeno). En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno no internalizante se une a un receptor no internalizante o a otro antígeno de la superficie celular. Los ejemplos de antígenos no internalizantes de la superficie celular incluyen, pero en un sentido no taxativo, CA125 y CEA, y los anticuerpos que se unen a blancos de antígenos no internalizantes también son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Bast et al., (1981) *J Clin Invest*. 68(5): 1331-7; Scholler y Urban (2007) *Biomark Med*. 1(4): 513-23; y Boudousq et al., (2013) *PLoS One* 8(7): e69613).

[149] El término "especificidad de unión", según se usa en la presente, se refiere a la capacidad de un anticuerpo individual o un fragmento de unión al antígeno para reaccionar preferiblemente con un determinante antigénico frente a un determinante antigénico diferente. El grado de especificidad indica el grado en que un anticuerpo o fragmento se unirá preferencialmente a un determinante antigénico frente a un determinante antigénico diferente. Además, según se usa en la presente, el término "específico", "se une específicamente" y "se une de manera específica" se refiere a una reacción de unión entre un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti- CD74) y un antígeno blanco (por ejemplo, CD74) en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Los anticuerpos se pueden analizar para determinar la especificidad de la unión mediante comparación de la unión a un antígeno apropiado con la unión a un antígeno irrelevante o una mezcla de antígenos en un conjunto dado de condiciones. Si el anticuerpo se une al antígeno apropiado con por lo menos 2, 5, 7, 10 o más afinidad que al antígeno irrelevante o la mezcla de antígenos, entonces se considera que es específico. Un "anticuerpo específico" o un "anticuerpo específico del blanco" es aquel que solo se une al antígeno blanco (por ejemplo, CD74), pero no se une (o presenta una unión mínima) a otros antígenos. En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno blanco (por ejemplo, CD74) tiene una K_D de menos de 1×10^{-6}

M, menos de 1 x 10^{-7} M, menos de 1 x 10~$^{-8}$ M, menos de 1 x 10^{-9} M, menos de 1 x 10^{-10} M, menos de 1 x 10^{-11} M, menos de 1 x 10^{-12} M o menos de 1 x 10^{-13} M. En algunas formas de realización, la K_D comprende entre 1 pM y 500 pM. En algunas formas de realización, la K_D comprende entre 500 pM y 1 µM, entre 1 µM y 100 nM o entre 100 mM y 10 nM.

[150] El término "afinidad", según se usa en la presente, se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Sin limitaciones a una teoría particular, en cada sitio de unión al antígeno, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa por medio de fuerzas débiles no covalentes con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, típicamente será más fuerte la afinidad. La afinidad de unión de un anticuerpo es la suma de las fuerzas de atracción y repulsión que funcionan entre el determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo.

[151] El término "k_{on}" o "k_a" se refiere a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo con el antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno. La velocidad se puede determinar usando ensayos estándar, tales como resonancia de plasmón superficial, inferometría de biocapas o un ensayo ELISA.

[152] El término "k_{off}" o "k_d" se refiere a la constante de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno. La velocidad se puede determinar usando ensayos estándar, tales como resonancia de plasmón superficial, inferometría de biocapas o un ensayo ELISA.

[153] El término "K_D" se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción antígeno-anticuerpo particular. La K_D se calcula por la relación ka/kd. La velocidad se puede determinar usando ensayos estándar, tales como resonancia de plasmón superficial, inferometría de biocapas o un ensayo ELISA.

[154] El término "epitope" se refiere a la porción de un antígeno que puede ser reconocida y que se puede unir específicamente a un anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno). En general, los determinantes del epitope consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de azúcares y pueden presentar características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epitopes se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario del polipéptido. Un epitope puede ser "lineal" o "conformacional". Los epitopes conformacionales y lineales se diferencian en que la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes. El epitope donde se une un anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno) se puede identificar utilizando cualquier técnica de mapeo de epitopes conocida en el arte, inclusive cristalografía de rayos X, para identificar el epitope mediante la visualización directa del complejo antígeno-anticuerpo, así como monitoreo de la unión del anticuerpo contra fragmentos o variaciones

mutadas del antígeno, o monitoreo de la accesibilidad al solvente de diferentes partes del anticuerpo y del antígeno. Los ejemplos de estrategias para mapear epitopes de anticuerpos incluyen, pero en un sentido no taxativo, barrido de oligopéptidos basado en ordenamientos, proteólisis limitada, mutagénesis dirigida al sitio, mapeo de mutagénesis de alto rendimiento, intercambio de hidrógeno-deuterio y espectrometría de masa (véase, por ejemplo, Gershoni et al. (2007) *BioDrugs* 21: 145-56; y Hager-Braun y Tomer (2005) *Expert Rev Proteomics* 2: 745-56).

[155] También se puede usar la unión competitiva y la unión de epitopes para determinar los anticuerpos que comparten epitopes idénticos o superpuestos. La unión competitiva se puede evaluar utilizando un ensayo de bloqueo cruzado, tal como el ensayo que se describe en "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow y Lane (1ª edición de 1988, 2ª edición de 2014). En algunas formas de realización, la unión competitiva se identifica cuando un anticuerpo o una proteína de unión de prueba reduce la unión de un anticuerpo o una proteína de unión de referencia a un antígeno blanco tal como CD74 (por ejemplo, una proteína de unión que comprende una CDR y/o dominios variables seleccionados entre los identificados en las Tablas 3-5), en por lo menos un 50% aproximadamente en el ensayo de bloqueo cruzado (por ejemplo, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5% o más, o cualquier porcentaje intermedio) y/o viceversa. En algunas formas de realización, la unión competitiva se puede deber a epitopes compartidos o similares (por ejemplo, una superposición parcial), o debido a un impedimento estérico en el sitio donde los anticuerpos o las proteínas de unión se unen a epitopes próximos (véase, por ejemplo, Tzartos, *Methods in Molecular Biology* (Morris, ed (1998) volumen 66, páginas 55-66)). En algunas formas de realización, la unión competitiva se puede usar para clasificar los grupos de proteínas de unión que comparten epitopes similares. Por ejemplo, las proteínas de unión que compiten por la unión se pueden "agrupar por rangos [*binned*]" como un grupo de proteínas de unión que tiene epitopes superpuestos o próximos, en tanto las que no compiten se ubican en un grupo separado de proteínas de unión que no tienen epitopes superpuestos o próximos.

[156] Según se usa en la presente, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente con referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos abarcan polímeros de aminoácidos que comprenden dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como polímeros de aminoácidos natural y polímeros de aminoácidos no naturales. Los términos incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros.

Los términos también incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de polipéptidos particular también abarca implícitamente variantes conservadoras modificadas de la misma.

[157] Una proteína "recombinante" se refiere a una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) producida usando técnicas recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

[158] Una proteína "aislada" se refiere a una proteína no acompañada por al menos parte del material con el que habitualmente está asociada en su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido natural presente en un organismo vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el organismo vivo, está aislado. La definición incluye la producción de un anticuerpo en una amplia variedad de organismos y/o células huésped que son conocidos en el arte.

[159] Un "anticuerpo aislado", según se usa en la presente, es un anticuerpo que se ha identificado y separado de uno o más (por ejemplo, la mayor parte) de los componentes (en peso) de su entorno fuente, por ejemplo, de los componentes de un cultivo celular de hibridomas o un cultivo celular diferente que se utilizó para su producción. En algunas formas de realización, la separación se realiza de manera tal que se eliminan suficientemente los componentes que de otro modo podrían interferir con la idoneidad del anticuerpo para las aplicaciones deseadas (por ejemplo, para uso terapéutico). Los métodos para preparar anticuerpos aislados son conocidos en el arte e incluyen, sin limitaciones, cromatografía con proteína A, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, filtración para retención de virus y ultrafiltración.

[160] Según se usa en la presente, el término "variante" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de ácidos nucleicos o una secuencia de aminoácidos de referencia, respectivamente, pero que conserva una o más propiedades biológicas de dicha secuencia de referencia. Una variante puede contener una o más sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos (o la correspondiente sustitución, supresión y/o inserción de codones) con respecto a una secuencia de referencia. Los cambios en una variante de ácido nucleico pueden no alterar la secuencia de aminoácidos de un péptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos de referencia, o pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, supresiones, fusiones y/o truncamientos de aminoácidos. En algunas formas de realización, una variante de ácidos nucleicos divulgada en la presente codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a la codificada por el ácido nucleico no modificado o codifica una secuencia de aminoácidos modificada que retiene una o más propiedades funcionales de la secuencia de aminoácidos no modificada.

Los cambios en la secuencia de variantes de péptidos son típicamente limitados o conservadores, de modo que en general las secuencias del péptido no modificado y la variante son muy similares y, en muchas regiones, idénticas. En algunas formas de realización, una variante peptídica retiene una o más propiedades funcionales de la secuencia peptídica no modificada. Un péptido variante y no modificado puede diferir en cuanto a la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, supresiones, en cualquier combinación.

[161] Una variante de un ácido nucleico o de un péptido puede ser una variante natural o una variante que por lo que se sabe no es natural. Las variantes de los ácidos nucleicos y péptidos se pueden preparar mediante técnicas de mutagénesis, síntesis directa u otras técnicas conocidas en el arte. Una variante no requiere necesariamente la manipulación física de la secuencia de referencia. Siempre que una secuencia contenga un ácido nucleico o aminoácido diferente en comparación con una secuencia de referencia, se la considera como una "variante" independientemente de cómo se sintetizó. En algunas formas de realización, una variante tiene una identidad de secuencia alta (es decir, 60% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos o mayor) en comparación con una secuencia de referencia. En algunas formas de realización, una variante peptídica abarca polipéptidos que tienen sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos siempre que el polipéptido tenga por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80% , por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% , por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia, o con un segmento correspondiente (por ejemplo, un fragmento funcional) de una secuencia de referencia, por ejemplo, aquellas variantes que también retienen una o más funciones de la secuencia de referencia. En algunas formas de realización, una variante de ácido nucleico abarca polinucleótidos que comprenden sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos siempre que el polinucleótido tenga por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80 %, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98 %, por lo menos 99% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de referencia, o con un segmento correspondiente (por ejemplo, un fragmento funcional) de una secuencia de referencia.

[162] El término "variante modificada conservadoramente" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. En el caso de las secuencias de ácido nucleico, las variantes modificadas conservadoramente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la

degeneración del código genético, hay una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos que codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde hay una alanina especificada por un codón, es posible alterar dicho codón por cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que constituyen una especie de las variaciones modificadas conservadoramente. Cada secuencia de ácidos nucleicos de la presente que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un especialista reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (excepto AUG, que habitualmente es el único codón para metionina, y TGG, que habitualmente es el único codón para triptofano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por lo tanto, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita. En el caso de secuencias de polipéptidos, las variantes modificadas conservadoramente incluyen sustituciones, supresiones o adiciones individuales en la secuencia de polipéptidos que dan como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en el arte.

[163] El término "modificaciones de secuencia conservadoras", según se usa en la presente, se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión, por ejemplo, de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante técnicas estándar conocidas en el arte, tales como, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las cuales el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares están definidas en el arte. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Por lo tanto, en algunas formas de realización, se puede reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en un anticuerpo por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el

anticuerpo alterado se puede analizar usando los ensayos funcionales que se describen en la presente.

[164] El término "homólogo" o "identidad", según se usa en la presente, se refiere a la identidad de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de subunidad en las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas. Por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10) son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son 90% homólogas.

[165] El porcentaje de "identidad de secuencia" se puede determinar comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre una ventana de comparación, donde el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (por ejemplo, huecos o sobreextensiones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineamiento óptima de las dos secuencias. El porcentaje se puede calcular determinando el número de posiciones en las cuales se encuentra el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. El resultado es el porcentaje de identidad de la secuencia sujeto con respecto a la secuencia de consulta. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que se deben introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. En general, la identidad u homología de aminoácidos entre las proteínas que se divulgan en la presente y sus variantes, incluidas las variantes de antígenos blanco (como CD74) y las variantes de dominios variables de anticuerpos (incluidas las CDR variantes individuales), es de por lo menos 80% con respecto a las secuencias representadas en la presente, por ejemplo con identidades u homologías de por lo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, casi 100 % o 100%.

[166] La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede efectuar utilizando un algoritmo matemático. En algunas formas de

realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) *J Mol Biol*. 48: 444-53) que se ha incorporado en el programa GAP del paquete de software GCG, utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En algunas formas de realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP del paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso por hueco de 40, 50, 60, 70 ú 80 y un peso por longitud de 1, 2, 3 , 4, 5 ó 6. Un ejemplo de un conjunto de parámetros comprende una matriz de calificación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por hueco con desplazamiento de marco de 5. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de Meyers y Miller ((1989) CABIOS 4: 11-17) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando la tabla de peso de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

[167] El término "agente" se usa en la presente para hacer referencia a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, un extracto obtenido de materiales biológicos o una combinación de dos o más de los mismos. El término "agente terapéutico" o "fármaco" se refiere a un agente que puede modular un proceso biológico y/o que tiene actividad biológica. Los inhibidores de Mcl-1 y los ADC que comprenden los mismos, como se describe en la presente, son ejemplos de agentes terapéuticos.

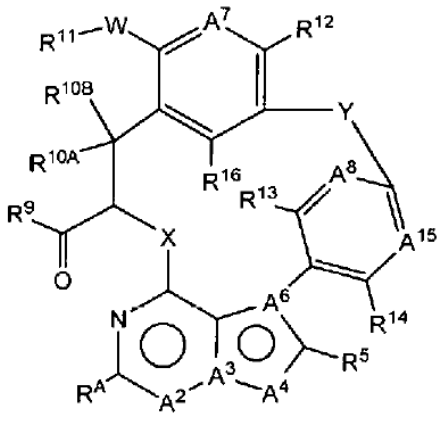
[168] El término "agente quimioterapéutico" o "agente anticanceroso" se usa en la presente con referencia a todos los agentes que son eficaces para el tratamiento de cáncer (independientemente del mecanismo de acción). La inhibición de una metástasis o de la angiogénesis con frecuencia constituye una propiedad de un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos incluyen anticuerpos, moléculas biológicas y moléculas pequeñas, y abarcan inhibidores de Mcl-1 y a los ADC que comprenden a los mismos, como se describe en la presente. Un agente quimioterapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. El término "agente citostático" se refiere a un agente que inhibe o suprime el crecimiento celular y/o la multiplicación de células. El término "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que causa la muerte celular, fundamentalmente por interferir con la actividad y/o el funcionamiento de la expresión celular.

[169] El término "leucemia de células mieloides 1" o "Mcl-1", según se usa en la presente, se refiere a cualquier forma nativa de la Mcl-1 humana, un miembro antiapoptótico de la familia de proteínas Bcl-2. El término abarca una Mcl-1 humana de longitud completa (por

ejemplo, la Secuencia de referencia de UniProt: Q07820; SEQ ID Nº: 63), así como cualquier forma de una Mcl-1 humana que pueda resultar del procesamiento celular. El término también abarca variantes funcionales o fragmentos de la Mcl-1 humana incluyendo, pero en un sentido no taxativo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas que retienen una o más funciones biológicas de la Mcl-1 humana (es decir, las variantes y los fragmentos están incluidos a menos que el contexto indicara que el término se emplea únicamente con referencia a la proteína de tipo salvaje). Es posible aislar Mcl-1 de humanos, o se puede producir de manera recombinante o mediante métodos de síntesis.

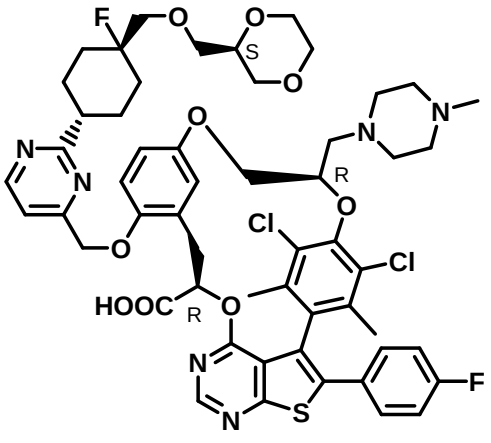
[170] El término "inhibir" o "inhibición" o "que inhibe", según se usa en la presente, significa reducir una actividad o proceso biológico en una cantidad medible, y puede incluir, pero no es un requisito, una prevención o inhibición completa. En algunas formas de realización, "inhibición" significa reducir la expresión y/o actividad de Mcl-1 y/o uno o más moduladores corriente arriba o blancos corriente abajo de los mismos.

[171] El término “inhibidor de Mcl-1”, según se usa en la presente, se refiere a un agente capaz de reducir la expresión y/o actividad de Mcl-1 y/o uno o más moduladores corriente arriba o blancos corriente debajo de los mismos. Los ejemplos de moduladores de Mcl-1 (que incluyen ejemplos de inhibidores de Mcl-1) se describen en WO 2015/097123; WO 2016/207216; WO 2016/207217; WO 2016/207225; WO 2016/207226; WO 2017/125224; WO 2019/035899, WO 2019/035911, WO 2019/035914, WO 2019/035927, US 2019/0055264, WO 2016/033486, WO 2017/147410, WO 2018/183418 y WO 2017/182625, cada uno de los cuales se incorpora en la presente a modo de referencia como ejemplos de moduladores de Mcl-1, que incluyen ejemplos de inhibidores de Mcl-1, que se pueden incluir como unidades de fármaco en los ADC divulgados. Por ejemplo, los ejemplos de inhibidores de Mcl-1 que se pueden incluir como unidades de fármaco en los ADC divulgados son aquellos de la fórmula:

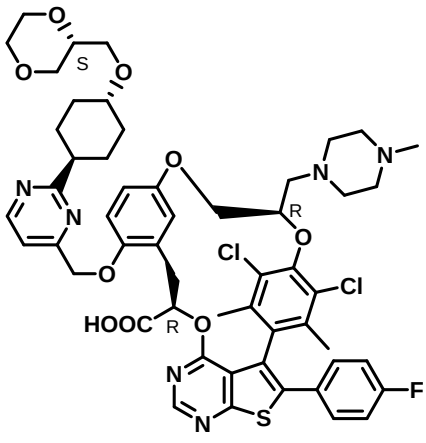


,

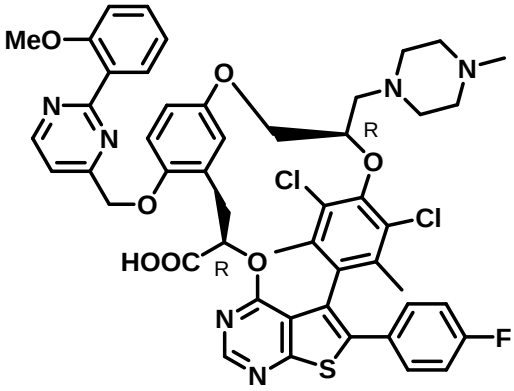
en donde cada variable se define como en WO2019/035911; WO 2019/035899; WO 2019/035914; o WO 2019/035927. Los ejemplos específicos incluyen, por ejemplo,



(P16),



(P17),



(P15), en donde cada compuesto como carga útil de fármaco se puede conjugar con un anticuerpo o un conector a través del átomo de nitrógeno del N-metilo en el grupo funcional de piperazinilo del compuesto. Según se usa en la presente, los términos "derivado" y "análogo" con referencia a un inhibidor de Mcl-1, o semejantes, se refiere a cualquiera de dichos compuesto que retenga esencialmente la misma función o actividad biológica, o una función o actividad similar o mejorada, en comparación con el compuesto original pero tiene una estructura química o biológica alterada.

[172] Según se usa en la presente, una “unidad de fármaco de un inhibidor de Mcl-1”, un “inhibidor de Mcl-1”, y semejantes se refieren al componente de un ADC o de una composición que proporciones la estructura de un compuesto inhibidor de Mcl-1 o de un compuesto modificado para su unión a un ADC que retenga esencialmente la misma función o actividad biológica, o una función o actividad similar o mejorada en comparación con el compuesto original. En algunas formas de realización, la unidad de fármaco de un inhibidor de Mcl-1 es el componente (D) en un ADC de la Fórmula (1).

[173] El término “cáncer”, según se usa en la presente, se refiere a la presencia de células que exhiben características típicas de células que causan cáncer, tal como una proliferación descontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, velocidad de crecimiento y proliferación rápida y/o determinadas características morfológicas. A menudo, las células cancerosas se pueden encontrar en la forma de un tumor o una masa, pero dichas células pueden existir solas dentro de un sujeto, o pueden circular en el torrente sanguíneo como células

independientes, tales como células leucémicas o de linfoma. El término "cáncer" incluye todos los tipos de cánceres y metástasis de cáncer, inclusive cánceres hematológicos, tumores sólidos, sarcomas, carcinomas y otros cánceres de tumores sólidos y no sólidos. Los Cánceres hematológicos pueden incluir formas malignas de células B, cánceres de la sangre (leucemias), cánceres de células plasmáticas (mielomas, por ejemplo, mieloma múltiple) o cánceres de los nódulos linfáticos (linfomas). Los ejemplos de formas malignas de células B incluyen leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma folicular, linfoma de las células del manto y linfoma difuso de células B grandes. Las leucemias pueden incluir aguda leucemia linfoblástica (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielogénica crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), leucemia monocítica aguda (AMoL), etc. Los linfomas pueden incluir linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, etc. Otros cánceres hematológicos pueden incluir el síndrome de mielodisplasia (MDS). Los tumores sólidos pueden incluir carcinomas tal como un adenocarcinoma, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon o colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, colangiocarcinoma, glioma, melanoma, etc. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el cáncer es un linfoma o cáncer gástrico.

[174] En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer hematológico, por ejemplo, una leucemia, un linfoma o un mieloma. Por ejemplo, se puede usar una combinación descrita en la presente para tratar formas malignas cancerosas, y trastornos relacionados, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, por ejemplo, una leucemia aguda, por ejemplo, leucemia linfoide aguda de células B (BALL), leucemia linfoide aguda de células T (TALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide aguda (ALL); una leucemia crónica, por ejemplo, leucemia mielogénica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); un cáncer hematológico o condición hematológica adicional, por ejemplo, proleucemia linfocítica de células B, neoplasma de células dendríticas plasmocitoide blástica, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, condiciones linfoproliferativos malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple,

mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström, mielofibrosis, amiloidosis de la cadena liviana amiloide, leucemia neutrofílica crónica, trombocitemia esencial, leucemia eosinofílica crónica, leucemia mielomonocítica crónica, síndrome de Richter, leucemia aguda de fenotipo mixto, leucemia bifenotípica aguda y "preleucemia" que comprenden una colección diversa de condiciones hematológicas que tienen en común la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y semejantes.

[175] Según se usa en la presente, el término "tumor" se refiere a cualquier masa de tejido que pudiera resultar de un crecimiento o proliferación celular excesivos, ya sea benigno o maligno, que incluye lesiones precancerosas. En algunas formas de realización, el tumor es un cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, melanoma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el tumor es un cáncer gástrico.

[176] Los términos "célula tumoral" y "célula cancerosa" se pueden usar indistintamente en la presente y se refieren a células individuales o a la población total de células derivadas de un tumor o cáncer, incluyendo tanto células no tumorigénicas como células madre cancerosas. Los términos "célula tumoral" y "célula cancerosa" se pueden modificar con el término "no tumorigénica" cuando solo se refiere a aquellas células que carecen de la capacidad para renovarse y diferenciarse a fin de distinguir aquellas células de las células madre cancerosas.

[177] El término "negativo para el blanco", "negativo para el antígeno blanco" o "negativo para el antígeno", según se usa en la presente, se refiere a la ausencia de expresión del antígeno blanco por una célula o tejido. El término "positivo para el blanco", "positivo para el antígeno blanco" o "positivo para el antígeno" se refiere a la presencia de expresión del antígeno blanco. Por ejemplo, una célula o una línea celular que no expresa un antígeno blanco se puede describir como negativo para el blanco, en tanto una célula o línea celular que expresa un antígeno blanco se puede describir como positivo para el blanco.

[178] Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente para hacer referencia a cualquier ser humano o animal no humano que necesita tratamiento. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados (por ejemplo, mamíferos y no mamíferos) tal como cualquier mamífero. Los ejemplos no taxativos de mamíferos incluyen humanos, chimpancés, simios, monos, vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos, conejos, perros, gatos, ratas, ratones y cobayos. Los ejemplos no taxativos de vertebrados no

mamíferos incluyen aves y peces. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano.

[179] El término “un sujeto que necesita tratamiento”, según se usa en la presente, se refiere a un sujeto que se beneficiaría biológicamente, médicamente o en su calidad de vida con un tratamiento (por ejemplo, un tratamiento con cualquiera entre uno o más de los ejemplos de compuestos de ADC que se describen en la presente).

[180] Según se usa en la presente, el término “tratar”, “tratando” o “tratamiento” se refiere a cualquier mejora de cualquier consecuencia de una enfermedad, trastorno o condición, tal como una supervivencia prolongada, menos morbilidad y/o una disminución de los efectos secundarios que sean el resultado de una modalidad terapéutica alternativa. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende retardar o aliviar una enfermedad, trastorno o condición (es decir, el retardo o arresto o reducción del desarrollo de una enfermedad o por lo menos de uno de los síntomas clínicos de la misma). En algunas formas de realización, el tratamiento comprende retardar, aliviar o mejorar por lo menos un parámetro físico de una enfermedad, trastorno o condición, incluyendo aquellos que no sean perceptibles por el paciente. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende modular una enfermedad, trastorno o condición, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma perceptible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende administrar un compuesto o una composición de DC descrito a un sujeto, por ejemplo, un paciente, para obtener un beneficio de tratamiento enumerado en la presente. El tratamiento puede comprender curar, sanar, aliviar, retardar, prevenir, aliviar, alterar, remediar, mitigar, paliar, mejorar o afectar una enfermedad, trastorno o condición (por ejemplo, un cáncer), los síntomas de una enfermedad, trastorno o condición (por ejemplo, un cáncer) o una predisposición para una enfermedad, trastorno o condición (por ejemplo, un cáncer). En algunas formas de realización, además de tratar a un sujeto que padece una enfermedad, trastorno o condición, también se puede proveer una composición divulgada en la presente de manera profiláctica para prevenir o reducir la probabilidad de desarrollar dicha enfermedad, trastorno o condición.

[181] Según se usa en la presente, el término “prevenir”, “que previene” o “prevención” de una enfermedad, trastorno o condición se refiere al tratamiento profiláctico de dicha enfermedad, trastorno o condición; o retardar el inicio o el progreso de la enfermedad, trastorno o condición.

[182] Según se usa en la presente, una "composición farmacéutica” se refiere a una preparación de una composición, por ejemplo, un compuesto o composición de ADC, además de por lo menos un componente adicional (y opcionalmente más de uno) adecuado para su

administración a un sujeto, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable, un estabilizante, diluyente, agente de dispersión, agente de suspensión, agente espesante y/o excipiente. Las composiciones farmacéuticas se proveen en la presente en una forma que permita su administración y que subsiguientemente proporcione la actividad biológica pretendida de dichos uno o más ingredientes activos y/o para lograr un efecto terapéutico. Las composiciones farmacéuticas provistas en la presente preferiblemente no contienen componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto a que se administrará la formulación.

[183] Según se usa en la presente, los términos "vehículo farmacéuticamente aceptable" y "vehículo fisiológicamente aceptable", que se pueden usar indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no cause una irritación significativa en un sujeto y no anule la actividad biológica y las propiedades del compuesto o composición de ADC administrado y/o de cualquier agente terapéutico adicional en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden mejorar o estabilizar la composición o se pueden usar para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngico), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes y semejantes, y combinaciones de los mismos, que son conocidos por los especialistas en el arte (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, páginas 1289-1329). El uso de los mismos está contemplado en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas excepto si cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo. El vehículo se puede seleccionar para minimizar los efectos secundarios adversos en el sujeto, y/o para minimizar la degradación de los ingredientes activos. También se puede incluir un adyuvante en cualquiera de estas formulaciones.

[184] Según se usa en la presente, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se agrega a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo. Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes tales como agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites vegetales o naftalenos hidrogenados. Otros ejemplos de excipientes incluyen, pero en un sentido no taxativo, bicarbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, partículas de copolímeros de etileno-acetato de vinilo y agentes tensioactivos, que incluyen, por ejemplo, polisorbato 20.

[185] El término “sal farmacéuticamente aceptable”, según se usa en la presente, se refiere

a una sal que no anula la actividad biológica y las propiedades de los compuestos de la invención, y que no causa una irritación significativa en el sujeto al que se los administra. Los ejemplos de dichas sales incluyen, pero en un sentido no taxativo: (a) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y semejantes; y sales formadas con ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalensulfónico, ácido metansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido poligalacturónico y semejantes; y (b) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y iodo. Véase, por ejemplo, Haynes et al., "Commentary: Occurrence of Pharmaceutically Acceptable Anions and Cations in the Cambridge Structural Database", *J. Pharmaceutical Sciences*, volumen 94, Nº 10 (2005), y Berge et al., "Pharmaceutical Salts", *J. Pharmaceutical Sciences*, volumen 66, Nº 1 (1977), que se incorporan en la presente a modo de referencia.

[186] En algunas formas de realización, dependiendo de su carga electrónica, los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), conectores, cargas útiles y cargadores conectores descritos en la presente pueden contener un contraión aniónico monovalente M^{1-}. Se puede usar cualquier contraión aniónico adecuado. En algunas formas de realización, el contraión aniónico monovalente es un contraión aniónico monovalente farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el contraión aniónico monovalente M^{1-} puede seleccionarse entre bromuro, cloruro, yoduro, acetato, trifluoroacetato, benzoato, mesilato, tosilato, triflato, formiato o similares. En algunas formas de realización, el contraión aniónico monovalente M^{1-} es trifluoroacetato o formiato.

[187] Según se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz", se refiere a una cantidad de un compuesto descrito en la presente, por ejemplo, un compuesto o una composición de ADC que se describe en la presente, para lograr el resultado terapéutico deseado (es decir, una reducción o inhibición de una enzima o la actividad de una proteína, alivio de los síntomas, alivio de los síntomas o condiciones, retardo del progreso de la enfermedad, una reducción del tamaño del tumor, inhibición del crecimiento tumoral, prevención de metástasis). En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz no induce ni causa efectos secundarios indeseables. En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz induce o causa efectos secundarios pero solamente aquellos que son aceptables por un clínico a cargo del tratamiento en vista de la condición de un paciente. En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es eficaz para matar, reducir y/o inhibir de manera detectable el crecimiento o la dispersión de células cancerosas, el tamaño o el número de

tumores y/u otra medida del nivel, estadio, progresión y/o la gravedad de un cáncer. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células blanco, por ejemplo, una reducción, retardo o inhibición del crecimiento celular. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar administrando primero una dosis baja y luego aumentando gradualmente esa dosis hasta que se logre el efecto deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede variar dependiendo de la aplicación prevista (in vitro o in vivo), o del sujeto y la condición de la enfermedad bajo tratamiento, por ejemplo, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración y semejantes, que pueden ser determinados fácilmente por un especialista en el arte. La cantidad específica puede variar, por ejemplo, según la composición farmacéutica particular, el sujeto y su edad y las condiciones de salud existentes o el riesgo de condiciones de salud, el régimen de dosificación a seguir, la gravedad de la enfermedad, si se administra en combinación con otros agentes, el momento de la administración, el tejido donde se administra y el sistema de administración física en el cual se transporta. En el caso de un cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC puede reducir la cantidad de células cancerosas, reducir el tamaño tumoral, inhibir (por ejemplo, retardar o detener) la metástasis tumoral, inhibir (por ejemplo, retardar o detener) el crecimiento tumoral y/o aliviar uno o más síntomas.

[188] Según se usa en la presente, el término "cantidad profilácticamente eficaz" o "dosis profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto divulgado en la presente, por ejemplo, un compuesto o una composición de ADC que se describe en la presente, que es eficaz, a las dosis y por los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas formas de realización, una cantidad profilácticamente eficaz puede prevenir la aparición de los síntomas de la enfermedad, inclusive los síntomas asociados con un cáncer.

[189] El término “*p*” o “carga de fármaco” o “relación de fármaco: anticuerpo” o “relación de fármaco a anticuerpo” o “DAR” se refiere a la cantidad de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, es decir, la carga del fármaco, o la cantidad de unidades -L-D por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (Ab) en los ADC de la Fórmula (1). En los ADC que comprenden una unidad de un fármaco inhibidor de Mcl-1, “*p*” se refiere a la cantidad de compuestos inhibidores de Mcl-1 ligados al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Por ejemplo, si hay dos compuestos inhibidores de Mcl-1 ligados a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, entonces $p = 2$. En las composiciones que comprenden múltiple copias de los ADC de la Fórmula (1), “*p* promedio” se refiere a la cantidad promedio de unidades -L-D por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, también denominada “carga de fármaco promedio.”

Conjugados de anticuerpo-fármaco

[190] Los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente divulgación incluyen aquellos que tienen con actividad anticancerosa. En particular, los compuestos de ADC incluyen un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno conjugado (es decir, unido de manera covalente mediante un conector) a una unidad de fármaco (por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1), en donde dicha unidad de fármaco tiene un efecto citotóxico o citostático cuando no está conjugado a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunas formas de realización, la unidad de fármaco puede reducir la expresión y/o actividad de Mcl-1 y/o uno o más moduladores corriente arriba o blancos corriente debajo de los mismos, cuando no está conjugado a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Sin considerar una teoría particular, con el direccionamiento de la expresión y/o actividad de Mcl-1, en algunas formas de realización, los ADC divulgados en la presente pueden proveer potentes agentes anticancerosos. Además, sin considerar una teoría particular, al conjugar la unidad de fármaco a un anticuerpo que se une a un antígeno asociado con la expresión en una célula tumoral o cáncer, el ADC puede proveer una actividad mejorada, una mejor especificidad citotóxica y/o una reducción de la muerte fuera del blanco en comparación con la administración de la unidad de fármaco solamente.

[191] Por lo tanto, en algunas formas de realización, los componentes del ADC se seleccionan para (i) retener una o más propiedades terapéuticas que presentan las unidades de anticuerpo y fármaco de forma aislada, (ii) conservar las propiedades de unión específicas del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno; (iii) optimizar la carga de fármaco y las relaciones de fármaco-anticuerpo; (iv) permitir el suministro, por ejemplo, el suministro intracelular, de la unidad de fármaco mediante una unión estable al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno; (v) retener la estabilidad de ADC como un conjugado intacto hasta su transporte o suministro en un sitio blanco; (vi) minimizar la agregación del ADC antes o después de la administración; (vii) permitir el efecto terapéutico, por ejemplo, un efecto citotóxico, de la unidad de fármaco después de la escisión u otro mecanismo de liberación en el entorno celular; (viii) exhibir una eficacia de tratamiento anticancerígeno in vivo comparable o superior a la de las unidades de anticuerpo y fármaco de forma aislada; (ix) minimizar la muerte fuera del blanco por parte del fármaco; y/o (x) exhibir propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas deseables, capacidad de formulación y perfiles toxicológicos/inmunológicos. Cada una de estas propiedades puede proveer un ADC mejorado para uso terapéutico (Ab et al., (2015) *Mol Cancer Ther*. 14: 1605-13).

[192] Los compuestos de ADC de la presente divulgación pueden suministrar selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico o citostático en las células cancerosas o en el tejido tumoral. En algunas formas de realización, la actividad citotóxica

y/o citostática del ADC depende de la expresión del antígeno blanco en una célula. En algunas formas de realización, los ADC divulgados son particularmente eficaces para matar células cancerosas que expresan un antígeno blanco en tanto minimizan la muerte fuera del blanco. En algunas formas de realización, los ADC divulgados no exhiben un efecto citotóxico y/o citostático para las células cancerosas que no expresan un antígeno blanco.

[193] En la presente se proveen, en determinados aspectos, compuestos de ADC que comprenden un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo (Ab) dirigido a una célula cancerosa, una unidad de un fármaco inhibidor de Mcl-1 (D) y una unidad conectora (L) que une Ab a D de manera covalente. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se puede unir a un antígeno asociado a un tumor (por ejemplo, BCMA, CD33, PCAD o HER2), por ejemplo, con gran especificidad y gran afinidad. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es internalizado en una célula blanco tras la unión, por ejemplo, a un compartimento de degradación de la célula. En algunas formas de realización, los ADC son internalizados tras la unión a una célula blanco, sufren degradación y liberan la unidad de fármaco de un inhibidor de Mcl-1 para matar las células cancerosas. La unidad de fármaco de un inhibidor de Mcl-1 puede ser liberada del anticuerpo y/o la unidad conectora del ADC mediante acción enzimática, hidrólisis, oxidación o cualquier otro mecanismo.

[194] Un ejemplo de ADC es de la Fórmula (1):

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad (1)$$

en donde Ab = un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, L = una unidad conectora, D = una unidad de un fármaco inhibidor de Mcl-1 y *p* = la cantidad de unidades del fármaco inhibidor de Mcl-1 por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

Anticuerpos

[195] El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (Ab) de la Fórmula (1) incluye dentro de su alcance cualquier anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno blanco sobre una célula cancerosa. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se puede unir a un antígeno blanco con una constante de disociación (K_D) ≤1 mM, ≤100 nM o ≤10 nM, o cualquier cantidad en entre estos valores, medida, por ejemplo, mediante análisis con BIAcore®. En algunas formas de realización, la K_D comprende entre 1 pM y 500 pM. En algunas formas de realización, la K_D comprende entre 500 pM y 1 µM, entre 1 µM y 100 nM o entre 100 mM y 10 nM.

[196] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo de cuatro cadenas (también denominado inmunoglobulina o un anticuerpo intacto o de longitud completa), que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un

fragmento de unión al antígeno de una inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un fragmento de unión al antígeno de una inmunoglobulina que conserva la capacidad para unirse a un antígeno de cáncer blanco y/o proporcionar al menos una función de la inmunoglobulina.

[197] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo internalizante o fragmento de unión al antígeno internalizante del mismo. En algunas formas de realización, el anticuerpo internalizante o el fragmento de unión al antígeno internalizante del mismo se une a un antígeno de cáncer blanco expresado sobre la superficie de una célula e ingresa en la célula tras la unión. En algunas formas de realización, la unidad de fármaco inhibidor de Mcl-1 del ADC es liberada del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno del ADC después del ingreso del ADC y está presente en una célula que expresa el antígeno de cáncer blanco (es decir, después de la internalización del ADC), por ejemplo, mediante escisión, mediante degradación del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, o mediante cualquier otro mecanismo de liberación adecuado.

[198] Las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de anticuerpos de la presente divulgación, además de los ejemplos de blancos antigénicos, se muestran en las Tablas C, D y E.

Tabla C. Secuencias de aminoácidos de las CDR de los mAb

Ab	SEQ ID N°	Cadena de IgG	Secuancia de aminoácido
milatuzumab	SEQ ID N°:1 (Combinado)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID N°:2 (Combinado)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°: 3 (Combinado)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID N°:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°: 3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°: 5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID N°:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID N°:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID N°:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID N°:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:16 (Combinado)	LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Combinado)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Combinado)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:16 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:19 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNGNTY
	SEQ ID N°:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP

	SEQ ID N°:22 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNGNTY
	SEQ ID N°:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT
Mil_HC x hzVk1a	SEQ ID N°:1 (Combinado)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID N°:2 (Combinado)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°:3 (Combinado)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID N°:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°:3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID N°:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID N°:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID N°:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID N°:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:16 (Combinado)	LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Combinado)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Combinado)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:16 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:19 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNGNTY
	SEQ ID N°:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID N°:22 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNGNTY
	SEQ ID N°:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT
Hcmil x LCmil_NQ	SEQ ID N°:1(Combinado)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID N°:2 (Combinado)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°:3 (Combinado)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID N°:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°:3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID N°:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID N°:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID N°:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID N°:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:35 (Combinado)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Combinado)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Combinado)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:35 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:71 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNQNTY

	SEQ ID N°:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID N°:17 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNQNTY
	SEQ ID N°:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT
VHmil x VK1aNQ	SEQ ID N°:1 (Combinado)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID N°:2 (Combinado)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°:3 (Combinado)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID N°:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°:3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID N°:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID N°:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID N°:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID N°:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:35 (Combinado)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Combinado)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Combinado)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:35 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:71 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNQNTY
	SEQ ID N°:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID N°:17 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNQNTY
	SEQ ID N°:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT
VHmil x VK1bNQ	SEQ ID N°:1 (Combinado)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID N°:2 (Combinado)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°:3 (Combinado)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID N°:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID N°:3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID N°:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID N°:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID N°:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID N°:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID N°:35 (Combinado)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Combinado)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID N°:18 (Combinado)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:35 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID N°:70 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS

	SEQ ID N°:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID N°:71 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNQNTY
	SEQ ID N°:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID N°:17 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNQNTY
	SEQ ID N°:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID N°:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT

Tabla D. Secuencia de aminoácidos y secuencias de ácido nucleico de regiones variables mAb

Ab	SEQ ID N°	Cadena de IgG	Secuencia de aminoácido
milatuzumab	10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSS
	11	DNA VH	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT
	23	VL	DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLH WFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK
	24	DNA VL	GACATTCAGCTGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTTACACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGTAGA AGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGAAACGGCAACAC CTACCTGCACTGGTTCCAGCAGAGGCCTGGCCAGTC TCCTAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGAAGATTAGCAGAGTGGAA GCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCT AGCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGCCGGAACCAGA CTGGAAATCAAG
MiI_HC x hzVk1a	10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSS
	SEQ ID N°:11	DNA VH	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG

			GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT
	SEQ ID N°:27	VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLH WYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIK
	SEQ ID N°:28	DNA VL	GACATTGTGATGACACAGACCCCTCTGAGCCTGCCT GTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGA AGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGAAACGGCAACAC CTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTC TCCTCAGCTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAA GCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCT AGCCACGTGCCACCTACCTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAAATCAAG
Mil_HC x hzVk1b	SEQ ID N°:10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSS
	SEQ ID N°:11	DNA VH	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT
	SEQ ID N°:31	VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYL HWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIK
	SEQ ID N°:32	DNA VL	GATGTGGTTATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTGACACTTGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAGA TCTAGCCAGAGCCTGGTGCACAGAAACGGCAACACC TACCTGCACTGGTATCAGCAGAGGCCCGGACAGTCT CCCAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTG GCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTA GCCACGTGCCACCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAAATCAAG

HcmiI x LCmiI_NQ	SEQ ID N°:10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSS
	SEQ ID N°:11	DNA VH	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT	
	SEQ ID N°:36	VL	DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNQNTYLH WFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK
	SEQ ID N°:37	DNA VL	GACATTCAGCTGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTTACACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGTAGA AGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGAAACCAGAACAC CTACCTGCACTGGTTCCAGCAGAGGCCTGGCCAGTC TCCTAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGAAGATTAGCAGAGTGGAA GCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCT AGCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGCCGGAACCAGA CTGGAAATCAAG
VHmiI x VK1aNQ	SEQ ID N°:10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSS
	SEQ ID N°:11	DNA VH	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT
	SEQ ID N°:40	VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHRNQNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIK
	SEQ ID N°:41	DNA VL	GACATTGTGATGACACAGACCCCTCTGAGCCTGCCT GTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGA AGCAGCCAGAGCCTGGTGCACCGGAACCAGAATAC

			CTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTC TCCTCAGCTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAA GCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCT AGCCACGTGCCACCTACCTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAAATCAAG
VHmil x VK1bNQ	SEQ ID N°:10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSS
	SEQ ID N°:11	DNA VH	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT
	SEQ ID N°:44	VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNQNTYL HWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIK
	SEQ ID N°:45	DNA VL	GATGTGGTTATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTGACACTTGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAGA TCTAGCCAGAGCCTGGTGCACCGGAACCAGAACACA TACCTGCACTGGTATCAGCAGAGGCCCGGACAGTCT CCCAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTG GCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTA GCCACGTGCCACCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAAATCAAG

Tabla E. Secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de cadenas de IgG de mAb de longitud completa (todas las secuencias de cadena pesada incluyen mutaciones E152C y S375C para conjugación dirigida al sitio)

Ab	SEQ ID NO	Cadena de IgG	Secuencia de aminoácidos
milatuzumab	SEQ ID N°:12	Cadena pesada (Tipo salvaje Fc)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

			VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP CDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:13	Cadena pesada de ADN (Tipo salvaje Fc)	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT GCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCC GTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAG GGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAA TCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID N°:14	Cadena pesada (Fc Silenced DAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

			KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:15	Cadena pesada (Fc Silenced DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:25	Cadena liviana	DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLH WFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID N°:26	DNA Cadena liviana	GACATTCAGCTGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTTACACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGTAGA AGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGAAACGGCAACAC CTACCTGCACTGGTTCCAGCAGAGGCCTGGCCAGTC TCCTAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGAAGATTAGCAGAGTGGAA GCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCT AGCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGCCGGAACCAGA CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGT GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTC TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
MiI_HC x hzVk1a	SEQ ID N°:12	Cadena pesada	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL

		(Tipo salvaje Fc)	DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP CDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:13	Cadena pesada de ADN (Tipo salvaje Fc)	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT GCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCC GTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAG GGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAA TCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC

			GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID N°:14	Cadena pesada (DAPA Fc silenciada)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:15	Cadena pesada (Fc Silenced DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:29	Cadena liviana	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLH WYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID N°:30	DNA Cadena liviana	GACATTGTGATGACACAGACCCCTCTGAGCCTGCCT GTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGA AGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGAAACGGCAACAC CTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTC TCCTCAGCTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAA GCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCT AGCCACGTGCCACCTACCTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGT GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTC TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC

			TGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
MiI_HC x hzVk1b	SEQ ID N°:12	Cadena pesada (Tipo salvaje Fc)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP CDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:13	Cadena pesada de ADN (Tipo salvaje Fc)	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT GCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCC GTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAG GGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAA TCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT

			CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID N°:14	Cadena pesada (DAPA Fc silenciada)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:15	Cadena pesada (Fc Silenced DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:33	Cadena liviana	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYL HWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID N°:34	DNA Cadena liviana	GATGTGGTTATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTGACACTTGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAGA TCTAGCCAGAGCCTGGTGCACAGAAACGGCAACACC TACCTGCACTGGTATCAGCAGAGGCCCGGACAGTCT CCCAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTG GCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTA GCCACGTGCCACCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGT

			TCATCTTCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTG GCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCT ACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCT GAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
Hcmil x LCmil_NQ	SEQ ID N°:12	Cadena pesada (Tipo salvaje Fc)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP CDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:13	Cadena pesada de ADN (Tipo salvaje Fc)	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT GCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCC GTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAG GGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT

			GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAA TCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID N°:14	Cadena pesada (DAPA Fc silenciada)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:15	Cadena pesada (Fc Silenced DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:38	Cadena liviana	DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNQNTYLH WFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID N°:39	DNA Cadena liviana	GACATTCAGCTGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTTACACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGTAGA AGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGAAACCAGAACAC CTACCTGCACTGGTTCCAGCAGAGGCCTGGCCAGTC TCCTAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTC

			AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGAAGATTAGCAGAGTGGAA GCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCT AGCCACGTGCCACCTACCTTTGGCGCCGGAACCAGA CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGT GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTC TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
Vhmil x VK1aNQ	SEQ ID N°:12	Cadena pesada (Tipo salvaje Fc)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP CDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:13	Cadena pesada de ADN (Tipo salvaje Fc)	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT GCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCC GTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAG GGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA

			CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAA TCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID N°:14	Cadena pesada (DAPA Fc silenciada)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:15	Cadena pesada (Fc Silenced DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:42	Cadena liviana	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHRNQNTYL HWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

	SEQ ID N°:43	DNA Cadena liviana	GACATTGTGATGACACAGACCCCTCTGAGCCTGCCT GTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGA AGCAGCCAGAGCCTGGTGCACCGGAACCAGAATAC CTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTC TCCTCAGCTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTC AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCT GGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAA GCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCT AGCCACGTGCCACCTACCTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGT GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTC TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
Vhmil x VK1bNQ	SEQ ID N°:12	Cadena pesada (Tipo salvaje Fc)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP CDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:13	Cadena pesada de ADN (Tipo salvaje Fc)	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAA AAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCAACTACGGCGTGAACTGG ATCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATG GGCTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCACCTTC GACGACGATTTCAAGGGCAGATTCGCCTTCAGCCTG GACACCTCTGTGTCCACAGCCTACCTCCAGATCAGCA GCCTGAAGGCCGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCT CCAGAAGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTAGCTCT GCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCC GTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC

			CTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAG GGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAA TCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID N°:14	Cadena pesada (DAPA Fc silenciada)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID N°:15	Cadena pesada (Fc Silenced DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWI KQAPGQGLQWMGWINPNTGEPTFDDDFKGRFAFSL DTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

	SEQ ID N°:46	Cadena liviana	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNQNTYL HWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID N°:47	DNA Cadena liviana	GATGTGGTTATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCT GTGACACTTGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAGA TCTAGCCAGAGCCTGGTGCACCGGAACCAGAACACA TACCTGCACTGGTATCAGCAGAGGCCCGGACAGTCT CCCAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGATTCA GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTG GCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTA GCCACGTGCCACCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGT TCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTG GCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCT ACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCT GAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCAC CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC

[199] En algunas formas de realización, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de un ADC descrito en la presente puede comprender cualquier conjunto de dominios variables de las cadenas pesada y liviana enumerados en las tablas anteriores o un conjunto de seis CDR de cualquier conjunto de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana enumerados en las tablas anteriores. En algunas formas de realización, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de un ADC descrito en la presente puede comprender secuencias de aminoácidos que se modifican de forma conservadora y/o son homólogas de las secuencias enumeradas en las tablas anteriores, siempre que el ADC conserve la capacidad para unirse a su antígeno de cáncer blanco (por ejemplo, con una K_D de menos de $1 \times 10_{-8}$ M) y conserve una o más propiedades funcionales de los ADC que se divulgan en la presente (por ejemplo, capacidad de internalización, unión a un antígeno blanco, por ejemplo, un antígeno expresado en un tumor o en otra célula cancerosa, etc.).

[200] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de un ADC divulgado en la presente comprende además dominios constantes de las cadenas pesada y liviana humanos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los ADC descritos puede comprender un dominio constante de la cadena pesada de la IgG humana (tal como una IgG1) y un dominio constante de la

cadena liviana kappa o lambda humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los ADC descritos comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina G subtipo 1 (IgG1) humana con un dominio constante de la cadena liviana kappa de la Ig humana.

[201] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena liviana de la siguiente manera: CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que consiste en SEQ ID Nº: 1, CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que consiste en la SEQ ID Nº: 2, CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que consiste en la SEQ ID Nº: 3; CDR1 de la cadena liviana (LCDR1) que consiste en la SEQ ID Nº: 16, CDR2 de la cadena liviana (LCDR2) que consiste en la SEQ ID Nº: 70 y CDR3 de la cadena liviana (LCDR3) que consiste en la SEQ ID Nº: 18.

[202] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena liviana de la siguiente manera: CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 4, CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 2, CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 3; CDR1 de la cadena liviana (LCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 16, CDR2 de la cadena liviana (LCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 70 y CDR3 de la cadena liviana (LCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 18.

[203] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena liviana de la siguiente manera: CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 5, CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 6, CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 3; CDR1 de la cadena liviana (LCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 19, CDR2 de la cadena liviana (LCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 20 y CDR3 de la cadena liviana (LCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 21.

[204] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena liviana de la siguiente manera: CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 7, CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 8, CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 9; CDR1 de la cadena liviana (LCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 22, CDR2 de la cadena liviana (LCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 20 y CDR3 de la cadena liviana (LCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 18.

[205] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena liviana de la siguiente manera: CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 1, CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 2, CDR3 de la

cadena pesada (HCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 3; CDR1 de la cadena liviana (LCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 35, CDR2 de la cadena liviana (LCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 70 y CDR3 de la cadena liviana (LCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 18.

[206] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena liviana de la siguiente manera: CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 4, CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 2, CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 3; CDR1 de la cadena liviana (LCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 35, CDR2 de la cadena liviana (LCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 70 y CDR3 de la cadena liviana (LCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 18.

[207] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena liviana de la siguiente manera: CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 5, CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 6, CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 3; CDR1 de la cadena liviana (LCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 71, CDR2 de la cadena liviana (LCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 20 y CDR3 de la cadena liviana (LCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 21. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de la cadena pesada y tres CDR de la cadena liviana de la siguiente manera: CDR1 de la cadena pesada (HCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 7, CDR2 de la cadena pesada (HCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 8, CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 9; CDR1 de la cadena liviana (LCDR1) que consiste en la SEQ ID N°: 17, CDR2 de la cadena liviana (LCDR2) que consiste en la SEQ ID N°: 20 y CDR3 de la cadena liviana (LCDR3) que consiste en la SEQ ID N°: 18.

[208] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 23. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 10 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 23, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 10 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena

liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 23.

[209] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 27. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 10 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 27, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 10 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 27.

[210] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 31. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 10 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 31, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 10 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 31.

[211] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 36. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la SEQ

ID N°: 10 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 36, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 10 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 36.

[212] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº: 1, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 2. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti- CD74 o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID Nº: 10 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de la SEQ ID Nº: 40, o secuencias que son por lo menos un 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti- CD74 o el fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID Nº: 10 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID Nº: 40.

[213] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 44. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 10 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 44, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 o un fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 10 y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 44.

[214] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 25 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 25. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 25, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 12 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 25. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 es milatuzumab (véase, Patente de los EE.UU. N°. 7931903), o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 25 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 25. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 25, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 14 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 25.

[215] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 25 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 25. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 25, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 25.

[216] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 29 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 29. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 29, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 12 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 29.

[217] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 29 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 29. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 29, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 14 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 29.

[218] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 29 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 29. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 29, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 29.

[219] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 33 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 33. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 33, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 12 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 33.

[220] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 33 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 33. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 33, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 14 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 33.

[221] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 33 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 33. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 33, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 33.

[222] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 38 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 38. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 38, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 12 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 38.

[223] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID Nº:14 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID Nº:14, y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID Nº:38 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID Nº:38. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID Nº:14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID Nº:38, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias descritas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID Nº:14 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera secuencia que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID Nº:38.

[224] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID Nº:15 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID Nº:15, y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID Nº:38 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID Nº:38. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID Nº:15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID Nº:38, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias descritas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID Nº:15 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera secuencia que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID Nº:38.

[225] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID Nº:12 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID Nº:12, y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID Nº:42 o una secuencia que es por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID Nº:42. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID Nº:12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID Nº:42, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias descritas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID Nº:12 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera secuencia que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID Nº:42.

[226] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 42 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 42. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 42, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 14 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 42.

[227] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 42 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 42. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 42, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 42.

[228] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 46 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 46. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 12 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 46, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 12 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 46.

[229] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 46 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 46. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 14 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 46, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 14 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 46.

[230] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 46 o una secuencia que es por lo menos 95% idénticas a la SEQ ID N°: 46. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 46, o secuencias que son por lo menos 95% idénticas a las secuencias divulgadas. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD74 tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 15 y una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la SEQ ID N°: 46.

[231] Se dice que los residuos en dos o más polipéptidos "se corresponden" si los residuos ocupan una posición análoga en las estructuras de dichos polipéptidos. Las posiciones análogas en dos o más polipéptidos se pueden determinar alineando las secuencias de polipéptidos en base a la secuencia de aminoácidos o a similitudes estructurales. Los especialistas en el arte comprenderán que puede ser necesario introducir espacios en cualquier secuencia para producir un alineamiento satisfactorio.

[232] En algunas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos son de residuos individuales. Las inserciones generalmente serán del orden de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, aunque se pueden tolerar inserciones considerablemente mayores siempre que se conserve la función biológica (por ejemplo, la unión a un antígeno blanco). En general, las supresiones varían entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, aunque en algunos casos las supresiones pueden ser mucho mayores. Las sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden usar para obtener un derivado o variante final. Generalmente, estos cambios se realizan en algunos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, en particular la inmunogenicidad y la especificidad de la proteína de unión al antígeno. Sin embargo, se pueden tolerar cambios mayores en ciertas circunstancias. Se pueden hacer sustituciones conservadoras de acuerdo con el siguiente cuadro representado en la Tabla 1.

Tabla 1

Residuo original	Ejemplos de sustituciones
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr

Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[233] En algunas formas de realización en los cuales se usan variantes de secuencias de anticuerpos en un ADC, dichas variantes típicamente presentan la misma actividad biológica cualitativa y provocarán la misma respuesta inmunológica, aunque las variantes también se pueden seleccionar para modificar las características de las proteínas de unión al antígeno según necesidad. Como alternativa, la variante se puede diseñar para alterar la actividad biológica de la proteína de unión al antígeno. Por ejemplo, se pueden alterar o eliminar los sitios de glicosilación.

[234] Los inmunoconjugados de la invención pueden comprender anticuerpos modificados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que además comprenden modificaciones en residuos del marco dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. En algunas formas de realización, las modificaciones del marco se efectúan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque comprende "retromutar" uno o más residuos del marco a la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia de línea germinal de la cual deriva el anticuerpo. Estos residuos se pueden identificar por comparación de las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las cuales deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región de marco de trabajo a su configuración de línea germinal, es posible "retromutar" las mutaciones somáticas a la secuencia de línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio**.** Se considera que la invención también abarca dichos anticuerpos "retromutados".

[235] Otro tipo de modificación del marco comprende mutar uno o más residuos dentro de la región del marco, o aún dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epitopes de células T y así reducir la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con mayor detalle en la publicación de Patente de los EEUU N°: 20030153043 de Carr et al.

[236] Además, o como alternativa, de las modificaciones efectuadas dentro de las regiones de marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser manipulados para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno (ADCC). Asimismo, se puede modificar químicamente un anticuerpo de la invención (por ejemplo, se puede unir uno o más

grupos químicos al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, nuevamente con el fin de alterar una o más propiedades funcionales de dicho anticuerpo. Cada una de estas formas de realización se describirá a continuación con mayor detalle.

[237] En una forma de realización, se modifica la región de bisagra de CH1 de manera tal que se altera la cantidad de residuos cisteína en la región de bisagra, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque también se describe en la Patente de los EEUU N°: 5.677.425 de Bodmer et al. Se altera la cantidad de residuos cisteína en la región de bisagra de CH1, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas liviana y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

[238] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo divulgado en la presente incluyen residuos de aminoácidos modificados o manipulados, por ejemplo, uno o más residuos de cisteína, como sitios para la conjugación a una unidad de fármaco (Junutula JR, *et al.*, *Nat Biotechnol* 2008, 26: 925-932). En una forma de realización, la invención provee un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado que comprende una sustitución de uno o más aminoácidos por cisteína en las posiciones que se describen en la presente. Los sitios para la sustitución por cisteína se encuentran en las regiones constantes del anticuerpo o fragmento de anticuerpo y por lo tanto son aplicables a una variedad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y los sitios se seleccionan para proporcionar conjugados estables y homogéneos. Un anticuerpo o fragmento modificado puede comprender una, dos o más sustituciones por cisteína, y estas sustituciones se pueden usar en combinación con otros métodos de modificación y conjugación como se describe en la presente. Los métodos para insertar una cisteína en una ubicación específica de un anticuerpo son conocidos en el arte, véase, por ejemplo, Lyons *et al.*, (1990) *Protein Eng*., 3: 703-708, WO 2011/005481, WO2014/124316, WO 2015/138615. En determinadas formas de realización, un anticuerpo modificado comprende una sustitución de uno o más aminoácidos por cisteína en su región constante seleccionada entre las posiciones 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 191, 195, 197, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 y 422 de una cadena pesada del anticuerpo, y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU. En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado comprende una sustitución de uno o más aminoácidos por cisteína en su región constante seleccionada entre las posiciones 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199, y 203 de una cadena liviana del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU, y en donde la cadena liviana es una cadena liviana kappa humana. En determinadas formas de realización un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado del mismo comprende una

combinación de una sustitución de dos o más aminoácidos por cisteína en sus regiones constantes, en donde dichas combinaciones comprenden sustituciones en las posiciones 375 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 152 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo o la posición 107 de una cadena liviana de anticuerpo y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU. En determinadas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado del mismo comprende la sustitución de uno aminoácido por cisteína en sus regiones constantes, en donde la sustitución es en la posición 375 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 152 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 107 de una cadena liviana de anticuerpo, la posición 165 de una cadena liviana de anticuerpo o la posición 159 de una cadena liviana de anticuerpo y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa. En formas de realización particulares, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado del mismo comprende una combinación de la sustitución de dos aminoácidos por cisteína en sus regiones constantes, en donde dichas combinaciones comprenden sustituciones en las posiciones 375 de una cadena pesada de anticuerpo y la posición 152 de una cadena pesada de anticuerpo, donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU. En formas de realización particulares, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado del mismo comprende la sustitución de un aminoácido por cisteína en la posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo, en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU. En otras formas de realización particulares, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado del mismo comprende una sustitución de un aminoácido por cisteína en la posición 107 de una cadena liviana de anticuerpo y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema EU, y donde la cadena liviana es una cadena kappa.

[239] En formas de realización adicionales, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno) de utilidad en los inmunoconjugados de la invención incluyen anticuerpos modificados o manipulados, tal como un anticuerpo modificado para introducir uno o más aminoácidos reactivos adicionales (distinto de cisteína), que incluyen Pcl, pirrolisina, marcas peptídicas (tales como marcas S6, A1 y ybbR) y aminoácidos no naturales, en lugar de por lo menos un aminoácido de la secuencia nativa, para así proporcionar un sitio reactivo en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para la conjugación a una unidad de fármaco o a una unidad de conector-fármaco con una reactividad complementaria. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden modificar para incorporar Pcl o pirrolisina (W. Ou, *et al.*, (2011) *PNAS* 108 (26), 10437-10442; WO2014124258) o aminoácidos no naturales (J.Y. Axup, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (2012), páginas 16101–16106; por una revisión, véase C.C. Liu y P.G. Schultz

(2010) *Annu Rev Biochem* 79, 413-444; C.H. Kim, *et al.*, (2013) *Curr Opin Chem Biol*.; 17, 412-419) como sitios para la conjugación a un fármaco. De manera similar, en el anticuerpo se pueden introducir marcas de péptido para los métodos de conjugación enzimáticos (Strop P., *et al.*, *Chem Biol*., 2013, 20(2): 161-7; Rabuka D., *Curr Opin Chem Biol*., diciembre de 2010; 14(6): 790-6; Rabuka D, *et al.*, *Nat Protoc*., 2012, 7(6): 1052-67). Un ejemplo adicional es el uso de 4'-fosfopanteteinilo transferasas (PPTasa) para la conjugación de análogos de la Co-enzima A (WO2013184514), y (Grünewald *et al., (*2015*) Bioconjugate Chem*., 26 (12), 2554-62). Los métodos para conjugar dichos anticuerpos modificados o manipulados con cargas útiles o con combinaciones de conector-carga útil son conocidos en el arte.

[240] En otra forma de realización, se muta la región de bisagra Fc de un anticuerpo para disminuir la vida media biológica de dicho anticuerpo. Más específicamente, se introduce una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento de Fc-bisagra de modo tal que el anticuerpo presenta una unión dañada a la proteína A de *Staphylococcus* (SpA) con relación a la unión al SpA del dominio Fc-bisagra nativo. Este enfoque se describe con mayor detalle en la Patente de los EEUU N°: 6.165.745 de Ward et al.

[241] En aún otras formas de realización, la región Fc se altera por reemplazo de por lo menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar una o más funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se puede reemplazar uno o más aminoácidos por un residuo de aminoácido diferente de manera tal que el anticuerpo tendrá una afinidad alterada por un ligando efector pero retiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector por el que fue alterada la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente de complemento C1. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de los EEUU N°: 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

[242] En otra forma de realización, se puede reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados entre residuos de aminoácidos por un residuo de aminoácido diferente de modo tal que el anticuerpo tendrá una unión C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento reducida o suprimida (CDC). Este enfoque se describe, por ejemplo, en la Patente de los EEUU N°: 6.194.551, ambas de Idusogie et al.

[243] En otra forma de realización, se altera uno o más residuos de aminoácidos para así alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.* Los residuos de aminoácidos alotípicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, la región constante de una cadena pesada de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3, así como una región constante de una cadena liviana del isotipo kappa como se describe en Jefferis *et al.*, *MAbs*., 1: 332-338 (2009).

[244] En algunas formas de realización, los anticuerpos comprenden mutaciones que

intervienen en una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o ausente. En algunas formas de realización, estas mutaciones se conocen como mutaciones Fc de silenciamiento, Fc silente o Fc silenciado. En algunas formas de realización, los residuos de aminoácidos L234 y L235 de la región constante IgG1 se sustituyen por A234 y A235 (también conocida como “LALA”). En algunas formas de realización, el residuo de aminoácido N297 de la región constante IgG1 está sustituido por A297 (también conocida como “N297A”). En algunas formas de realización, los residuos de aminoácidos D265 y P329 de la región constante IgG1 están sustituidos por A265 y A329 (también conocido como “DAPA”). También se pueden usar otras mutaciones con Fc de silenciamiento de anticuerpos. En algunas formas de realización, las mutaciones Fc de silenciamiento se usan en una combinación, por ejemplo D265A, N297A y P329A (también conocida como “DANAPA”).

[245] En otra forma de realización, se altera uno o más residuos de aminoácidos para así alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.* En una forma de realización específica, se reemplaza uno o más aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención por uno o más residuos de aminoácidos alotípicos. Los residuos de aminoácidos alotípicos también incluyen, pero en un sentido no taxativo, la región constante de la cadena pesada de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3, así como la región constante de la cadena liviana del isotipo kappa como se describe en Jefferis *et al.*, *MAbs*., 1: 332-338 (2009).

[246] En aún otra forma de realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo. Por ejemplo, es posible generar un anticuerpo no glicosilado (o aglicosilado) (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo por el “antígeno”. Dichas modificaciones del hidrato de carbono se pueden obtener, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en el marco de la región variable, para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Un enfoque tal se describe, por ejemplo, en las Patentes de los EEUU N°: 5.714.350 y 6.350.861, ambas de Co et al.

[247] En otra forma de realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, se puede introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de los EEUU N°: 6.277.375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la vida media biológica, se

puede alterar el anticuerpo en la región CH1 o CL para que contenga un epitope de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de los EEUU N°: 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

Conectores

[248] En algunas formas de realización, el conector en un ADC es suficientemente estable a nivel extracelular como para que sea terapéuticamente eficaz. En algunas formas de realización, el conector es estable fuera de una célula, de modo que el ADC permanece intacto cuando está presente en condiciones extracelulares (por ejemplo, antes de su transporte o administración a una célula). El término "intacto", utilizado en el contexto de un ADC, significa que el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno permanece unido al resto del fármaco (por ejemplo, el inhibidor Mcl-1).

[249] Según se usa en la presente, "estable", en el contexto de un conector o ADC que comprende un conector, significa que no más del 20%, no más del 15%, no más del 10%, no más del 5 %, no más de aproximadamente el 3% o no más de aproximadamente el 1% de los conectores (o cualquier porcentaje intermedio) en una muestra de ADC son escindidos (o en el caso de un ADC general no están intactos) cuando el ADC está presente en condiciones extracelulares. En algunas formas de realización, los conectores y/o ADC divulgados en la presente son estables en comparación con los conectores alternativos y/o ADC con conectores alternativos y/o cargas útiles del inhibidor Mcl-1. En algunas formas de realización, los ADC que se divulgan en la presente pueden permanecer intactos durante más de aproximadamente 48 horas, más de 60 horas, más de aproximadamente 72 horas, más de aproximadamente 84 horas o más de aproximadamente 96 horas.

[250] Se puede determinar si un conector es estable extracelularmente, por ejemplo, mediante la inclusión de un ADC en plasma por un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 16, 24, 48 ó 72 horas) y luego cuantificar la cantidad de unidades de fármaco libre presentes en el plasma. La estabilidad puede conferir el tiempo para que el ADC localice las células cancerosas y evitar la liberación prematura de la unidad de fármaco, lo cual podría reducir el índice terapéutico del ADC al dañar a los tejidos normales como cancerosos de manera indiscriminada. En algunas formas de realización, el conector es estable fuera de una célula blanco y libera la unidad de fármaco desde el ADC una vez que se encuentra dentro de la célula, para que así el fármaco se pueda unir a su blanco. Por lo tanto, un conector eficaz: (i) puede mantener las propiedades de unión específicas del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno; (ii) permitirá la administración, por ejemplo, la administración intracelular, de la unidad de fármaco mediante una unión estable al anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno; (iii) permanecerá estable e intacto hasta que el ADC haya sido transportado o administrado en su sitio blanco; y (iv) permitirá un efecto

terapéutico, por ejemplo, un efecto citotóxico, de la unidad de fármaco después de la escisión o de un mecanismo de liberación alternativo.

[251] Los conectores pueden afectar las propiedades fisicoquímicas de un ADC. Dado que muchos agentes citotóxicos son de naturaleza hidrofóbica, la unión del anticuerpo con una unidad hidrofóbica adicional puede conducir a una agregación. Los agregados de ADC son insolubles y a menudo limitan la carga de fármaco sobre el anticuerpo, lo que puede afectar negativamente la potencia del ADC. En general, los agregados proteicos de productos biológicos también se han relacionado con una mayor inmunogenicidad. Según se muestra a continuación, los conectores divulgados en la presente dan como resultado ADC con bajos niveles de agregación y niveles deseables de cargas de fármaco.

[252] Un conector puede ser "escindible" o "no escindible" (Ducry y Stump (2010) *Bioconjugate Chem*. 21: 5-13). Los conectores escindibles están diseñados para liberar la unidad de fármaco (por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1) cuando son sometidos a determinados factores ambientales, por ejemplo, cuando se internalizan en la célula blanco, en tanto los conectores no escindibles generalmente dependen de la degradación del propio anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

[253] El término "alquilo", según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene una insaturación. El término "C_1-C_6alquilo", según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que solo consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene una insaturación, que tiene entre uno y seis átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace simple. Los ejemplos no taxativos de grupos de "C_1-C_6alquilo" incluyen metilo (un C_1alquilo), etilo (un C_2alquilo), 1-metiletilo (un C_3alquilo), n-propilo (un C_3alquilo), isopropilo (un C_3alquilo), n-butilo (un C_4alquilo), isobutilo (un C_4alquilo), sec-butilo (un C_4alquilo), ter-butilo (un C_4alquilo), n-pentilo (un C_5alquilo), isopentilo (un C_5alquilo), neopentilo (un C_5alquilo) y hexilo (un C_6alquilo).

[254] El término “alquenilo”, según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene por lo menos un enlace doble. El término “C_2-C_6alquenilo”, según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene por lo menos un enlace doble, que tiene entre dos y seis átomos de carbono, que está unido al resto de la molécula mediante un enlace simple. Los ejemplos no taxativos de grupos "C_2-C_6alquenilo” incluyen etenilo (un C_2alquenilo), prop-1-enilo (un C_3alquenilo), but-1-enilo (un C_4alquenilo), pent-1-enilo (un C_5alquenilo), pent-4-enilo (un C_5alquenilo), penta-1,4-dienilo (un

C_5alquenilo), hexa-1-enilo (un C_6alquenilo), hexa-2-enilo (un C_6alquenilo), hexa-3-enilo (un C_6alquenilo), hexa-1-,4-dienilo (un C_6alquenilo), hexa-1-,5-dienilo (un C_6alquenilo) y hexa-2-,4-dienilo (un C_6alquenilo). El término "C_2-C_3alquenilo", según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene por lo menos un enlace doble, que tiene entre dos y tres átomos de carbono, que está unido al resto de la molécula mediante un enlace simple. Los ejemplos no taxativos de grupos "C_2-C_3alquenilo" incluyen etenilo (un C_2alquenilo) y prop-1-enilo (un C_3alquenilo).

[255] El término "alquileno", según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado bivalente de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno y que no contiene una insaturación. El término "C_1-C_6alquileno", según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado bivalente de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene una insaturación, que tiene entre uno y seis átomos de carbono. Los ejemplos no taxativos de grupos "C_1-C_6alquileno" incluyen metileno (un C_1alquileno), etileno (un C_2alquileno), 1-metiletileno (un C_3alquileno), n-propileno (un C_3alquileno), isopropileno (un C_3alquileno), n-butileno (un C_4alquileno), isobutileno (un C_4alquileno), sec-butileno (un C_4alquileno), ter-butileno (un C_4alquileno), n-pentileno (un C_5alquileno), isopentileno (un C_5alquileno), neopentileno (un C_5alquileno) y hexileno (un C_6alquileno).

[256] El término "alquenileno", según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado bivalente de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno y que contiene por lo menos un enlace doble. El término "C_2-C_6alquenileno", según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado bivalente de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene por lo menos un enlace doble, y que tiene entre dos y seis átomos de carbono. Los ejemplos no taxativos de grupos "C_2-C_6alquenileno" incluyen etenileno (un C_2alquenileno), prop-1-enileno (un C_3alquenileno), but-1-enileno (un C_4alquenileno), pent-1-enileno (un C_5alquenileno), pent-4-enileno (un C_5alquenileno), penta-1,4-dienileno (un C_5alquenileno), hexa-1-enileno (un C_6alquenileno), hexa-2-enileno (un C_6alquenileno), hexa-3-enileno (un C_6alquenileno), hexa-1-,4-dienileno (un C_6alquenileno), hexa-1-,5-dienileno (un C_6alquenileno) y hexa-2-,4-dienileno (un C_6alquenileno). El término "C_2-C_6alquenileno", según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarbonado bivalente de cadena lineal o ramificada que solamente consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene por lo menos un enlace doble, y que tiene entre dos y tres átomos de carbono. Los ejemplos no taxativos de grupos "C_2-C_3alquenileno" incluyen etenileno (un C_2alquenileno) y prop-1-enileno (un C_3alquenileno).

[257] El término “cicloalquilo”, o “C_3-C_8cicloalquilo”, según se usa en la presente, se refiere a un sistema de anillos saturado, monocíclico, bicíclico fusionado, tricíclico fusionado policíclico con puente. Los ejemplos no taxativos de sistemas de anillos bicíclico fusionado o policíclico con puente incluyen biciclo[1.1.1]pentano, biciclo[2.1.1]hexano, biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[3.1.1]heptano, biciclo[3.2.1]octano, biciclo[2.2.2]octano y adamantanilo. Los ejemplos no taxativos de grupos C_3-C_8cicloalquilo monocíclicos incluyen grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

[258] El término “haloalquilo”, según se usa en la presente, se refiere a un alquilo de cadena lineal o ramificada sustituido con uno o más grupos halógeno en lugar de hidrógenos a lo largo de la cadena hidrocarbonada. Los ejemplos de grupos halógeno adecuados para una sustitución en el grupo haloalquilo incluyen flúor, bromo, cloro e iodo. Los grupos haloalquilo pueden incluir la sustitución con múltiples grupos halógeno en lugar de los hidrógenos en la cadena de alquilo, en donde dichos grupos halógeno se pueden unir al mismo carbono o a otro carbono en la cadena de alquilo.

[259] Según se usa en la presente, los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, amino, arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo se pueden sustituir opcionalmente con 1 a 4 grupos seleccionados entre (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado opcionalmente sustituido, (C_1-C_6)alquil-S - opcionalmente sustituido, hidroxi, oxo (o N-óxido si fuera apropiado), nitro, ciano, -C(O)-OR_0', -O-C(O)-R_0', -C(O)-NR_0'R_0'', -NR_0'R_0'', -(C=NR_0')-OR_0'', (C_1-C_6) haloalquilo lineal o ramificado, trifluorometoxi o halógeno, en donde R_0' y R_0'' son cada uno de manera independiente un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, y en donde uno o más de los átomos de carbono del grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado está opcionalmente deuterado.

[260] El término “polioxietileno”, “polietilenglicol” o “PEG”, según se usa en la presente, se refiere a una cadena lineal, una cadena ramificada o una configuración con forma estrellada compuesta por grupos (OCH_2CH_2). En determinadas formas de realización, un grupo polietileno o PEG es -$(OCH_2CH_2)_t$*-, donde t es 4-40, y donde “-” indica el extremo dirigido hacia el espaciador autoescindible y “*-” indica el punto de unión a un grupo R’ extremo terminal, donde R’ es OH, OCH_3 o $OCH_2CH_2C(=O)OH$. En otras formas de realización, un grupo polietileno o PEG es -$(CH_2CH_2O)_t$*-, donde t es 4-40, y donde “-” indica el extremo dirigido hacia el espaciador autoescindible y “*-” indica el punto de unión a un grupo R’’ extremo terminal donde R’’ es H, CH_3 o $CH_2CH_2C(=O)OH$. Por ejemplo, el término “PEG12” según se usa en la presente significa que t es 12.

[261] El término “polialquilenglicol”, según se usa en la presente, se refiere a una cadena

lineal, una cadena ramificada o una configuración con forma de estrella compuesta por grupos $(O(CH_2)_m)_n$. En determinadas formas de realización, un grupo polietileno o PEG es -$(O(CH_2)_m)_t$*-, donde m es 1-10, t es 4-40 y donde "-" indica el extremo dirigido al espaciador autoescindible y "*-" indica el punto de unión a un grupo R' extremo terminal donde R' es OH, OCH_3 o $OCH_2CH_2C(=O)OH$. En otras formas de realización, un grupo polietileno o PEG es -$((CH_2)_mO)_t$*-, donde m es 1-10, t es 4-40 y donde "-" indica el extremo dirigido hacia el espaciador autoescindible y "*-" indica el punto de unión a un grupo R' extremo terminal' donde R'' es H, CH_3 o $CH_2CH_2C(=O)OH$.

[262] El término "grupo reactivo", según se usa en la presente, es un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente con un grupo funcional de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo u otro grupo reactivo unido a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los ejemplos no taxativos de dichos grupos funcionales incluyen los grupos reactivos de la Tabla 8 provistos en la presente.

[263] El término "grupo de unión" o "grupo de acoplamiento", según se usa en la presente, se refiere a una unidad bivalente que une el espaciador formador de puentes al anticuerpo o un fragmento del mismo. El grupo de unión o de acoplamiento es una unidad bivalente formada por la reacción entre un grupo reactivo y un grupo funcional sobre el anticuerpo o fragmento del mismos. Los ejemplos no taxativos de dichas unidades bivalentes incluyen las unidades químicas bivalentes indicadas en la Tabla 8 y la Tabla 9 provistas en la presente.

[264] El término "espaciador formador de puentes", según se usa en la presente, se refiere a uno o más componentes conectores que están unidos covalentemente entre sí para formar una unidad bivalente que une el espaciador peptídico bivalente al grupo reactivo, une el espaciador peptídico bivalente al grupo de acoplamiento o une el grupo de unión a dicho por lo menos un grupo escindible. En determinadas formas de realización, el "espaciador formador de puentes" comprende un grupo carboxilo unido al extremo N-terminal del espaciador peptídico bivalente por medio de un enlace amida.

[265] El término "unidad espaciadora", según se usa en la presente, se refiere a uno o más componentes conectores que están unidos covalentemente entre sí para formar una unidad que une el espaciador autoescindible a la unidad hidrofílica.

[266] El término "espaciador peptídico bivalente", según se usa en la presente, se refiere a un conector bivalente que comprende uno o más residuos de aminoácidos unidos de manera covalente entre sí para formar una unidad que une el espaciador formador de puentes al espaciador autoescindible. Dichos uno o más residuos de aminoácidos pueden comprender residuos de aminoácidos seleccionados entre alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln),

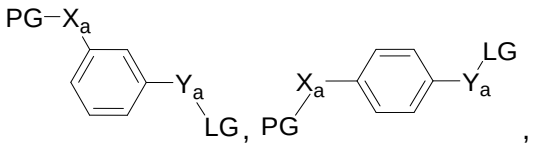
arginina (Arg), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptofano (Trp), tirosina (Tyr), citrulina (Cit), norvalina (Nva), norleucina (Nle), selenocisteína (Sec), pirrolisina (Pilo), homoserina, homocisteína y desmetilpirrolisina.

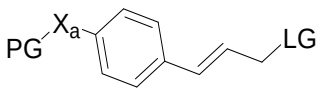
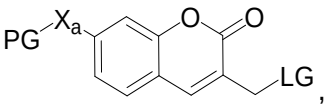
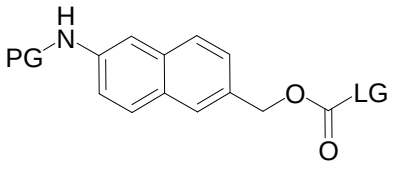
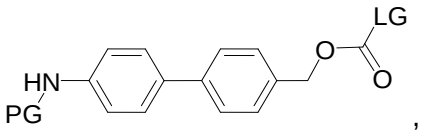
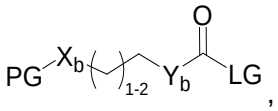
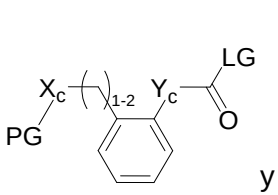
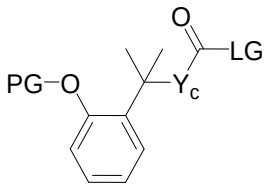
[267] En determinadas formas de realización un “espaciador peptídico bivalente” es una combinación de 2 a cuatro residuos de aminoácidos, donde cada residuo se selecciona de manera independiente entre un residuo de un aminoácido seleccionado entre alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), lisina (Lys), leucina (Leu),metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), arginina (Arg), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptofano (Trp), tirosina (Tyr), citrulina (Cit), norvalina (Nva), norleucina (Nle), selenocisteína (Sec), pirrolisina (Pilo), homoserina, homocisteína y desmetilpirrolisina, por ejemplo -ValCit*; -CitVal*; -AlaAla*; -AlaCit*; -CitAla*; -AsnCit*; -CitAsn*; -CitCit*; -ValGlu*; -GluVal*; -SerCit*; -CitSer*; -LysCit*; -CitLys*; -AspCit*; -CitAsp*; -AlaVal*; -ValAla*; -PheAla*; -AlaPhe*; -PheLys*; -LysPhe*; -ValLys*; -LysVal*; -AlaLys*; -LysAla*; -PheCit*; -CitPhe*; -LeuCit*; -CitLeu*; -IleCit*; -CitIle*; -PheArg*; -ArgPhe*; -CitTrp*; -TrpCit*; -PhePheLys*; -LysPhePhe*; -DPhePheLys*; -DLysPhePhe*; -GlyPheLys*; -LysPheGly*; -GlyPheLeuGly- [SEQ ID N°: 69]; -GlyLeuPheGly- [SEQ ID N°: 64]; -AlaLeuAlaLeu- [SEQ ID N°: 65], -GlyGlyGly*; -GlyGlyGlyGly- [SEQ ID N°: 66]; -GlyPheValGly- [SEQ ID N°: 67]; y –GlyValPheGly- [SEQ ID N°: 68], donde “-“ indica el punto de unión al espaciador formador de puentes y “*” indica el punto de unión al espaciador autoescindible.

[268] El término “componente conector”, según se usa en la presente, se refiere a una unidad química que forma parte del conector. Los ejemplos de componentes conectores incluyen: un grupo alquileno: $-(CH_2)_n-$ que puede ser lineal o ramificado (donde en este caso n es 1-18); un grupo alquenileno; un grupo alquinileno; un grupo alquenilo; un grupo alquinilo; una unidad de etilenglicol: $-OCH_2CH_2-$ o $-CH_2CH_2O-$; una unidad de polietilenglicol: $(-CH_2CH_2O-)_x$ (donde en este caso x es 2-20); -O-; -S-; un carbonilo: -C(=O); un éster: C(=O)-O o O-C(=O); un carbonato: -OC(=O)O-; una amina: -NH-; una amina terciaria; una amida: -C(=O)-NH-, -NH-C(=O)- o –C(=O)N(C_{1-6}alquilo); un carbamato: -OC(=O)NH- o –NHC(=O)O; una urea: -NHC(=O)NH; una sulfonamida: $-S(O)_2NH-$ o $-NHS(O)_2$; un éter: $-CH_2O-$ o $–OCH_2-$; un alquileno sustituido con uno o más grupos seleccionados de manera independiente entre carboxilo, sulfonato, hidroxilo, amina, aminoácidos, sacáridos, fosfato y fosfonato); un alquenileno sustituido con uno o más grupos seleccionados de manera independiente entre carboxilo, sulfonato, hidroxilo, amina, aminoácidos, sacáridos, fosfato y fosfonato); un alquinileno sustituido con uno o más grupos seleccionados de manera independiente entre carboxilo, sulfonato, hidroxilo, amina, aminoácidos, sacáridos, fosfato y fosfonato); un C_1-C_{10}alquileno en donde se reemplaza uno o más grupos metileno por una o más unidades –S-, -NH- o -O-; sistemas de anillos que tienen dos puntos de unión disponibles tal como un

anillo divalente seleccionado entre fenilo (incluyendo 1,2- 1,3- y 1,4- difenilo sustituido), un C_5-C_6 heteroarilo, un C_3-C_8 cicloalquilo (incluyendo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo 1,1-disustituido, y ciclohexilo 1,4-disustituido), y un C_4-C_8 heterocicloalquilo; un residuo de un aminoácido seleccionado entre alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), lisina (Lys), leucina (Leu),metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), arginina (Arg), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptofano (Trp), tirosina (Tyr), citrulina (Cit), norvalina (Nva), norleucina (Nle), selenocisteína (Sec), pirrolisina (Pilo), homoserina, homocisteína y desmetilpirrolisina; una combinación de 2 o más residuos de aminoácidos, donde cada residuo se selecciona de manera independiente entre un residuo de un aminoácido seleccionado entre alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), lisina (Lys), leucina (Leu),metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), arginina (Arg), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptofano (Trp), tirosina (Tyr), citrulina (Cit), norvalina (Nva), norleucina (Nle), selenocisteína (Sec), pirrolisina (Pilo), homoserina, homocisteína y desmetilpirrolisina, por ejemplo Val-Cit; Cit-Val; Ala-Ala; Ala-Cit; Cit-Ala; Asn-Cit; Cit-Asn; Cit-Cit; Val-Glu; Glu-Val; Ser-Cit; Cit-Ser; Lys-Cit; Cit-Lys; Asp-Cit; Cit-Asp; Ala-Val; Val-Ala; Phe-Lys; Lys-Phe; Val-Lys; Lys-Val; Ala-Lys; Lys-Ala; Phe-Cit; Cit-Phe; Leu-Cit; Cit-Leu; Ile-Cit; Cit-Ile; Phe-Arg; Arg-Phe; Cit-Trp; y Trp-Cit; y un espaciador autoescindible, en donde el espaciador autoescindible comprende uno o más grupos protectores (iniciadores) que son susceptible de escisión inducida por ácido, escisión inducida por peptidasas, escisión inducida por esterasas, escisión inducida por glicosidasas, escisión inducida por fosfodiesterasas, escisión inducida por fosfatasas, escisión inducida por proteasas, escisión inducida por lipasas o escisión de enlaces disulfuro.

[269] Los ejemplos no taxativos de dichos espaciadores autoescindibles incluyen:









y 
,donde:

PG es un grupo protector (iniciador);

X_a es O, NH o S;

X_b es O, NH, NCH_3 o S;

X_c es O o NH;

Y_a es CH_2, CH_2O o CH_2NH;

Y_b es CH_2, O o NH;

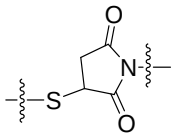
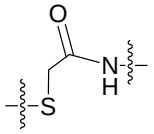
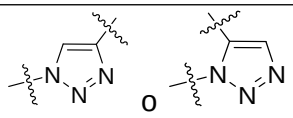
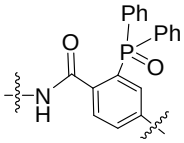
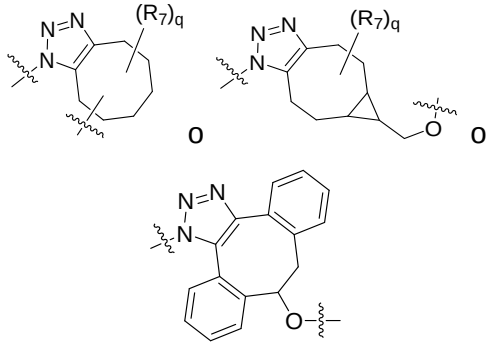
Y_c es un enlace, CH_2, O o NH, y

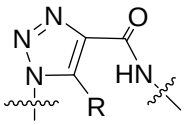
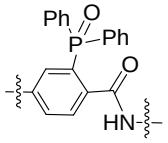
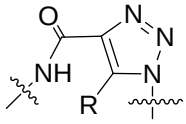
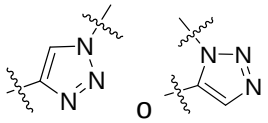
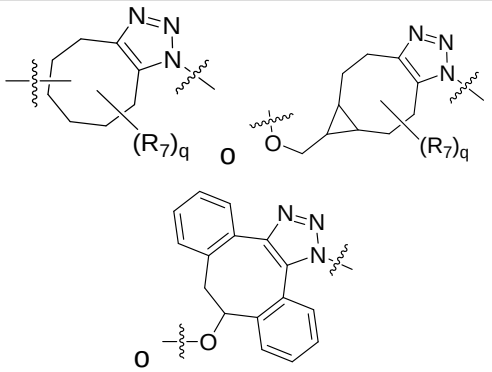
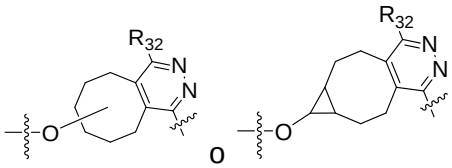
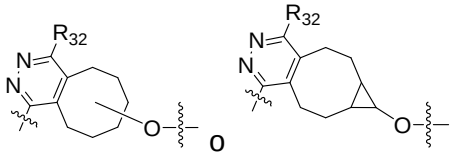
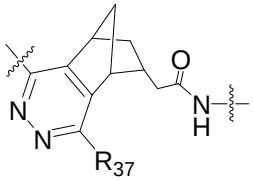
LG es un grupo saliente tal como una unidad de fármaco (D) del grupo de conector-fármaco de la invención.

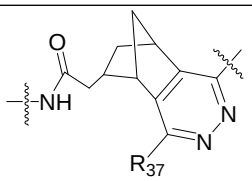
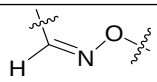
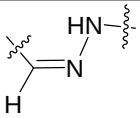
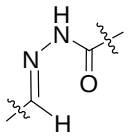
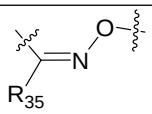
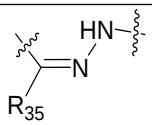
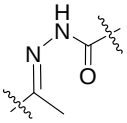
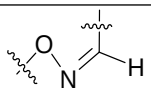
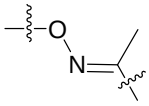
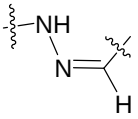
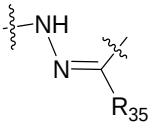
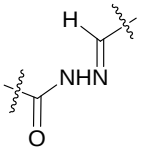
Los ejemplos no taxativos adicionales de dichos espaciadores autoescindibles se describen en *Angew. Chem. Int*., Ed. 2015, 54, 7492 - 7509.

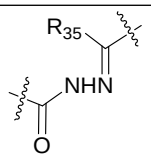
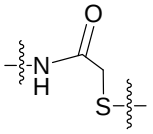
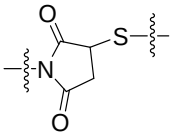
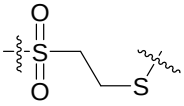
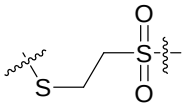
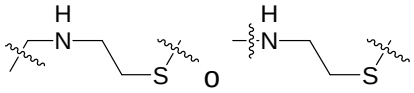
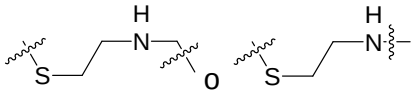
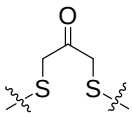
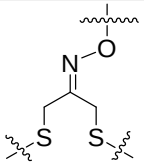
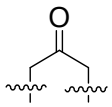
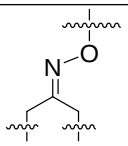
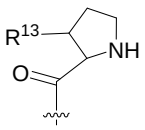
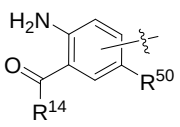
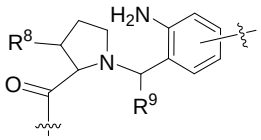
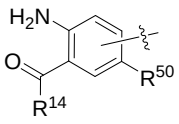
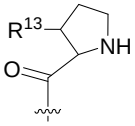
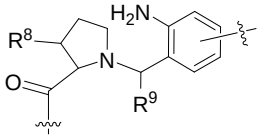
[270] Además, el componente conector puede ser una unidad química formada fácilmente mediante reacción entre dos grupos reactivos. Los ejemplos no taxativos de dichas unidades químicas se describen en la Tabla 2.

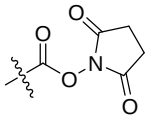
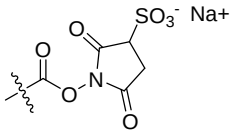
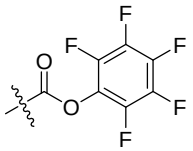
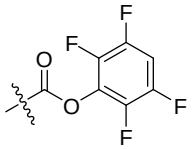
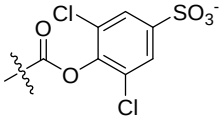
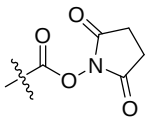
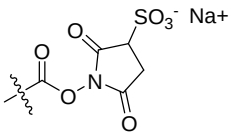
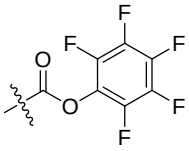
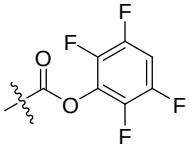
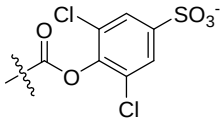
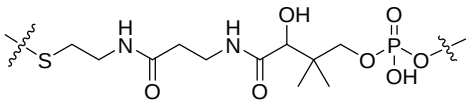
Tabla 2

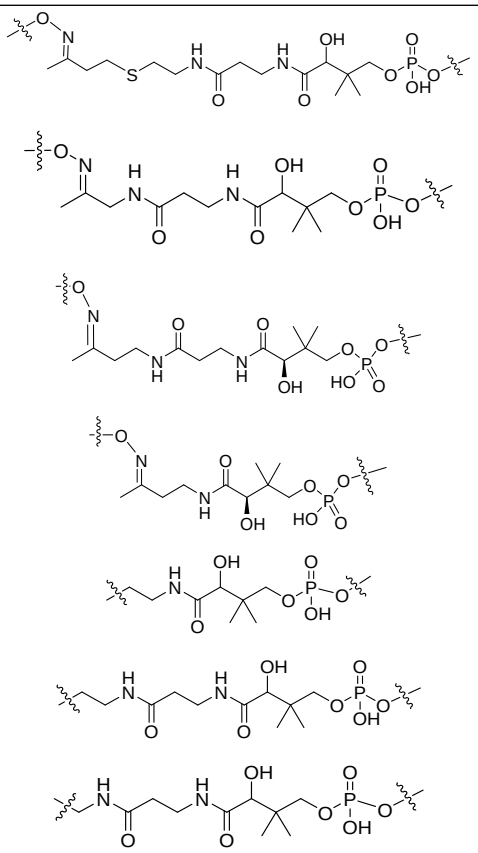
Grupo reactivo 1 (RG1)	**Grupo reactivo 2 (RG2)**	**Unidad química**
un tiol	un tiol	-S-S-
un tiol	una maleimida	
un tiol	una haloacetamida	
una azida	un alquino	
una azida	una triarilfosfina	
una azida	un ciclooctino	

Grupo reactivo 1 (RG1)	Grupo reactivo 2 (RG2)	Unidad química
una azida	un oxanobornadieno	
una triarilfosfina	una azida	
un oxanobornadieno	una azida	
un alquino	una azida	
un ciclooctino	una azida	
un cicloocteno	una diariltetrazina	
una diariltetrazina	un cicloocteno	
una monoariltetrazina	un norborneno	

Grupo reactivo 1 (RG1)	**Grupo reactivo 2 (RG2)**	**Unidad química**
un norborneno	una monoariltetrazina	
un aldehído	una hidroxilamina	
un aldehído	una hidrazina	
un aldehído	NH_2-NH-C(=O)-	
una cetona	una hidroxilamina	
una cetona	una hidrazina	
una cetona	NH_2-NH-C(=O)-	
una hidroxilamina	un aldehído	
una hidroxilamina	una cetona	
una hidrazina	un aldehído	
una hidrazina	una cetona	
NH_2-NH-C(=O)-	un aldehído	

Grupo reactivo 1 (RG1)	Grupo reactivo 2 (RG2)	Unidad química
NH_2-NH-C(=O)-	una cetona	
una haloacetamida	un tiol	
una maleimida	un tiol	
una vinilsulfona	un tiol	
un tiol	una vinilsulfona	
una aziridina	un tiol	
un tiol	una aziridina	
	hidroxilamina	
	hidroxilamina	
		
		

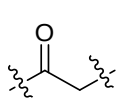
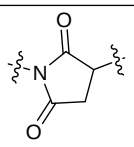
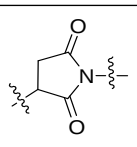
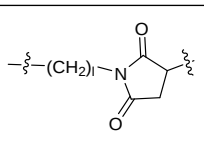
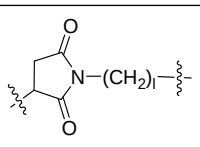
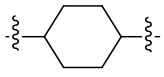
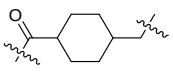
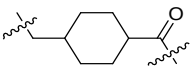
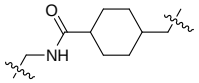
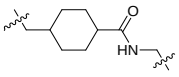
Grupo reactivo 1 (RG1)	Grupo reactivo 2 (RG2)	Unidad química
    	-NH_2,	amida
-NH_2,	    	amida
CoA o análogo de CoA	Residuo serina	

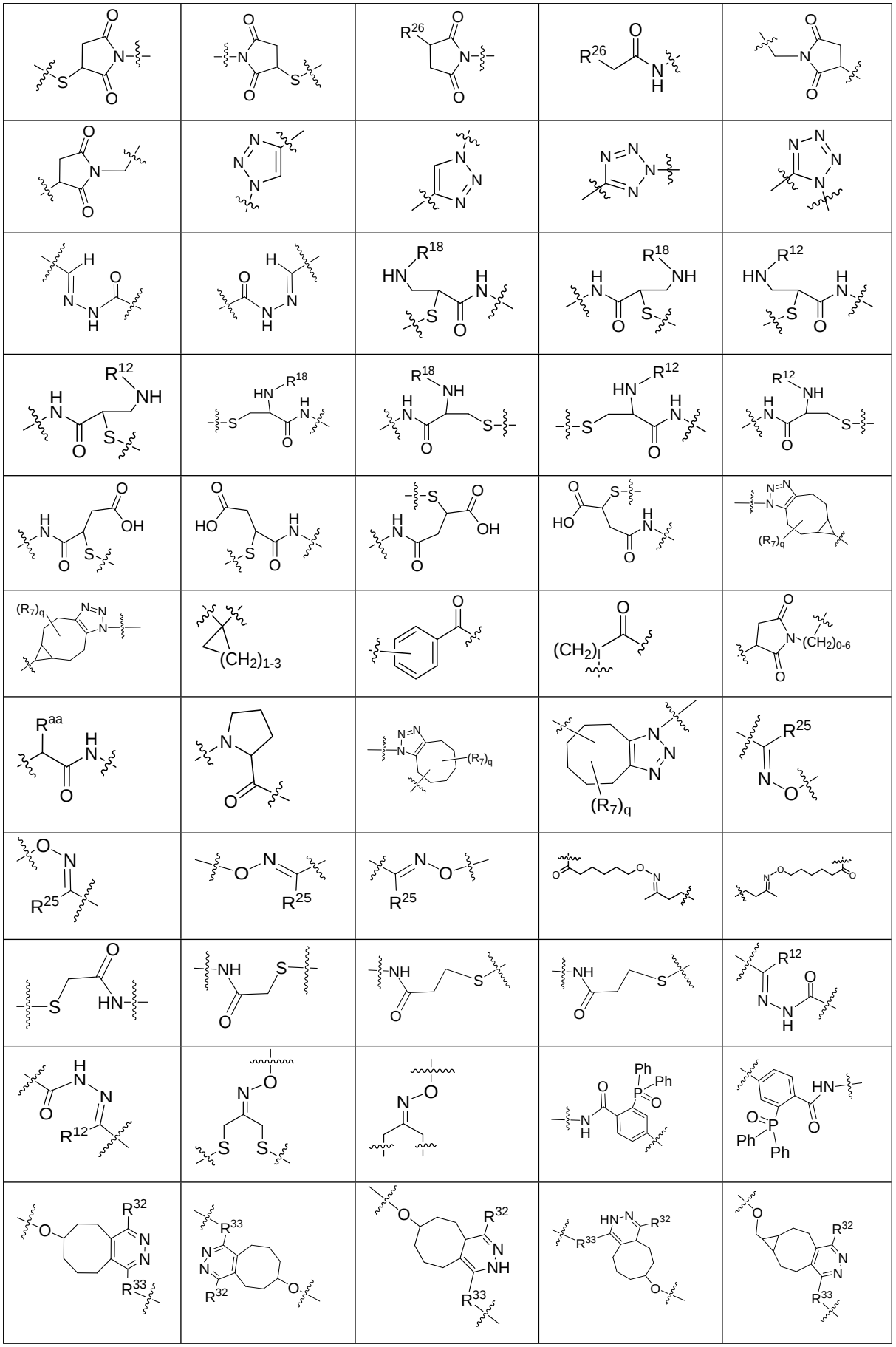
Grupo reactivo 1 (RG1)	Grupo reactivo 2 (RG2)	Unidad química
		
piridilditiol	tiol	disulfuro

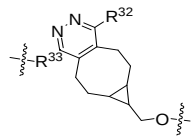
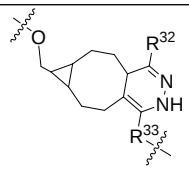
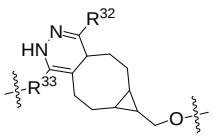
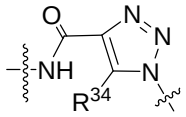
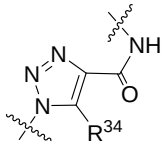
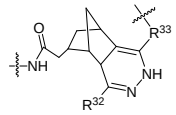
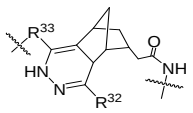
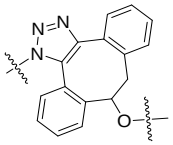
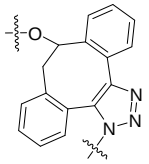
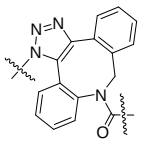
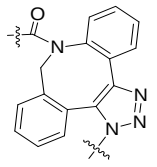
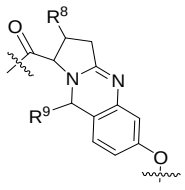
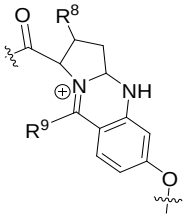
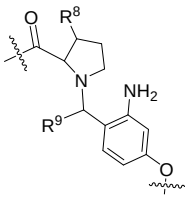
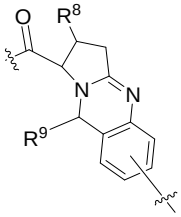
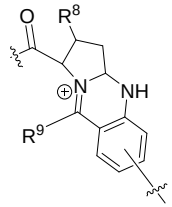
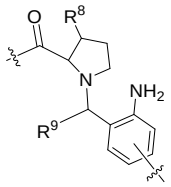
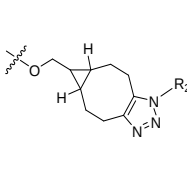
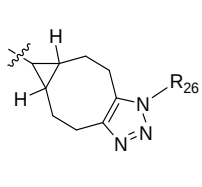
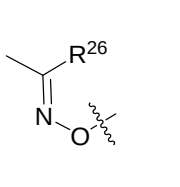
donde: R^{32} en la Tabla 2 es H, C_{1-4} alquilo, fenilo, pirimidina o piridina; R^{35} en la Tabla 2 es H, C_{1-6}alquilo, fenilo o C_{1-4}alquilo sustituido con 1 a 3 grupos –OH; cada R^7 en la Tabla 2 se selecciona de manera independiente entre H, C_{1-6}alquilo, fluoro, benciloxi sustituido con –C(=O)OH, bencilo sustituido con –C(=O)OH, C_{1-4}alcoxi sustituido con –C(=O)OH y C_{1-4}alquilo sustituido con –C(=O)OH; R^{37} en la Tabla 2 se selecciona de manera independiente entre H, fenilo y piridina; q en la Tabla 2 es 0, 1, 2 ó 3; R^8 y R^{13} en la Tabla 2 son cada uno H o metilo; y R^9 y R^{14} en la Tabla 2 son cada uno H, $-CH_3$ o fenilo; R en la Tabla 2 es H o cualquier sustituyente adecuado; y R^{50} en la Tabla 2 es H.

[271] Además, el componente conector puede ser un grupo indicado en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3.



cada R^7 se selecciona de manera independiente entre H, C_{1-6}alquilo, fluoro, benciloxi sustituido con –C(=O)OH, bencilo sustituido con –C(=O)OH, C_{1-4}alcoxi sustituido con –C(=O)OH y C_{1-4}alquilo sustituido con –C(=O)OH;

cada R^{12} se selecciona de manera independiente entre H y C_1-C_6alquilo

R^8 es H o metilo;

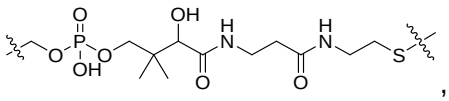
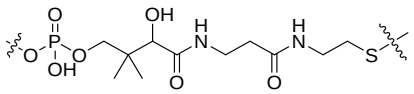
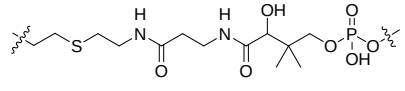
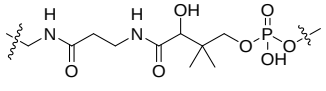
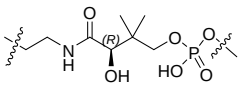
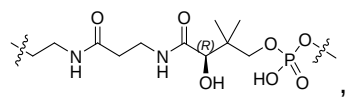
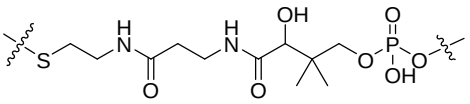
R^9 es H, -CH_3 o fenilo;

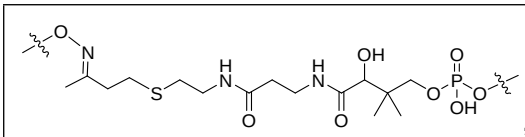
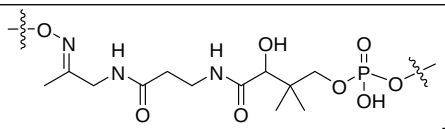
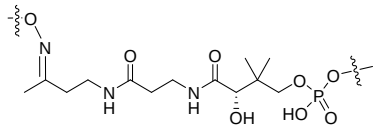
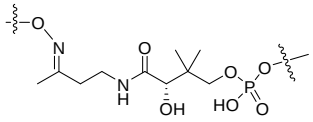
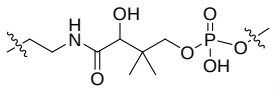
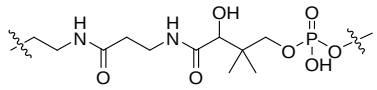
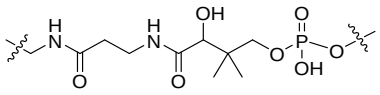
cada R^{25} se selecciona de manera independiente entre H o C_{1-4} alquilo;

cada R^{18} se selecciona de manera independiente entre un C_1-C_6alquilo, un C_1-C_6alquilo que está sustituido con azida y un C_1-C_6alquilo que está sustituido con 1 a 5 hidroxilos;

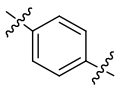
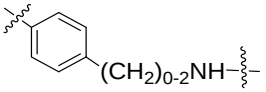
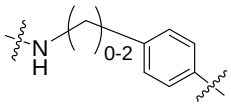
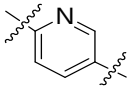
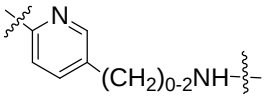
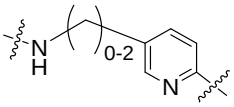
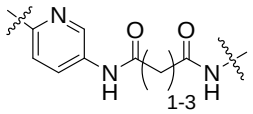
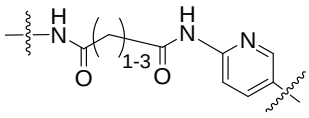
q es 0, 1, 2 ó 3;

l es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

R^{26} es  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,


,

,

,

,

,


, o

R^{32} se selecciona de manera independiente entre H, C_{1-4} alquilo, fenilo, pirimidina y piridina;

R^{33} se selecciona de manera independiente entre 
,

,

,

,

,

,


, y ;

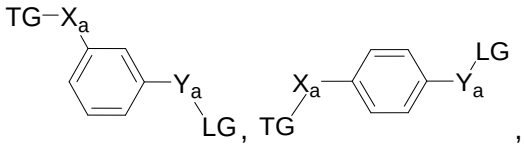
R^{34} se selecciona de manera independiente entre H, C_{1-4} alquilo y C_{1-6} haloalquilo, y

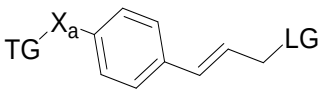
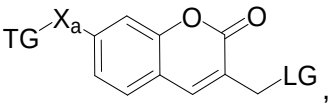
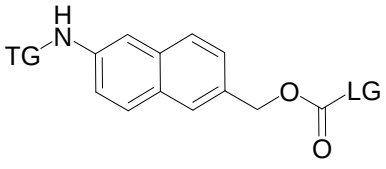
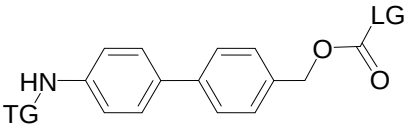
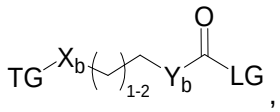
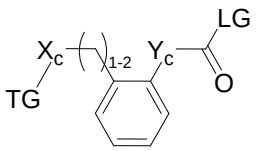
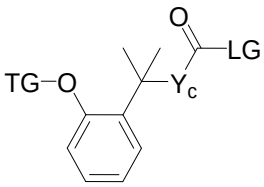
R^{aa} es una cadena lateral de un aminoácido.

[272] Según se usa en la presente, cuando se ilustra una estructura parcial de un compuesto, una línea ondeada (∿) indica el punto de unión de dicha estructura parcial al resto de la molécula.

[273] Los términos “espaciador autoescindible” y “grupo autoescindible”, según se usan en la presente, se refieren a una unidad que comprende uno o más grupos iniciadores (TG) que son activados mediante escisión inducida por ácido, escisión inducida por peptidasas, escisión inducida por esterasas, escisión inducida por glicosidasas, escisión inducida por fosfodiesterasas, escisión inducida por fosfatasas, escisión inducida por proteasas, escisión inducida por lipasas o escisión inducida por puentes disulfuro, y después de la activación el grupo protector es eliminado, lo cual genera una cascada de reacciones de desensamblaje que conducen a una liberación temporalmente sucesiva de un grupo saliente. Dicha cascada de reacciones puede comprender, pero en un sentido no taxativo, reacciones de eliminación 1,4-, 1,6- o 1,8-.

[274] Los ejemplos no taxativos de espaciadores o grupos autoescindibles incluyen:










y , en donde dichos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos, y

en donde:

TG es un grupo disparador;

X_a es O, NH o S;

X_b es O, NH, NCH_3 o S;

X_c es O o NH;

Y_a es CH_2, CH_2O o CH_2NH;

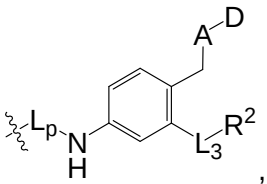
Y_b es CH_2, O o NH;

Y_c es un enlace, CH_2, O o NH, y

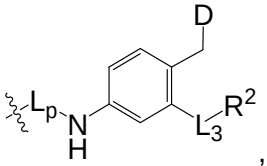
LG es un grupo saliente tal como una unidad de fármaco (D) del grupo de conector-fármaco de la invención.

Los ejemplos no taxativos adicionales de espaciadores autoescindibles se describen en *Angew. Chem. Int*. Ed. 2015, 54, 7492 – 7509.

En alguna forma de realización, el espaciador autoescindible es una unidad que tiene la estructura

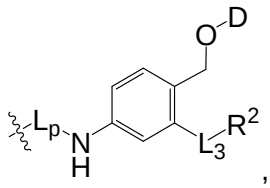

, donde Lp es un péptido espaciador bivalente enzimáticamente escindible y A, D, L_3 y R^2 son como se definen en la presente.

En formas de realización preferidas, el espaciador autoescindible es una unidad que tiene la estructura

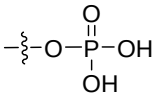

, donde Lp es un péptido espaciador bivalente enzimáticamente

escindible y D, L_3 y R^2 son como se definen en la presente. En algunas formas de realización, D es un inhibidor de MCl-1 que contiene una amina terciaria cuaternizada.

En otras formas de realización preferidas, el espaciador autoescindible es una unidad que tiene la estructura



, donde Lp es un péptido espaciador bivalente enzimáticamente escindible y D, L_3 y R^2 son como se definen en la presente.

El término “unidad hidrofílica”, según se usa en la presente, se refiere a una unidad que tiene propiedades hidrofílicas que aumentan la solubilidad acuosa de la unidad de fármaco (D) cuando dicha unidad de fármaco (D) está unida al grupo conector de la invención. Los ejemplos de dichos grupos hidrofílicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, polietilenglicoles, polialquilenglicoles, azúcares, oligosacáridos, polipéptidos, un C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos 

.

Unidades de fármaco

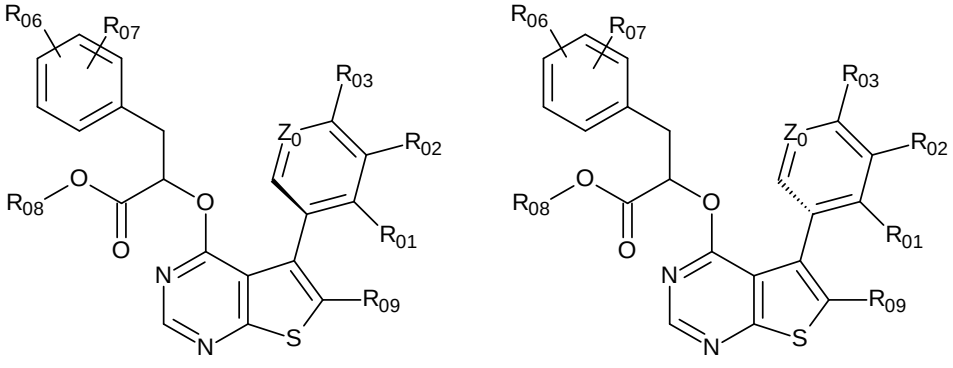
[275] En algunas formas de realización, se hace reaccionar un intermediario, que es el precursor de la unidad conectora, con la unidad de fármaco (por ejemplo, el inhibidor de Mcl-1) en condiciones apropiadas. En algunas formas de realización, se usan grupos reactivos en el fármaco y/o el intermediario o el conector. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermediario, o el derivado de fármaco (fármaco más conector), se hace reaccionar posteriormente con el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno en condiciones que faciliten la conjugación del fármaco y el intermediario o derivado del fármaco y el anticuerpo o antígeno un fragmento de unión. Como alternativa, primero se puede hacer reaccionar el intermediario o el conector con el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, o un derivado del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, y luego se hace reaccionar con el fármaco o un derivado del fármaco.

[276] Existen varias reacciones diferentes para la unión covalente de la unidad de fármaco y/o de la unidad conectora al anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. Esto a menudo se logra mediante la reacción de uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, inclusive los grupos amina de lisina, los grupos ácido carboxílico libres de ácido glutámico y ácido aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y las diversas unidades de aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, la unión covalente no específica se puede realizar usando una reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) en una unidad de fármaco a un grupo amino (o carboxi) en un anticuerpo o un fragmento de

unión al antígeno. Además, también se pueden usar agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino en una unidad de fármaco a un grupo amino en un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. También se pueden utilizar la reacción de la base de Schiff para la unión de fármacos (por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1) a agentes de unión. Este método comprende la oxidación con periodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, formando así un aldehído que luego se hace reaccionar con el agente de unión.. La unión tiene lugar por formación de una base de Schiff con los grupos amino del agente de unión. También se pueden usar isotiocianatos como agentes de acoplamiento para la unión covalente de fármacos con los agentes de unión. Otras técnicas serán conocidas para el especialista y se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. Los ejemplos de unidades de fármaco que se pueden generar y unir a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno usando diversas químicas conocidas en el arte incluyen inhibidores de Mcl-1, por ejemplo, los inhibidores de Mcl-1 que se divulgan y ejemplifican en la presente.

[277] Las unidades de fármaco adecuadas pueden comprender un compuesto de las fórmulas (I), (II), (III), o un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o sal de adición del mismo con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable. Además, la unidad de fármaco puede comprender cualquier compuesto inhibidor de Mcl-1 (D) divulgado en la presente.

[278] Según se usa en la presente, los "atropisómeros" son estereoisómeros que surgen debido a una rotación impedida alrededor de un enlace simple, donde las diferencias de energía debido a la tensión estérica u otros contribuyentes crean una barrera para la rotación que es suficientemente alta como para permitir el aislamiento de conformadores individuales Bringmann et al., *Angew, Chem. Int*. Ed. 2005, 44, 5384-5427). Por ejemplo, para los compuestos de la fórmula (II) de acuerdo con la invención, los atropisómeros pueden comprender los siguientes:



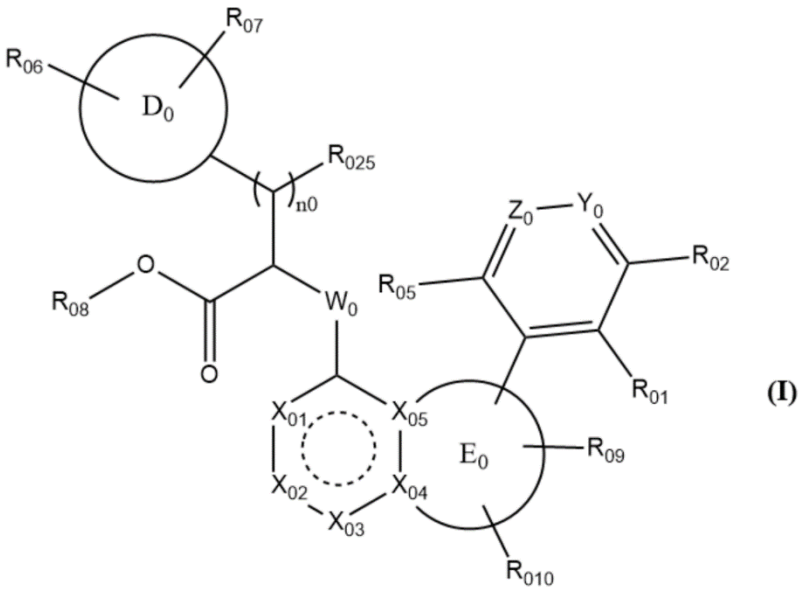
.

[279] Por ejemplo, un atropisómero preferido puede ser (5S_a), también denominado (5*aS*).

[280] Una unidad de fármaco de la divulgación puede comprender cualquiera de los

compuestos divulgados en las publicaciones de Solicitudes de Patente Internacional Nº: WO 2015/097123; WO 2016/207216; WO 2016/207217; WO 2016/207225; WO 2016/207226; WO 2017/125224; WO 2019/035899; WO 2019/035911; WO 2019/035914; WO 2019/035927; WO 2016/033486; WO 2017/147410; WO 2018/183418; y WO 2017/182625, y en la publicación de la Solicitud de Patente de los EEUU N°: 2019/0055264, cada una de las cuales se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

[281] En algunas formas de realización, una unidad de fármaco de la divulgación puede comprender un compuesto de la Fórmula (I):



(I)

en donde:

el anillo D_0 es un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,

el anillo E_0 es un anillo furilo, tienilo o pirrolilo,

X_{01}, X_{03}, X_{04} y X_{05} son de manera independiente entre sí un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno,

X_{02} es un grupo C-R_{026} o un átomo de nitrógeno,

 significa que el anillo es aromático

Y_0 es un átomo de nitrógeno o un grupo C-R_{03},

Z_0 es un átomo de nitrógeno o un grupo C-R_{04},

R_{01} es un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -$Cy_{08,}$ -(C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-(C_1-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-(C_1-C_6)alquil-R_{012}, -C(O)-OR_{011}, -O-C(O)-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -NR_{011}-C(O)-OR_{011}', -(C_1-C_6)alquil-NR_{011}-

$C(O)-R_{011}$', $-SO_2-NR_{011}R_{011}$' o $-SO_2-(C_1-C_6)$alquilo,

R_{02}, R_{03}, R_{04} y R_{05} son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo $-S-(C_1-C_6)$alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, $-(C_0-C_6)$alquil-$NR_{011}R_{011}$', $-O-Cy_{01}$, $-(C_0-C_6)$alquil-Cy_{01}, $-(C_2-C_6)$alquenil-Cy_{01}, $-(C_2-C_6)$alquinil-Cy_{01}, $-O-(C_1-C_6)$alquil-$NR_{011}R_{011}$', $-O-(C_1-C_6)$alquil-R_{031}, $-O-(C_1-C_6)$alquil-R_{012}, $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}$', $-NR_{011}-C(O)-R_{011}$', $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}$', $-(C_1-C_6)$alquil-$NR_{011}-C(O)-R_{011}$', $-SO_2-NR_{011}R_{011}$' o $-SO_2-(C_1-C_6)$alquilo,

o el par (R_{01}, R_{02}), (R_{02}, R_{03}), (R_{03}, R_{04}), o (R_{04}, R_{05}) forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con 1 ó 2 grupos seleccionados entre halógeno, (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, (C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', $-NR_{013}R_{013}$', $-(C_0-C_6)$alquil-Cy_{01} u oxo,

R_{06} y R_{07} son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo $-S-(C_1-C_6)$alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, $-(C_0-C_6)$alquil-$NR_{011}R_{011}$', $-O-(C_1-C_6)$alquil-$NR_{011}R_{011}$', $-O-Cy_{01}$, $-(C_0-C_6)$alquil-Cy_{01}, $-(C_2-C_6)$alquenil-Cy_{01}, $-(C_2-C_6)$alquinil-Cy_{01}, $-O-(C_1-C_6)$alquil-R_{012}, $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}$', $-NR_{011}-C(O)-R_{011}$', $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}$', $-(C_1-C_6)$alquil-$NR_{011}-C(O)-R_{011}$', $-SO_2-NR_{011}R_{011}$' o $-SO_2-(C_1-C_6)$alquilo,

o el par (R_{06}, R_{07}), cuando se fusiona con los dos átomos de carbono adyacentes, forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, $-NR_{013}R_{013}$', $-(C_0-C_6)$alquil-Cy_{01} o un oxo,

W_0 es un grupo $-CH_2-$, un grupo -NH- o un átomo de oxígeno,

R_{08} es un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_8)alquilo lineal o ramificado, un grupo $-CHR_{0a}R_{0b}$, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo aril(C_1-C_6)alquilo o un grupo heteroaril(C_1-C_6)alquilo,

R_{09} es un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, $-Cy_{02}$, $-(C_1-C_6)$alquil-Cy_{02}, $-(C_2-C_6)$alquenil-Cy_{02}, $-(C_2-C_6)$alquinil-Cy_{02}, $-Cy_{02}-Cy_{03}$, $-(C_2-C_6)$alquinil-O-Cy_{02}, $-Cy_{02}-(C_0-C_6)$alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{03}, un átomo de halógeno, un grupo ciano, $-C(O)-R_{014}$ o

-C(O)-$NR_{014}R_{014}$',

R_{010} es un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo aril(C_1-C_6)alquilo, un grupo (C_1-C_6)cicloalquilalquilo, un (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado o -(C_1-C_6)alquil-O-Cy_{04},

o el par (R_{09}, R_{010}), cuando se fusiona con los dos átomos de carbono adyacentes, forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N,

R_{011} y R_{011}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido o -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01},

o el par (R_{011}, R_{011}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S, y N, en donde el átomo de N puede estar sustituido por 1 ó 2 grupos seleccionados entre un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, y en donde uno o más de los átomos de carbono del grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado está opcionalmente deuterado,

R_{012} es -Cy_{05}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-NR_{011}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{07}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{09}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{09}, -NH-C(O)-NH-R_{011}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-NR_{011}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{09}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -$NR_{011}R_{011}$', -OR_{011}, -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -O-(C_1-C_6)alquil-OR_{011}, -SO_2-R_{011}, -C(O)-OR_{011},

R_{013}, R_{013}', R_{014} y R_{014}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido,

R_{0a} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

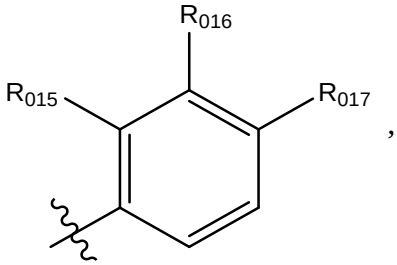
R_{0b} es un grupo -O-C(O)-O-R_{0c}, un grupo -O-C(O)-$NR_{0c}R_{0c}$' o un grupo -O-P(O)(OR_{0c})$_2$,

R_{0c} y R_{0c}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_8)alquilo lineal o ramificado, un grupo cicloalquilo, un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo o un grupo (C_1-C_6)alcoxicarbonil(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{0c}, R_{0c}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo no aromático compuesto por entre 5 y 7 miembros del anillo, que puede contener, además del átomo de nitrógeno, entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados entre oxígeno y nitrógeno, en donde el nitrógeno está sustituido opcionalmente con un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{03}, Cy_{04}, Cy_{05}, Cy_{06}, Cy_{07}, Cy_{08} y Cy_{010} son de manera independiente entre sí un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente

sustituido,

Cy_{09} es 

,

o Cy_{09} es un grupo heteroarilo que está sustituido por un grupo seleccionado entre -O-P(O)(OR_{020})$_2$; -O-P(O)(O^-M^+)$_2$; -$(CH_2)_{p0}$-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)$_{q0}$-R_{020}; hidroxi; hidroxi(C_1-C_6)alquilo; -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo; y -U_0-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$',

R_{015} es un átomo de hidrógeno; un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)$_q$0-R_{020}; un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado; un grupo -U_0-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$'; o un grupo -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo,

R_{016} es un átomo de hidrógeno; un grupo hidroxi; un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo; un grupo -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo; un grupo $(CH_2)_{r0}$-U_0-V_0-O-P(O)(OR_{020})$_2$; un grupo -O-P(O)(O^-M^+)$_2$; un grupo -O-S(O)$_2$$OR_{020}$; un grupo -S(O)$_2$$OR_{020}$; un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-($CHR_{018}$-$CHR_{019}$-O)$_q$0-$R_{020}$; un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-C(O)-$NR_{022}R_{023}$; o un grupo –$U_0$-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$',

R_{017} es un átomo de hidrógeno; un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)$_q$0-R_{020}; un grupo -CH_2-P(O)(OR_{020})$_2$, un grupo -O-P(O)(OR_{020})$_2$; un grupo -O-P(O)(O^-M^+)$_2$; un grupo hidroxi; un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo; un grupo -$(CH_2)_{r0}$-U_0-$(CH_2)_{s0}$-heterocicloalquilo; un grupo -U_0-$(CH_2)_{q0}$-$NR_{021}R_{021}$'; o un ácido aldónico,

M^+ es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable,

U_0 es un enlace o un átomo de oxígeno,

V_0 es un grupo -$(CH_2)_{s0}$- o un grupo -C(O)-,

R_{018} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo,

R_{019} es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo,

R_{020} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{021} y R_{021}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{021}, R_{021}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{022} es un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo, un grupo -$(CH_2)_{p0}$-$NR_{024}R_{024}$' o un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)$_q$0-R_{020},

R_{023} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alcoxi(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{022}, R_{023}) forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 18 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 5 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo heterocicloalquilo,

R_{024} y R_{024}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

o el par (R_{024}, R_{024}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático compuesto por entre 5 y 7 miembros del anillo, que puede contener, además del átomo de nitrógeno, entre 1 y 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, y en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{025} es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxi o un grupo hidroxi(C_1-C_6)alquilo,

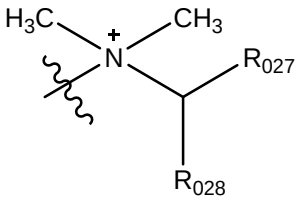
R_{026} es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo ciano,

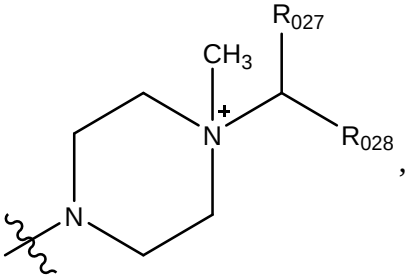
R_{027} es un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{028} es un grupo -O-P(O)(O^-)(O^-), un grupo -O-P(O)(O^-)(OR_{030}), un grupo -O-P(O)(OR_{030})(OR_{030}'), un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-SO_2-, un grupo -$(CH_2)_{p0}$-SO_2-O^-, un grupo -$(CH_2)_{p0}$-O-SO_2-OR_{030}, -Cy_{010}, un grupo -$(CH_2)_{p0}$-SO_2-OR_{030}, un grupo -O-C(O)-R_{029}, un grupo -O-C(O)-OR_{029} o un grupo -O-C(O)-$NR_{029}R_{029}$';

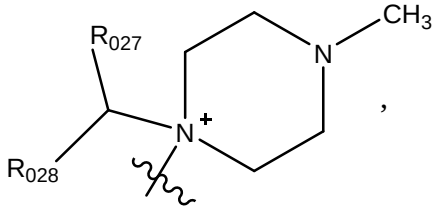
R_{029} y R_{029}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo amino(C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado,

R_{030} y R_{030}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado o un grupo aril(C_1-C_6)alquilo,

R_{031} es 

, 

,

o 

, en donde el ion amonio existe opcionalmente como una forma zwiteriónica o comprende un contraión aniónico monovalente,

n_0 es un número entero igual a 0 ó 1,

p_0 es un número entero igual a 0, 1, 2 ó 3,

q_0 es un número entero igual a 1, 2, 3 ó 4,

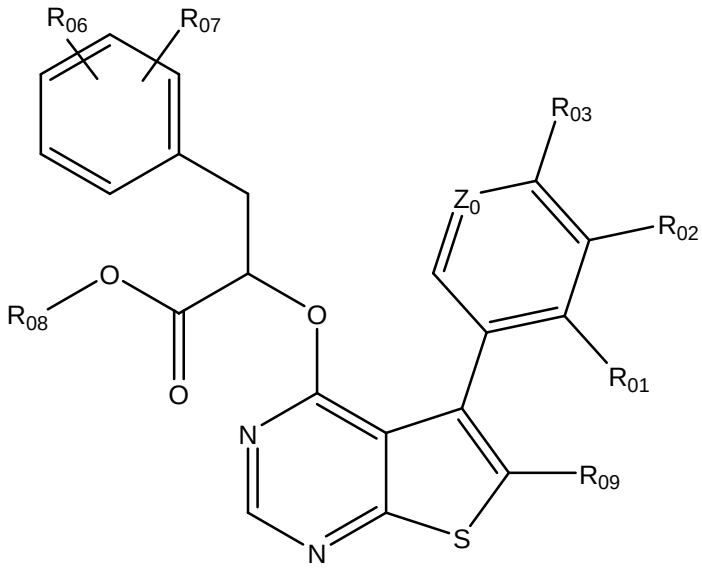
r_0 y s_0 son de manera independiente un número entero igual a 0 ó 1;

en donde, como máximo, uno de los grupos R_{03}, R_{09} o R_{012}, si está presente, está unido de manera covalente al conector, y

en donde no se excede la valencia de un átomo en virtud de uno o más de los sustituyentes unidos al mismo,

o un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

[282] En algunas formas de realización, una unidad de fármaco de la divulgación puede comprender un compuesto de la Fórmula (II):



(II)

en donde:

Z_0 es un átomo de nitrógeno o un grupo C-R_{04},

R_{01} es un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, -$Cy_{08,}$ -$NR_{011}R_{011}$',

R_{02}, R_{03} y R_{04} son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un grupo (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -(C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-Cy_{01}, -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{01}, -O-(C_1-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-(C_1-C_6)alquil-R_{031}, -C(O)-OR_{011}, -O-C(O)-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -NR_{011}-C(O)-OR_{011}', -(C_1-C_6)alquil-NR_{011}-C(O)-R_{011}', -SO_2-$NR_{011}R_{011}$' o -SO_2-(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{02}, R_{03}) o (R_{03}, R_{04}) forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el anillo está sustituido opcionalmente con un grupo seleccionado entre un (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, -$NR_{013}R_{013}$', -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01} y oxo,

R_{06} y R_{07} son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, un (C_1-C_6)haloalquilo lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado, un grupo -S-(C_1-C_6)alquilo, un grupo ciano, un grupo nitro, -(C_0-C_6)alquil-$NR_{011}R_{011}$', -O-Cy_{01}, -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{01}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{01}, -O-(C_1-C_6)alquil-R_{012}, -C(O)-OR_{011}, -O-C(O)-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -NR_{011}-C(O)-OR_{011}', -(C_1-C_6)alquil-NR_{011}-C(O)-R_{011}', -SO_2-$NR_{011}R_{011}$' o -SO_2-(C_1-C_6)alquilo,

o el par (R_{06}, R_{07}), cuando se fusiona con dos átomos de carbono adyacentes, forma, junto con los átomos de carbono al cual está unido, un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, y en donde el anillo resultante está sustituido opcionalmente con un grupo seleccionado entre un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, -$NR_{013}R_{013}$', -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01} y un oxo,

R_{08} es un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_8)alquilo lineal o ramificado, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo aril-(C_1-C_6)alquilo o un grupo heteroaril(C_1-C_6)alquilo,

R_{09} es un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado, -Cy_{02}, -(C_1-C_6)alquil-Cy_{02}, -(C_2-C_6)alquenil-Cy_{02}, -(C_2-C_6)alquinil-Cy_{02}, -Cy_{02}-Cy_{03}, -(C_2-C_6)alquinil-O-Cy_{02}, -Cy_{02}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{03}, un átomo de halógeno, un grupo ciano, -C(O)-R_{014}, -C(O)-$NR_{014}R_{014}$',

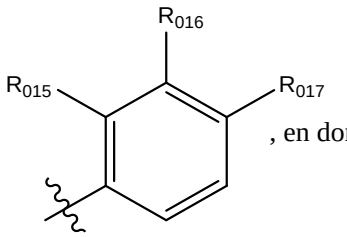
R_{011} y R_{011}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido o -(C_0-C_6)alquil-Cy_{01},

o el par (R_{011}, R_{011}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el átomo de N está sustituido opcionalmente con un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado, y en donde uno o más de los átomos de carbono del grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado está opcionalmente deuterado,

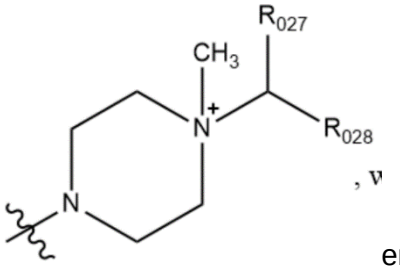
R_{012} es -Cy_{05}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-NR_{011}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{06}, -Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)alquil-Cy_{07}, -Cy_{05}-(C_0-C_6)alquil-Cy_{09}, -NH-C(O)-NH-R_{011}, -C(O)-$NR_{011}R_{011}$', -$NR_{011}R_{011}$', -OR_{011}, -NR_{011}-C(O)-R_{011}', -O-(C_1-C_6)alquil-OR_{011}, -SO_2-R_{011} o -C(O)-OR_{011},

R_{013}, R_{013}', R_{014} y R_{014}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido,

Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{03}, Cy_{05}, Cy_{06}, Cy_{07} y Cy_{08} son de manera independiente entre sí un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido,

Cy_{09} es 

, en donde R_{015}, R_{016} y R_{017} son como se definieron para la fórmula (I),

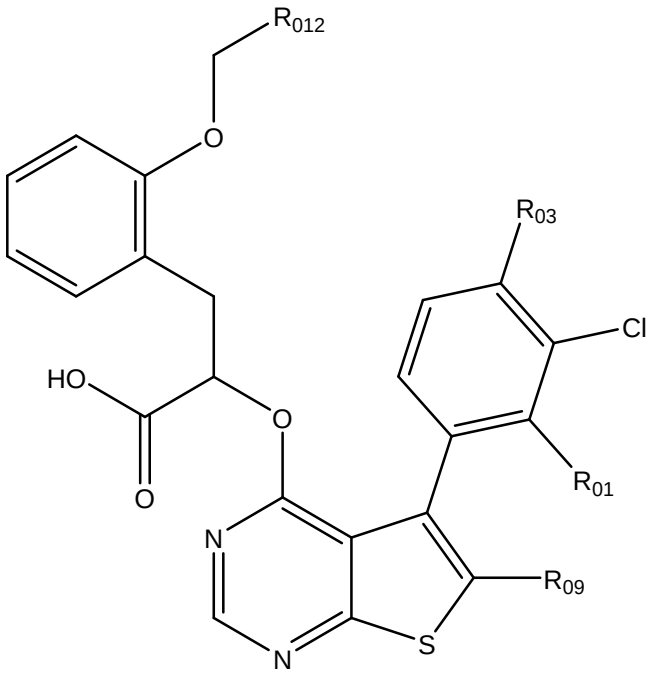
R_{031} es 

en donde R_{027} y R_{028} son como se definieron para la Fórmula (I);

en donde, como máximo, uno de los grupos R_{03}, R_{09} o R_{012}, si está presente, está unido de manera covalente al conector,

o un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

[283] En algunas formas de realización, una unidad de fármaco de la divulgación puede comprender un compuesto de la Fórmula (III):

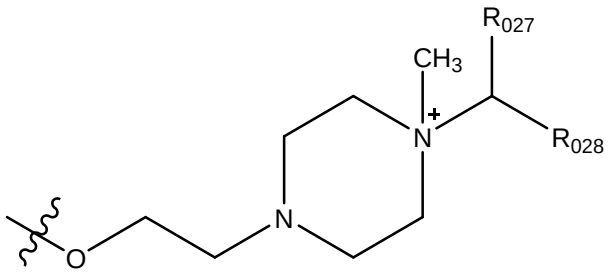


(III)

en donde:

R_{01} es un grupo $(C_1\text{-}C_6)$alquilo lineal o ramificado,

R_{03} es $\text{-O-}(C_1\text{-}C_6)\text{alquil-NR}_{011}R_{011}$' o



,

en donde R_{011} y R_{011}' son de manera independiente entre sí un átomo de hidrógeno, un grupo $(C_1\text{-}C_6)$alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido o $\text{-}(C_0\text{-}C_6)\text{alquil-Cy}_{01}$;

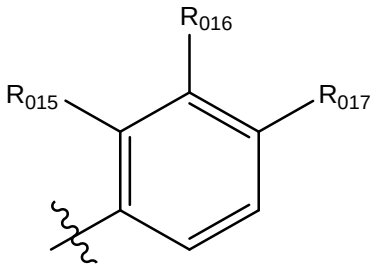
o el par (R_{011}, R_{011}') forma junto con el átomo de nitrógeno al cual está unido un anillo aromático o no aromático que contiene 5 a 7 miembros del anillo, que opcionalmente contiene, además del átomo de nitrógeno, 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N, en donde el átomo de N puede estar sustituido por 1 ó 2 grupos seleccionados entre un átomo de hidrógeno o un grupo $(C_1\text{-}C_6)$alquilo lineal o ramificado,

y en donde R_{027} es un átomo de hidrógeno y R_{028} es un grupo $\text{-}(CH_2)_{p0}\text{-O-SO}_2\text{-O}^-$ o un grupo $\text{-}(CH_2)_{p0}\text{-SO}_2\text{-OR}_{030}$;

R_{09} es un grupo $(C_2\text{-}C_6)$alquinilo lineal o ramificado o -Cy_{02},

R_{012} es -Cy_{05}, $\text{-Cy}_{05}\text{-}(C_0\text{-}C_6)\text{alquil-Cy}_{06}$ o $\text{-Cy}_{05}\text{-}(C_0\text{-}C_6)\text{alquil-Cy}_{09}$,

Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{05} y Cy_{06} son de manera independiente entre sí un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido,

Cy_{09} es  ;

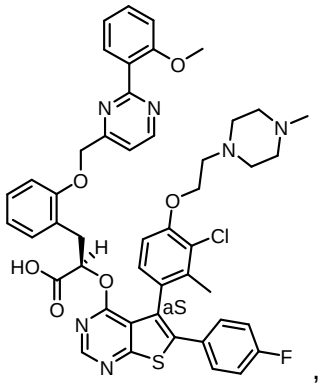
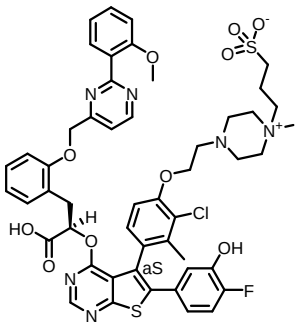
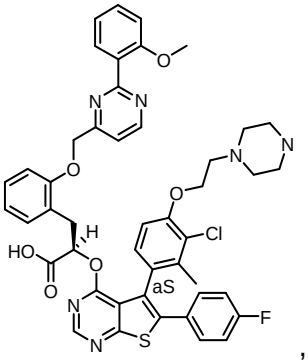
p0, R_{015}, R_{016} y R_{017} son como se definieron para la Fórmula (I),

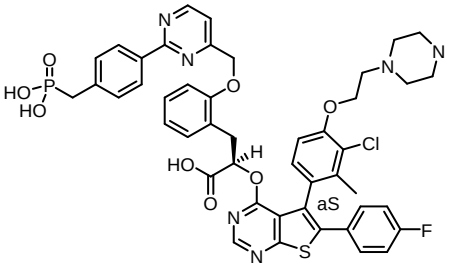
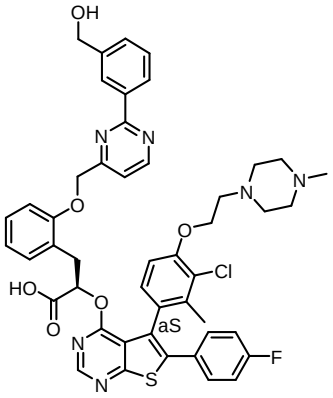
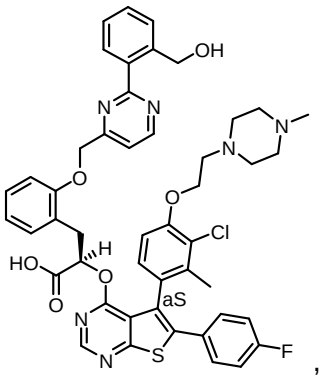
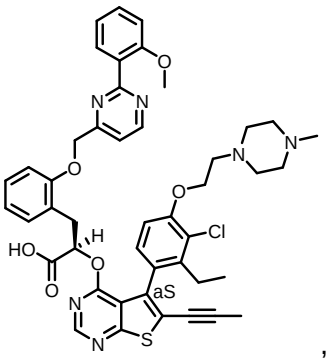
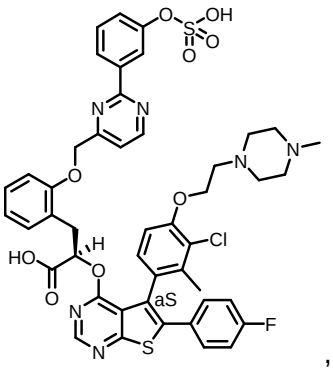
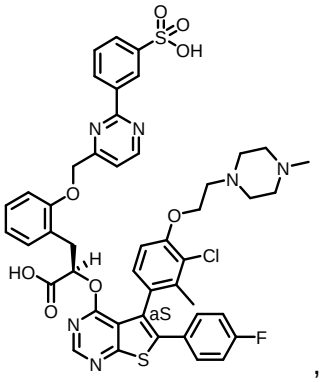
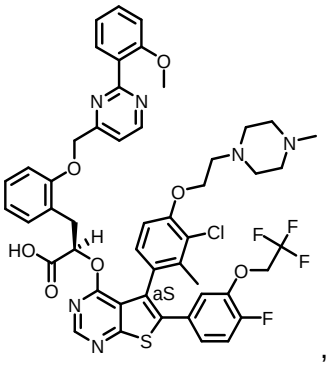
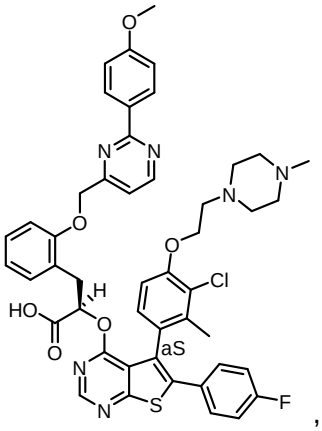
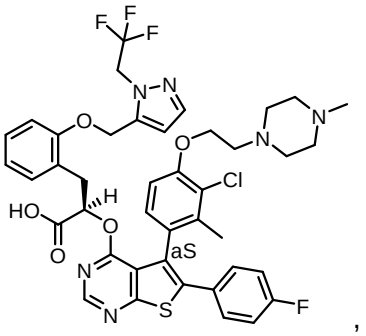
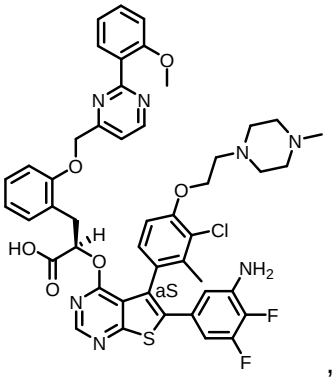
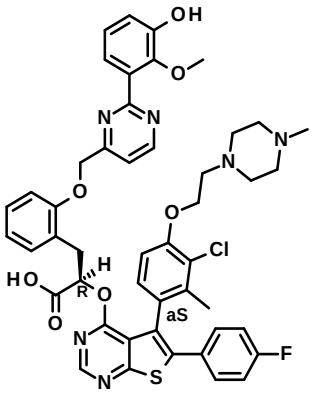
en donde, como máximo, uno de los grupos R_{03}, R_{09} o R_{012}, si está presente, está unido de manera covalente al conector,

o el enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

[284] En algunas formas de realización, Cy_{01}, Cy_{02}, Cy_{03}, Cy_{04}, Cy_{05}, Cy_{06}, Cy_{07}, Cy_{08} y Cy_{010} son de manera independiente entre sí un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido, en donde los sustituyentes opcionales se seleccionan entre (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, un grupo (C_2-C_6)alquenilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, un grupo (C_2-C_6)alquinilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, (C_1-C_6)alcoxi lineal o ramificado opcionalmente sustituido, (C_1-C_6)alquil-S- opcionalmente sustituido, hidroxi, oxo (o N-óxido si fuera apropiado), nitro, ciano, -C(O)-OR_0', -O-C(O)-R_0', -C(O)-NR_0'R_0'', -NR_0'R_0'', -(C=NR_0')-OR_0'', lineal o ramificado (C_1-C_6)haloalquilo, trifluorometoxi o halógeno, en donde R_0' y R_0'' son cada uno de manera independiente un átomo de hidrógeno o un grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido, y en donde uno o más de los átomos de carbono de grupo (C_1-C_6)alquilo lineal o ramificado está opcionalmente deuterado.

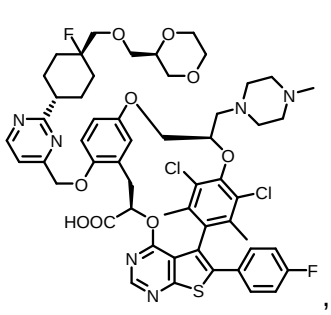
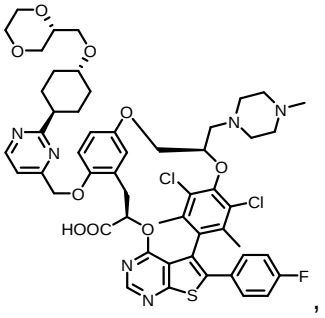
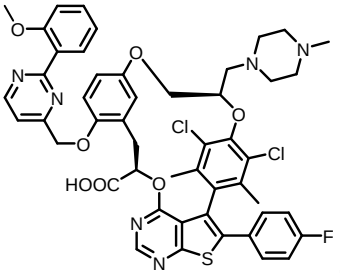
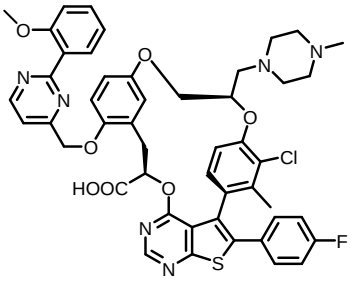
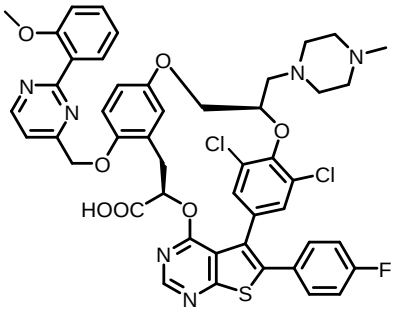
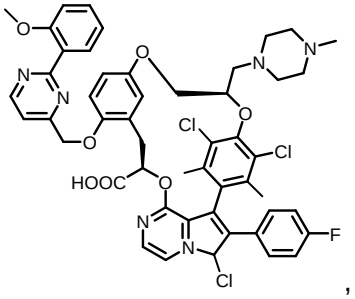
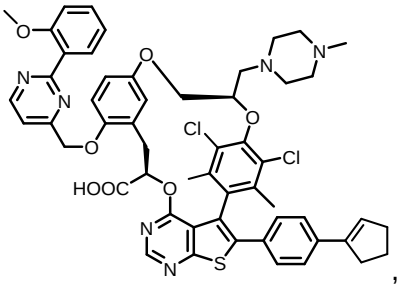
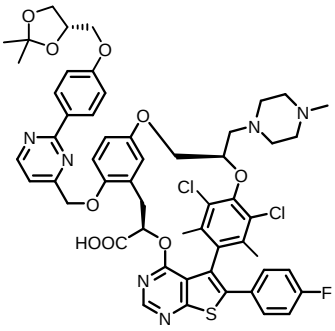
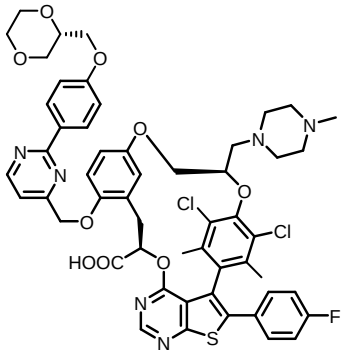
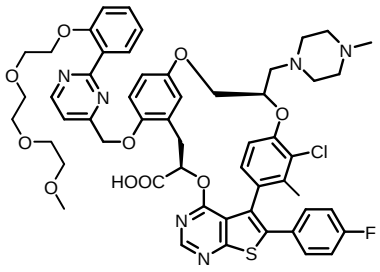
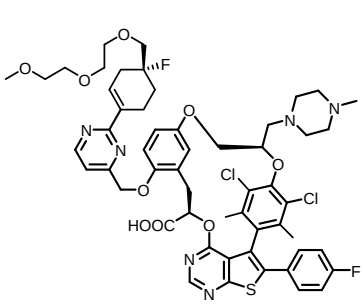
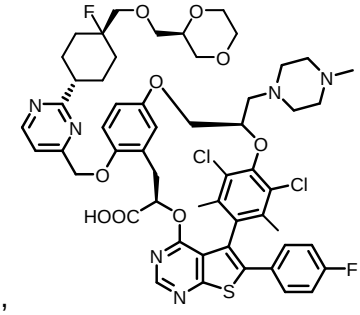
[285] En algunas formas de realización, la unidad de fármaco (D) comprende:

 ,  ,  ,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

o un enantiómero, diastereoisómero, atropisómero, derivado deuterado y/o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes.

[286] Adicionalmente, una unidad de fármaco de la divulgación puede comprender

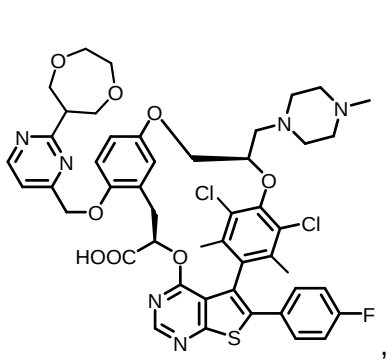
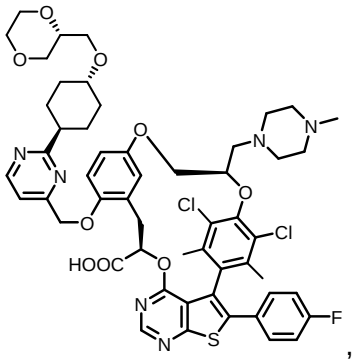
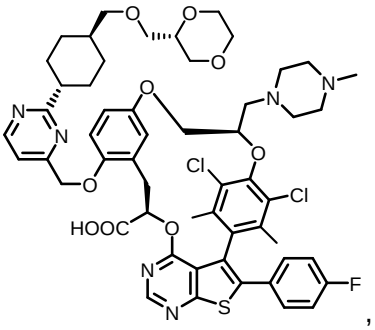
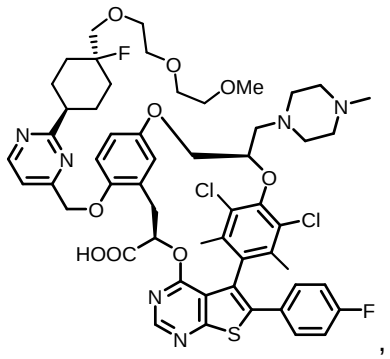
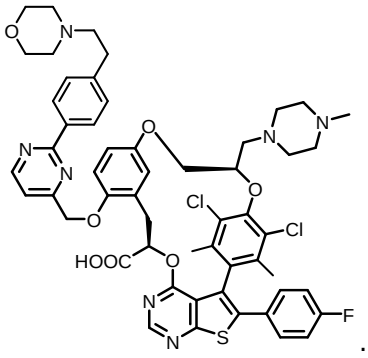
cualquiera de los que sigue:


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

[287] En algunas formas de realización, la unidad de conector-fármaco (o "conector-carga útil") -(L-D) puede comprender un compuesto seleccionado de la Tabla A.

Carga de fármacos

[288] La carga del fármaco está representada por p, y en la presente también se denomina relación de fármaco-anticuerpo (DAR). La carga de fármaco puede variar entre 1 y 16 unidades de fármaco por anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. En algunas formas de realización, p es un número entero de entre 1 y 16. En algunas formas de realización, p es un número entero entre 1 y 16, entre 1 y 15, entre 1 y 14, entre 1 y 13, entre 1 y 12, entre 1 y 11, entre 1 y 10, entre 1 y 9, entre 1 y 8, entre 1 y 7, entre 1 y 6, entre 1 y 5, entre 1 y 4, entre 1 y 3 o entre 1 y 2. En algunas formas de realización, p es un número entero de entre 2 y 10, entre 2 y 9, entre 2 y 8, entre 2 y 7, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4 o entre 2 y 3. En algunas formas de realización, p es un número entero entre 1 y 16. En algunas formas de realización, p es un número entero entre 1 y 8 En algunas formas de realización, p es un número entero entre 1 y 5. En algunas formas de realización, p es un número entero entre 2 y 4. En algunas formas de realización, p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas formas de realización, p es 2. En algunas formas de realización, p es 4.

[289] La carga del fármaco puede estar limitada por la cantidad de sitios de unión en el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. En algunas formas de realización, la unidad conectora (L) del ADC se une al anticuerpo o al fragmento de unión al antígeno por medio de un grupo químicamente activo en uno o más unidades de aminoácidos en el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. Por ejemplo, el conector se puede unir al anticuerpo o al fragmento de unión al antígeno por medio de un grupo amino, imino, hidroxilo, tiol o carboxilo

libre (por ejemplo, al extremo N o C terminal, al grupo amino épsilon de uno o más residuos de lisina, al grupo ácido carboxílico libre de uno o más residuos ácido glutámico o ácido aspártico, o al grupo sulfhidrilo de uno o más residuos cisteína). El sitio al que se une el conector puede ser un residuo natural en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, o se puede introducir en el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, mediante la introducción de un residuo cisteína en la secuencia de aminoácidos) o mediante bioquímica de proteínas (por ejemplo, por reducción, ajuste de pH o hidrólisis).

[290] En algunas formas de realización, la cantidad de unidades de fármaco que se pueden conjugar con un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno está limitada por la cantidad de residuos cisteína libres. Por ejemplo, cuando la unión es un grupo cisteína tiol, un anticuerpo puede contener solo uno o unos pocos grupos cisteína tiol, o puede contener solo uno o unos pocos grupos tiol suficientemente reactivos por medio de los cuales se puede unir un conector. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos y reactivos cisteína tiol libres que pueden estar unidos a una unidad farmacológica. De hecho, la mayoría de los residuos cisteína tiol en los anticuerpos están involucrados en enlaces disulfuro intercatenarios o intracatenarios. Por lo tanto, para la conjugación a cisteínas puede ser necesaria, en algunas formas de realización, por lo menos una reducción parcial del anticuerpo. La unión excesiva de la toxina conectora a un anticuerpo puede desestabilizar el anticuerpo al reducir los residuos cisteína disponibles para formar enlaces disulfuro. Por lo tanto, una relación óptima de fármaco: anticuerpo debería aumentar la potencia del ADC (aumentando la cantidad de unidades de fármaco unidas por anticuerpo) sin desestabilizar el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. En algunas formas de realización, una relación óptima puede ser 2, 4, 6 u 8. En algunas formas de realización, una relación óptima puede ser de 2 ó 4.

[291] En algunas formas de realización, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno es expuesta a condiciones reductoras antes de la conjugación para generar uno o más residuos cisteína libres. En algunas formas de realización, el anticuerpo se puede reducir con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT) o tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), en condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos reactivos tiol cisteína. Se pueden generar cisteínas no apareadas mediante reducción parcial con equivalentes molares limitados de TCEP, que pueden reducir los enlaces disulfuro entre cadenas que unen la cadena liviana y la cadena pesada (un par por apareamiento HL) y las dos cadenas pesadas en la región de la bisagra (dos pares por apareamiento HH en el caso de la IgG1 humana) en tanto los enlaces disulfuro intracatenarios se dejan intactos (Stefano et al. (2013) *Methods Mol Biol*. 1045: 145-71). En formas de realización, los enlaces disulfuro en de los anticuerpos se reducen electroquímicamente, por ejemplo, empleando un electrodo de trabajo que aplica

un voltaje alternativo de reducción y oxidación. Este enfoque puede permitir el acoplamiento en línea de la reducción del enlace disulfuro a un dispositivo analítico (por ejemplo, un dispositivo de detección electroquímica, un espectrómetro de RMN o un espectrómetro de masa) o un dispositivo de separación química (por ejemplo, un cromatógrafo líquido (por ejemplo, un HPLC) o un dispositivo de electroforesis (véase, por ejemplo, US 2014/0069822)). En algunas formas de realización, el anticuerpo es sometido a condiciones desnaturalizantes para revelar grupos nucleofílicos reactivos en los residuos de aminoácidos, tales como cisteína.

[292] La carga del fármaco de un ADC se puede controlar de diferentes maneras, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar del intermediario de fármaco-conector o del reactivo conector con relación al anticuerpo; (ii) limitando el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación; (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación de cisteína tiol; y/o (iv) diseñar mediante técnicas recombinantes la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera que el número y la posición de los residuos de cisteína se modifique para controlar el número y/o la posición de los enlaces del fármaco-conector.

[293] En algunas formas de realización, los residuos de cisteína libres se introducen en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos diseñados con cisteína en donde se reemplazan uno o más aminoácidos de un anticuerpo parental por un aminoácido cisteína. Se puede modificar cualquier forma de anticuerpo, es decir, mutar. Por ejemplo, se puede diseñar un fragmento de anticuerpo Fab original para formar un Fab diseñado con cisteína denominado "TioFab". De la misma manera, se puede diseñar un anticuerpo monoclonal original para formar un "TioMab". Una mutación de un solo sitio produce un residuo cisteína modificado en el TioFab, en tanto una mutación de un sitio produce dos residuos cisteína modificados en un TioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. El ADN que codifica una variante de la secuencia de aminoácidos del polipéptido original se puede preparar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte (véase, por ejemplo, los métodos divulgados en WO 2006/034488). Estos métodos incluyen, pero en un sentido no taxativo, preparación mediante mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis con PCR y mutagénesis con un casete de un ADN preparado previamente que codifica el polipéptido. Las variantes de anticuerpos recombinantes también se pueden construir mediante manipulación de fragmentos de restricción o mediante PCR de extensión superpuesta con oligonucleótidos sintéticos. Los ADC de Fórmula (1) incluyen, pero en un sentido no taxativo, anticuerpos que contienen 1, 2, 3 ó 4 aminoácidos de cisteína diseñados (Lyon et al. (2012) *Methods Enzymol*. 502: 123-38). En algunas formas de realización, hay uno o más residuos de cisteína libres que ya están presentes en el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, sin el uso de ingeniería genérica, en cuyo caso los residuos de cisteína libre existentes se

pueden usar para conjugar el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno con una unidad de fármaco.

[294] Cuando hay más de un grupo nucleofílico que reacciona con un intermediario de fármaco-conector o un reactivo de una unidad conectora seguido por un reactivo de una unidad de fármaco en la mezcla de reacción que comprende múltiples copias del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y de la unidad conectora, entonces el producto resultante puede ser una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de una o más unidades de fármaco unidas a cada copia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en la mezcla. En algunas formas de realización, la carga de fármaco en una mezcla de ADC resultantes de una reacción de conjugación varía en un rango entre 1 y 16 unidades de fármaco unidas por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. La cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (es decir, la carga de fármaco promedio, o *p* promedio) se puede calcular mediante cualquier método convencional conocido en el arte, por ejemplo, mediante espectrometría de masa (por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS)) y/o cromatografía líquida de alta presión (por ejemplo, HIC-HPLC). En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se determina mediante cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS). En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 3,5, entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 5,5, entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5 o entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9,5. En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 o entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8.

[295] En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es de aproximadamente 2. En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es de aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 2, aproximadamente 2,1, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,4 o aproximadamente 2,5. En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por

anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es 2.

[296] En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es de aproximadamente 4. En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es de aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, o aproximadamente 4,5. En algunas formas de realización, la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es 4.

[297] En algunas formas de realización, el término “aproximadamente”, según se usa con respecto a la cantidad promedio de unidades de fármaco por anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, significa más o menos 20%, 15%, 10%, 5% o 1%. En una forma de realización, el término “aproximadamente” se refiere a un rango de valores que comprende un 10% más o menos del valor especificado. En otra forma de realización, el término “aproximadamente” se refiere a un rango de valores que comprende un 5% más o menos del valor especificado. En otra forma de realización, el término “aproximadamente” se refiere a un rango de valores que comprende un 1% más o menos del valor especificado.

[298] Se pueden identificar compuestos de ADC individuales, o "especies", en la mezcla mediante espectroscopía de masa y se pueden separar, por ejemplo, mediante UPLC o HPLC, por ejemplo cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC-HPLC). En algunas formas de realización, se puede aislar un producto de ADC homogéneo o casi homogéneo con un único valor de carga de la mezcla de conjugación, por ejemplo, mediante electroforesis o cromatografía.

[299] En algunas formas de realización, una mayor carga de fármaco (por ejemplo, $p > 16$) puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de determinados conjugados de anticuerpo-fármaco. Una mayor carga de fármaco también puede afectar negativamente la farmacocinética (por ejemplo, la eliminación) de algunos ADC. En algunas formas de realización, una carga de fármaco más baja (por ejemplo, $p < 2$) puede reducir la potencia de determinados ADC contra las células que expresan el blanco. En algunas formas de realización, la carga de fármaco para un ADC de la presente descripción varía entre aproximadamente 2 y aproximadamente 16, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4; o entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8.

[300] En algunas formas de realización, se logra una carga de fármaco y/o una carga

promedio de fármaco de aproximadamente 2 usando, por ejemplo, una reducción parcial de disulfuros intracatenarios en el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, y proporciona propiedades beneficiosas. En algunas formas de realización, se logra una carga de fármaco y/o una carga promedio de fármaco de aproximadamente 4 o aproximadamente 6 o aproximadamente 8, por ejemplo, usando reducción parcial de los disulfuros intracatenarios en el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, y provee propiedades beneficiosas. En algunas formas de realización, una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio menor que aproximadamente 2 puede dar como resultado un nivel inaceptablemente alto de especies de anticuerpos no conjugados, que pueden competir con el ADC para unirse al antígeno CD74 blanco y/o proporcionar una eficacia de tratamiento reducida. En algunas formas de realización, una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio de más de aproximadamente 16 puede dar como resultado un nivel inaceptablemente alto de heterogeneidad de producto y/o agregación de ADC. Una carga de fármaco y/o una carga de fármaco promedio mayor que aproximadamente 16 también puede afectar la estabilidad del ADC, debido a la pérdida de uno o más de los enlaces químicos necesarios para estabilizar el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno.

[301] La presente divulgación incluye métodos para producir los ADC divulgados. Brevemente, los ADC comprenden un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno como el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, una unidad de fármaco (por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1) y un conector que se une a la unidad de fármaco y al anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. En algunas formas de realización, los ADC se pueden preparar usando un conector que tiene funcionalidades reactivas para unirse covalentemente a la unidad de fármaco y al anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se funcionaliza para preparar un grupo funcional para que sea reactivo con un conector o un intermediario de fármaco-conector. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un grupo cisteína tiol de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede formar un enlace con un grupo funcional reactivo de un conector o un intermediario de fármaco-conector para obtener un ADC. En algunas formas de realización, se prepara un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno con transglutaminasa bacteriana (BTG) - glutaminas reactivas específicamente funcionalizados con una amina que contiene una unidad ciclooctino BCN (N-[(1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetiloxicarbonil]-1,8-diamino-3,6-dioxaoctano). En algunas formas de realización, se lleva a cabo una conjugación específica del sitio de un conector o un intermediario de fármaco -conectora con una unidad BCN de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, por ejemplo, como se describe y ejemplifica en la presente. La generación de los ADC se puede lograr mediante técnicas conocidas por el especialista en el arte.

[302] En algunas formas de realización, un ADC se produce mediante el contacto de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno con un conector y una unidad de fármaco (por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1) de manera sucesiva, de manera que el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno primero se unirá covalentemente al conector, y luego el intermediario de anticuerpo-conector preformado reaccionará con la unidad de fármaco. Se puede someter, o no, al intermediario conector de anticuerpos a una etapa de purificación antes del contacto con la unidad de fármaco. En otras formas de realización, se produce un ADC mediante contacto de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno con un compuesto conector-fármaco preformado haciendo reaccionar un conector con una unidad de fármaco. Se puede someter, o no, al compuesto de conector-fármaco a una etapa de purificación antes del contacto del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. En otras formas de realización, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno se pone en contacto con el conector y la unidad del fármaco en una mezcla de reacción, permitiendo la formación simultánea de enlaces covalentes entre el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno y el conector, y entre el conector y la unidad de fármaco. Este método para producir ADC puede incluir una reacción en la cual el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se pone en contacto con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno antes de agregar el conector a la mezcla de reacción, y viceversa. En algunas formas de realización, el ADC se produce mediante reacción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con un conector unido a una unidad de fármaco, tal como un inhibidor de Mcl-1, en condiciones que permitan la conjugación.

[303] Los ADC preparados de acuerdo con los métodos descritos precedentemente se pueden someter a una etapa de purificación. La etapa de purificación puede comprender cualquier método bioquímico conocido en el arte para purificar proteínas, o cualquier combinación de dichos métodos. Incluyen, pero en un sentido no taxativo, filtración por flujo tangencial (TFF), cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cualquier carga o cromatografía basada en puntos isoeléctricos, cromatografía de modalidad mixta, por ejemplo, CHT (hidroxiapatita cerámica), cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño, diálisis, filtración, precipitación selectiva o cualquier combinación de los mismos.

Usos terapéuticos y composiciones

[304] En la presente se divulgan métodos para usar las composiciones que se describen en la presente, por ejemplo, los compuestos y las composiciones de ADC divulgados, en el tratamiento de un trastorno, por ejemplo un cáncer, en un sujeto. Las composiciones, por ejemplo los ADC, se pueden administrar solos o en combinación con por lo menos un agente inactivo y/o activo adicional, por ejemplo, por lo menos un agente terapéutico adicional, y se

pueden administrar en cualquier formulación, dosificación y régimen de dosificación farmacéuticamente aceptable. La eficacia del tratamiento puede ser evaluada por toxicidad así como por los indicadores de eficacia y se puede ajustar en consecuencia. Las medidas de eficacia incluyen, pero en un sentido no taxativo, un efecto citostático y/o citotóxico observado in vitro o in vivo, volumen tumoral reducido, inhibición del crecimiento tumoral y/o supervivencia prolongada.

[305] Hay métodos conocidos para determinar si un ADC ejerce un efecto citostático y/o citotóxico en una célula. Por ejemplo, la actividad citotóxica o citostática de un ADC se puede medir, por ejemplo, mediante exposición de células de mamífero que expresan al antígeno CD74 blanco del ADC en un medio de cultivo celular; cultivo de las células por un período de entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 6 días; y medición de la viabilidad celular (por ejemplo, usando un ensayo CellTiter-Glo® (CTG) o un ensayo de viabilidad celular MTT). Los ensayos basados en células in vitro también se pueden usar para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de apoptosis (activación de caspasa) del ADC.

[306] Para determinar la citotoxicidad, se puede medir la necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La necrosis suele ir acompañada de una mayor permeabilidad de la membrana plasmática, hinchazón de la célula y ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis se puede cuantificar, por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN. Existen métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa in vitro de la fragmentación del ADN. Los ejemplos de tales ensayos, que incluyen TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en un ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, se describen en *Biochemica* (1999)2: 34-7 (Roche Molecular Biochemicals).

[307] La apoptosis también se puede determinar midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, al igual que con la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática se puede determinar midiendo la absorción de determinados colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Duke y Cohen, *Current Protocols in Immunology*, han descrito un método para medir la cantidad de células apoptóticas (Coligan et al., Eds. (1992) páginas 3.17.1-3.17.16). Las células también se pueden marcar con un colorante de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o ioduro de propidio) y se pueden observar las células por la condensación y marginación de la cromatina a lo largo de la membrana nuclear interna. La apoptosis también se puede determinar, en algunas formas de realización, mediante la detección de la actividad de caspasa. En algunas formas de realización, se puede usar un ensayo de Caspase-Glo® para medir la actividad de la caspasa-3 y la caspasa-7. En algunas formas de realización, el ensayo provee un sustrato de caspasa-3/7 luminogénico en un reactivo optimizado para la actividad caspasa, la actividad luciferasa y la lisis celular. En algunas

formas de realización, la adición del reactivo Caspase-Glo® 3/7 en un formato de "agregar-mezclar-medir" puede conducir a lisis celular, seguido por escisión por caspasa del sustrato y la generación de una señal luminiscente de "tipo de brillo", producida por la luciferasa En algunas formas de realización, la luminiscencia puede ser proporcional a la cantidad de actividad caspasa y puede servir como un indicador de la apoptosis. Otros cambios morfológicos que se pueden medir para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, condensación citoplasmática, aumento de la formación de ampollas en la membrana y contracción celular. La determinación de cualquiera de estos efectos en las células cancerosas indica que un ADC es útil en el tratamiento del cáncer.

[308] La viabilidad celular se puede medir, por ejemplo, mediante determinación en una célula de la absorción de un colorante tal como rojo neutro, azul tripano, violeta cristal o azul ALAMAR ™ (véase, por ejemplo, Page et al. (1993) *Intl J Oncology* 3: 473-6). En dicho ensayo, las células se incuban en medios que contienen al colorante, las células se lavan y el colorante que permanece, que refleja la captación celular del colorante, se mide mediante espectrofotometría.

[309] La viabilidad celular también se puede medir, por ejemplo, mediante cuantificación de ATP, un indicador de células metabólicamente activas. En algunas formas de realización, se puede evaluar la potencia y/o la viabilidad celular in vitro de los ADC preparados o se pueden evaluar los compuestos inhibidores de Mcl-1 usando un ensayo de vialidad celular CellTiter-Glo® (CTG), como se describe en los ejemplos provistos en la presente. En este ensayo, en algunas formas de realización, se agrega el reactivo individual (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a células cultivadas en un medio suplementado con suero. La adición del reactivo da como resulta la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente . La cantidad de ATP es directamente proporcional a la cantidad de células presentes en el cultivo

[310] La viabilidad celular también se puede medir, por ejemplo, por medición de la reducción de sales de tetrazolio. En algunas formas de realización, la potencia y/o viabilidad celular in vitro de los ADC o de los compuestos inhibidores de Mcl-1 preparados se pueden evaluar usando un ensayo de viabilidad de células MTT, como se describe en los ejemplos provistos en la presente. En este ensayo, en algunas formas de realización, el tetrazolio MTT amarillo (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) es reducido por las células metabólicamente activas, en parte por la acción de enzimas deshidrogenasa, para generar equivalentes reductores tales como NADH y NADPH. Luego se puede solubilizar y cuantificar el formazán púrpura intracelular resultante utilizando medios espectrofotométricos.

[311] En algunos aspectos, la presente divulgación presenta un método para matar, inhibir o modular el crecimiento de una célula o un tejido canceroso mediante interrupción de la

expresión y/o actividad de Mcl-1 y/o uno o más moduladores corriente arriba o blancos corriente debajo de los mismos. El método se puede usar con cualquier sujeto en quien una interrupción de la expresión y/o actividad de Mcl-1 proporcione un beneficio terapéutico. Los sujetos que se pueden beneficiar con una interrupción de la expresión y/o actividad de Mcl-1 incluyen, pero en un sentido no taxativo, aquellos que padecen o tienen riesgo de padecer un cáncer, tal como un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el cáncer es un linfoma o cáncer gástrico.

[312] Los ejemplos de métodos incluyen los pasos de poner una célula en contacto con un ADC, descrito en la presente, en un cantidad eficaz, es decir, una cantidad suficiente como para matar a la célula. El método se puede utilizar con células en cultivo, por ejemplo, in vitro, in vivo, ex vivo o in situ. Por ejemplo, se pueden cultivar células que expresan CD74 (por ejemplo, células recolectadas de la biopsia de un tumor o de una lesión metastásica; células de una línea de células cancerosas establecida; o células recombinantes), in vitro en un medio de cultivo y el paso de contacto se puede llevar a cabo mediante adición del ADC al medio de cultivo. El método resultará en la muerte de células que expresan CD74, incluyendo en particular las células cancerosas que expresan CD74. Como alternativa, el ADC se puede administrar a un sujeto mediante cualquier ruta de administración adecuada (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o contacto directo con un tejido tumoral) para tener un efecto in vivo.

[313] El efecto in vivo de una composición terapéutica de ADC divulgada se puede evaluar en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, se pueden usar modelos de cáncer xenogénicos, en los cuales se introducen explantes de cáncer o tejidos de xenoinjertos con pasajes en animales inmunológicamente comprometidos, tales como ratones nudos o SCID (Klein et al., (1997) *Nature Med*. 3: 402-8). La eficacia se puede predecir usando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, regresión o metástasis de tumores, y semejantes.

[314] También se pueden usar ensayos in vivo para evaluar la promoción de la muerte tumoral mediante mecanismos tales como apoptosis. En algunas formas de realización, se pueden examinar los xenoinjertos de ratones portadores de tumores tratados con la

composición terapéutica para detectar la presencia de focos apoptóticos y comparar con ratones portadores de xenoinjertos control no tratados. La extensión de los focos apoptóticos en los tumores de los ratones tratados ofrece una indicación de la eficacia terapéutica de la composición.

[315] Además, en la presente se proveen métodos para tratar un trastorno, por ejemplo, un cáncer. Las composiciones descritas en la presente, por ejemplo, los ADC que se divulgan en la presente, se pueden administrar a un mamífero no humano o un sujeto humano con fines terapéuticos. Los métodos terapéuticos incluyen administrar a un sujeto que padece o sospechado de padecer cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de Mcl-1, por ejemplo, un ADC donde el inhibidor está unido a un anticuerpo dirigido que se une a un antígeno (1) que se expresa en una célula cancerosa, (2) es accesible para la unión y/o (3) se localiza o se expresa predominantemente sobre una superficie celular cancerosa en comparación con una célula no cancerosa.

[316] Un ejemplo de una forma de realización es un método de tratamiento de un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición divulgada en la presente, por ejemplo, un ADC, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de ADC, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente). En algunas formas de realización, el cáncer expresa al antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el cáncer es un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el cáncer es un linfoma o cáncer gástrico.

[317] Otro ejemplo de la Forma de realización es un método para administrar un inhibidor de Mcl-1 a una célula que expresa CD74, que comprende conjugar el inhibidor de Mcl-1 con un anticuerpo que se une de manera inmunoespecífica a un epitope de CD74 y exponer la célula al ADC. Los ejemplos de células cancerosas que expresan CD74 para los cuales están indicados los ADC de la presente divulgación incluyen células de mieloma múltiple.

[318] En determinados aspectos, la presente divulgación también provee métodos para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor (por ejemplo, un tumor que expresa CD74), que

comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC o una composición que comprende un ADC. En algunas formas de realización, el tratamiento es suficiente para reducir o inhibir el crecimiento del tumor del paciente, reducir la cantidad o el tamaño de las lesiones metastásicas, reducir la carga tumoral, reducir la carga tumoral primaria, reducir la invasividad, prolongar el tiempo de supervivencia y/o mantener o mejorar la calidad de vida. En algunas formas de realización, el tumor es resiste o refractario al tratamiento con el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del ADC (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD74) cuando se administra solo y/o el tumor es resistente o refractario al tratamiento con la unidad de fármaco de un inhibidor de Mcl-1 cuando se administra solo.

[319] Un ejemplo de una forma de realización es un método para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de ADC, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente). En algunas formas de realización, el tumor expresa al antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el tumor es un cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, melanoma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el tumor es un cáncer gástrico. En algunas formas de realización, la administración del ADC, la composición o la composición farmacéutica reduce o inhibe el crecimiento del tumor en por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99%, en comparación con el crecimiento en la ausencia de tratamiento.

[320] Otro ejemplo de la Forma de realización es un método para demorar o retardar el crecimiento de un tumor en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de ADC, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente). En algunas formas de realización, el tumor expresa al antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, el tumor es un cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, melanoma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, el tumor es un cáncer

gástrico. En algunas formas de realización, la administración del ADC, la composición o la composición farmacéutica demora o retarda el crecimiento del tumor en por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99%, en comparación con el crecimiento en la ausencia de tratamiento.

[321] En determinados aspectos, la presente divulgación también provee métodos para reducir o retardar la expansión de una población de células cancerosas (por ejemplo, una población de células cancerosas que expresa CD74), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC o una composición que comprende un ADC.

[322] Un ejemplo de una forma de realización es un método para reducir o retardar la expansión de una población de células cancerosas en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de ADC, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente). En algunas formas de realización, la población de células cancerosas expresa al antígeno CD74 blanco. En algunas formas de realización, la población de células cancerosas es de un tumor o un cáncer hematológico. En algunas formas de realización, la población de células cancerosas es de un cáncer de mama, mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, leucemia, linfoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de médula ósea, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, formas malignas linfoides originadas de células T o células B, melanoma, leucemia mielogénica, mieloma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas o cáncer de bazo. En algunas formas de realización, la población de células cancerosas es de un linfoma o cáncer gástrico. En algunas formas de realización, la administración del ADC, la composición o la composición farmacéutica reduce la población de células cancerosas en por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99%, en comparación con la población en la ausencia de tratamiento. En algunas formas de realización, la administración del ADC, la composición o la composición

farmacéutica retarda la expansión de la población de células cancerosas en por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos aproximadamente 99%, en comparación con la expansión en la ausencia de tratamiento.

[323] Además, en la presente se proveen métodos para determinar si un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer responderá al tratamiento con los ADC y las composiciones que se divulgan**.** Un ejemplo de una forma de realización es un método para determinar si un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer responderá al tratamiento con un ADC, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de ADC, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente) mediante el suministro de una muestra biológica del sujeto; poner la muestra en contacto con el ADC; y detectar la unión del ADC a células cancerosas en la muestra. En algunas formas de realización, la muestra es una muestra de una biopsia de tejido , una muestra de sangre o una muestra de médula ósea. En algunas formas de realización, el método comprende proporcionar una muestra biológica del sujeto; poner la muestra en contacto con el ADC; y detectar uno o más marcadores de muerte de células cancerosas en la muestra (por ejemplo, una mayor expresión de uno o más marcadores apoptóticos, expansión reducida de una población de células cancerosas en cultivo, etc.).

[324] En la presente también se proveen usos terapéuticos de los ADC y las composiciones que se divulgan. Un ejemplo de una forma de realización es un ADC, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de ADC, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente) para usar en el tratamiento de un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer (por ejemplo, un cáncer que expresa CD74). Otro ejemplo de la Forma de realización es el uso de un ADC, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de ADC, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente) en el tratamiento de un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer (por ejemplo, un cáncer que expresa CD74). Otro ejemplo de la Forma de realización es el uso de un ADC, una composición o una composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de ADC, composiciones o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente) en un método de elaboración de un medicamento para tratar a un sujeto que padece o que está sospechado de padecer un cáncer (por ejemplo, un cáncer que expresa CD74). Los métodos para identificar sujetos que padecen cánceres que expresan un antígeno blanco (por ejemplo, CD74) son conocidos en el arte y se pueden usar para

identificar los pacientes adecuados para el tratamiento con un compuesto o composición de ADC divulgado.

[325] Aún más, los ADC de la presente divulgación se pueden administrar a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el cual se puede unir el ADC para fines veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Con respecto a esto último, dichos modelos de animales pueden ser de utilidad para evaluar la eficacia terapéutica de los ADC divulgados (por ejemplo, evaluar las dosificaciones y los cursos de tiempo o ciclos de administración).

[326] Las composiciones terapéuticas usadas en la práctica de los métodos precedentes se pueden formular como composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para el método de administración deseado. Un ejemplo de una forma de realización es una composición farmacéutica que comprende un ADC de la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, uno adecuado para el medio de administración elegido, por ejemplo, una administración intravenosa. La composición farmacéutica también puede comprender uno o más agentes inactivos y/o terapéuticos adicionales que son adecuados para tratar o prevenir, por ejemplo, un cáncer (por ejemplo, un agente estándar de cuidado, etc.). La composición farmacéutica también puede comprender uno o más componentes de vehículo, excipiente y/o estabilizador, y semejantes. Los métodos para formular dichas composiciones farmacéuticas y formulaciones adecuadas son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA).

[327] Los vehículos adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con la composición terapéutica, retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y en general no es reactivo con el sistema inmunológico del paciente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción, y semejantes que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más entre agua, solución salina, solución amortiguadora salina con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, sal de mesilato y semejantes, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, en la composición se incluyen agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o soluciones amortiguadoras, que mejoran la vida útil o la efectividad del ADC.

[328] Una composición farmacéutica de la presente descripción se puede administrar

mediante una variedad de métodos conocidos en el arte. La ruta y/o el modo de administración pueden variar dependiendo de los resultados deseados. En algunas formas de realización, la formulación terapéutica se solubiliza y administra mediante cualquier ruta que permita suministrar la composición terapéutica en el sitio del cáncer. Las vías de administración potencialmente eficaces incluyen, pero en un sentido no taxativo, las vías parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea), intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraórgano, ortotópica y semejantes. En algunas formas de realización, la administración es intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. El vehículo farmacéuticamente aceptable deberá ser adecuado para la vía de administración, por ejemplo, una administración intravenosa o subcutánea (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Según la ruta de administración, uno o más de los compuestos activos, es decir, el ADC y/o cualquier agente terapéutico adicional, se puede recubrir con un material para proteger dichos uno o más compuestos contra la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pudieran inactivar a dichos compuestos. La administración puede ser sistémica o local.

[329] Las composiciones terapéuticas divulgadas en la presente pueden ser estériles y estables en las condiciones de elaboración y almacenamiento, y se pueden encontrar en una variedad de formas. Incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y de infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. En algunas formas de la Forma de realización, los ADC divulgados se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para una administración parenteral. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de sílex o ámbar, una ampolla o jeringa precargada u otro dispositivo conocido de administración o almacenamiento. En algunas formas de la Forma de realización, uno o más de los ADC o composiciones farmacéuticas se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente y se pueden reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) a la concentración apropiada para la administración a un sujeto.

[330] Típicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad eficaz de una composición divulgada, por ejemplo, un ADC divulgado, se emplea en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. Una composición, por ejemplo, una composición que comprende un ADC, se puede formular en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable mediante métodos convencionales conocidos en el arte. Las dosis y los protocolos de administración para el tratamiento de cánceres usando los métodos anteriores varían según el método y el cáncer blanco, y en general dependerán de una serie de otros factores

adecuados en el arte.

[331] Los regímenes de dosificación para las composiciones divulgadas en la presente, por ejemplo, los que comprenden ADC solos o en combinación con por lo menos un agente terapéutico inactivo y/o activo adicional, se pueden ajustar para proveer una respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo de uno o ambos agentes a la vez, se pueden administrar varias dosis divididas durante un período de tiempo predeterminado o la dosis de uno o ambos agentes se puede aumentar o disminuir proporcionalmente según demandan las exigencias de la situación terapéutica. En algunas formas de realización, el tratamiento involucra un bolo único o la administración repetida de la preparación de ADC por una vía de administración aceptable. En algunas formas de realización, el ADC se administra al paciente diariamente, semanalmente, mensualmente o por cualquier período de tiempo intermedio. Los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar en el tiempo, para cualquier sujeto particular, de acuerdo con las necesidades del individuo y el criterio profesional del médico a cargo del tratamiento. Las composiciones parenterales se pueden formular en la forma de una dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, según se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el vehículo farmacéutico requerido.

[332] Los valores de dosificación de las composiciones que comprenden un ADC y/o cualquier agente terapéutico adicional, se pueden seleccionar en función de las características únicas del compuesto o de los compuestos activos y el efecto terapéutico particular que se desea lograr. Un médico o veterinario puede comenzar con dosis del ADC empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se alcanzar dicho efecto deseado. En general, las dosis eficaces de las composiciones de la presente descripción, para el tratamiento de un cáncer pueden variar dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, el sitio blanco, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. El nivel de dosificación seleccionado también puede depender de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleada, o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros medicamentos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica previa

del paciente bajo tratamiento y factores semejantes. Las dosis de tratamiento se pueden ajustar para optimizar la seguridad y la eficacia.

[333] La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos provistos en la presente se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o en modelos animales. Por ejemplo, se pueden determinar los valores de LD50, ED50, EC50 e IC50, y la relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos (LD50/ED50) se puede calcular como el índice terapéutico. Los datos obtenidos de los ensayos in vitro e in vivo se pueden usar para estimar o formular un rango de dosis para uso en humanos. Por ejemplo, las composiciones y los métodos que se describen en la presente se pueden evaluar inicialmente en modelos de cáncer xenogénicos (por ejemplo, un modelo de ratón con mieloma múltiple NCI-H929).

[334] En algunas formas de realización, se administra un ADC o una composición que comprende un ADC una sola vez. En otras formas de forma de realización, el ADC o una composición que comprende un ADC se administra múltiples veces. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, diarios, semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, de acuerdo con la medición de los niveles en sangre del agente administrado (por ejemplo, el ADC) en el paciente para mantener una concentración plasmática relativamente constante del agente. La dosificación y frecuencia de administración de un ADC o composición que comprende un ADC también puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se puede administrar una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes por un período de tiempo prolongado. Algunos pacientes continuarán recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente más alta a intervalos relativamente más cortos hasta que se reduzca o termine el progreso de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de uno o más síntomas de la enfermedad. Posteriormente, al paciente se le puede administrar, por ejemplo, un régimen profiláctico menor.

[335] Los enfoques terapéuticos precedentes se pueden combinar con cualquiera de una amplia variedad de regímenes quirúrgicos, de quimioterapia o de radioterapia adicionales. En algunas formas de realización, los ADC o las composiciones divulgadas en la presente se formulan conjuntamente y/o se administran conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes quimioterapéuticos, uno o más agentes de cuidado estándar para la condición particular tratada.

[336] También se proveen kits para usar en las aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico que se describen en la presente. Dichos kits pueden comprender un vehículo, envase o

recipiente que está compartimentalizado para recibir uno o más recipientes, tales como viales, tubos y semejantes, y cada uno de los recipientes comprende uno de los elementos separados que se utilizarán en un método divulgado. Puede haber una etiqueta sobre o junto con dichos uno o más recipientes para indicar que un ADC o composición del kit se usará para una terapia específica o en una aplicación no terapéutica, tal como una aplicación de pronóstico, profiláctica, de diagnóstico o de laboratorio. La etiqueta también puede comprender usos ya sean in vivo o in vitro, tales como los que se describen en la presente. También se pueden incluir instrucciones y/u otra información en uno o más prospectos o etiquetas, incluidos con o sobre el kit. La etiqueta puede estar sobre o asociada con el recipiente. La etiqueta estará sobre un recipiente cuando las letras, números u otros caracteres que conforman la etiqueta están moldeados o grabados en el propio recipiente. Puede haber una etiqueta asociada con un recipiente cuando está presente en un receptáculo o vehículo que también contiene al recipiente, por ejemplo, tal como un prospecto. La etiqueta puede indicar que un ADC o una composición del kit se usa para diagnosticar o tratar una condición, tal como un cáncer descrito en la presente.

[337] En algunas formas de realización, un kit comprende un ADC o una composición que comprende un ADC. En algunas formas de realización, el kit comprende además uno o más componentes adicionales, incluyendo pero en un sentido no taxativo: instrucciones para su uso; otros reactivos, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de cuidado estándar); dispositivos, recipientes u otros materiales para preparar el ADC para la administración; vehículos farmacéuticamente aceptables; y dispositivos, recipientes u otros materiales para administrar el a un sujeto. Las instrucciones de uso pueden incluir un lineamiento para aplicaciones terapéuticas que incluyen dosificaciones y/o modos de administración sugeridos, por ejemplo, para un paciente que padece o está sospechado de padecer un cáncer. En algunas formas de realización, el kit comprende un ADC e instrucciones para usar el ADC en el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de un cáncer.

TERAPIAS COMBINADAS

[338] En algunas formas de realización, la presente divulgación provee métodos de tratamiento en donde los conjugados de anticuerpo-fármaco que se divulgan en la presente se administran en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En la presente se divulgan ejemplos de miembros de combinación.

[339] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de PD-1. En algunas formas de realización, el inhibidor de PD-1 se selecciona entre PDR001 (Novartis), Nivolumab (Bristol-Myers Squibb), Pembrolizumab (Merck & Co), Pidilizumab (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron),

TSR-042 (Tesaro), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte) o AMP-224 (Amplimmune). En algunas formas de realización, el inhibidor de PD-1 es PDR001. PDR001 también se conoce como Spartalizumab.

[340] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de LAG-3. En algunas formas de realización, el inhibidor de LAG-3 se selecciona entre LAG525 (Novartis), BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb) o TSR-033 (Tesaro).

[341] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de TIM-3. En algunas formas de realización, el inhibidor de TIM-3 es MBG453 (Novartis), TSR-022 (Tesaro), LY-3321367 (Eli Lily), Sym23 (Symphogen), BGB-A425 (Beigene), INCAGN-2390 (Agenus), BMS-986258 (BMS), RO-7121661 (Roche) o LY-3415244 (Eli Lilly).

[342] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de PDL1. En una forma de realización, el inhibidor de PDL1 se selecciona entre FAZ053 (Novartis), atezolizumab (Genentech), durvalumab (Astra Zeneca) o avelumab (Pfizer).

[343] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un agonista de GITR. En algunas formas de realización, el agonista de GITR se selecciona entre GWN323 (NVS), BMS-986156, MK-4166 o MK-1248 (Merck), TRX518 (Leap Therapeutics), INCAGN1876 (Incyte/Agenus), AMG 228 (Amgen) o INBRX-110 (Inhibrx).

[344] En algunas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de IAP. En algunas formas de realización, el inhibidor de IAP comprende LCL161 o un compuesto divulgado en la publicación de Solicitud Internacional Nº: WO 2008/016893.

[345] En una forma de realización, la combinación comprende un inhibidor de mTOR, por ejemplo, RAD001 (también conocido como everolimus).

[346] En una forma de realización, la combinación comprende un inhibidor de HDAC, por ejemplo, LBH589. LBH589 también se conoce como panobinostat.

[347] En una forma de realización, la combinación comprende un inhibidor de IL-17, por ejemplo, CJM112.

[348] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un antagonista del receptor de estrógeno (ER). En algunas formas de realización, el antagonista del receptor de estrógeno se usa en combinación con un inhibidor de PD-1, un inhibidor de CDK4/6 o ambos. En algunas formas de realización, la combinación se usa para tratar un cáncer ER positivo (ER+) o un cáncer de mama (por ejemplo, un cáncer de mama ER+).

[349] En algunas formas de realización, el antagonista del receptor de estrógeno es un degradador selectivo del receptor de estrógeno (SERD). Los SERD son antagonistas del receptor de estrógeno que se unen al receptor y dan como resultado, por ejemplo, la degradación o expresión disminuida del receptor (Boer K. *et al.*, (2017) *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 9(7): 465-479). El ER es un factor de la transcripción activado por hormonas que es importante, por ejemplo, el crecimiento, desarrollo y fisiología del sistema human reproductor humano. El ER es activado, por ejemplo, por la hormona estrógeno (17beta-estradiol). La expresión y señalización de ER están implicadas en diversos tipos de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama), por ejemplo, cáncer de mama ER positivo (ER+). En algunas formas de realización, el SERD se selecciona entre LSZ102, fulvestrant, brilanestrant o elacestrant.

[350] En algunas formas de realización, el SERD comprende un compuesto divulgado en la publicación de Solicitud Internacional Nº: WO 2014/130310, que se incorpora por completa a modo de referencia.

[351] En algunas formas de realización, el SERD comprende LSZ102. El nombre químico de LSZ102 es: ácido (E)-3-(4-((2-(2-(1,1-difluoroetil)-4-fluorofenil)-6-hidroxibenzo[b]tiofen-3-il)oxi)fenil)acrílico. En algunas formas de realización, el SERD comprende fulvestrant (CAS, Nº de registro: 129453-61-8), o un compuesto divulgado en la publicación de Solicitud Internacional Nº: WO 2001/051056, que se incorpora por completa a modo de referencia. En algunas formas de realización, el SERD comprende elacestrant (CAS, Nº de registro: 722533-56-4), o un compuesto divulgado en la Patente de los EEUU N°: 7.612.114, que se incorpora por completo a modo de referencia. Elacestrant también se conoce como RAD1901, ER-306323 o (6R)-6-{2-[etil({4-[2-(etilamino)etil]fenil}metil)amino]-4-metoxifenil}-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol. El elacestrant es un modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM) no esteroide combinado, biodisponible por vía oral y un SERD. El elacestrant también se divulga, por ejemplo, en Garner F *et al.*, (2015) *Anticancer Drugs* 26(9): 948-56. En algunas formas de realización, el SERD es brilanestrant (CAS, Nº de registro: 1365888-06-7), o un compuesto divulgado en la publicación de Solicitud Internacional Nº: WO 2015/136017, que se incorpora por completo a modo de referencia.

[352] En algunas formas de realización, el SERD se selecciona entre RU 58668, GW7604, AZD9496, bazedoxifeno, pipendoxifeno, arzoxifeno, OP-1074 o acolbifeno, por ejemplo, como se divulga en McDonell *et al.,* (2015) *Journal of Medicinal Chemistry* 58(12) 4883-4887.

[353] Otros ejemplos de antagonistas del receptor de estrógeno se divulgan, por ejemplo, en WO 2011/156518, WO 2011/159769, WO 2012/037410, WO 2012/037411 y US 2012/0071535, todas las cuales se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

[354] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de quinasas dependiente de ciclina 4 ó 6 (CDK4/6). En algunas formas de realización, el inhibidor de CDK4/6 se usa en combinación con un inhibidor de PD-1, un antagonista del receptor de estrógeno (ER) o ambos. En algunas formas de realización, la combinación se usa para tratar un cáncer ER positivo (ER+) o un cáncer de mama (por ejemplo, un cáncer de mama ER+). En algunas formas de realización, el inhibidor de CDK4/6 se selecciona entre ribociclib, abemaciclib (Eli Lilly) o palbociclib.

[355] En algunas formas de realización, el inhibidor de CDK4/6 comprende ribociclib (CAS, Nº de registro: 1211441-98-3), o un compuesto divulgado en las Patentes de los EEUU N°: 8.415.355 y 8.685.980, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

[356] En algunas formas de realización, el inhibidor de CDK4/6 comprende un compuesto divulgado en la publicación de Solicitud Internacional Nº: WO 2010/020675 y en las Patentes de los EEUU N°: 8.415.355 y 8.685.980, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

[357] En algunas formas de realización, el inhibidor de CDK4/6 comprende ribociclib (CAS, Nº de registro: 1211441-98-3). Ribociclib también se conoce como LEE011, KISQALI®, o 7-ciclopentil-N,N-dimetil-2-((5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)amino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina-6-carboxamida.

[358] En algunas formas de realización, el inhibidor de CDK4/6 comprende abemaciclib (CAS, Nº de registro: 1231929-97-7). Abemaciclib también se conoce como LY835219 o N-[5-[(4-etil-1-piperazinil)metil]-2-piridinil]-5-fluoro-4-[4-fluoro-2-metil-1-(1-metiletil)-1H-benzimidazol-6-il]-2-pirimidinamina. Abemaciclib es un inhibidor de CDK selectivo para CDK4 y CDK6 y se divulga, por ejemplo, en Torres-Guzman R *et al.,* (2017) *Oncotarget* 10.18632/oncotarget.17778.

[359] En algunas formas de realización, el inhibidor de CDK4/6 comprende palbociclib (CAS, Nº de registro: 571190-30-2). Palbociclib también se conoce como PD-0332991, IBRANCE® o 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-{[5-(1-piperazinil)-2-piridinil]amino}pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona. Palbociclib inhibe CDK4 con un valor de IC50 de 11 nM, e inhibe CDK6 con un valor de IC50 de 16 nM, y se divulga, por ejemplo, en Finn *et al.,* (2009) *Breast Cancer Research* 11(5): R77.

[360] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor del receptor 2 de quimioquinas (motivo C-X-C) (CXCR2). En algunas formas de realización, el inhibidor de CXCR2 se selecciona entre 6-cloro-3-((3,4-dioxo-2-(pentan-3-ilamino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-2-hidroxi-N-metoxi-N-metilbencensulfonamida, danirixina, reparixina o navarixina.

[361] En algunas formas de realización, el agente de unión a CSF-1/1R se selecciona entre

un inhibidor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o Fab para M-CSF (por ejemplo, MCS110), un inhibidor de la tirosina quinasa CSF-1R (por ejemplo, 4-((2-(((1R,2R)-2-hidroxiciclohexil)amino)benzo[d]tiazol-6-il)oxi)-N-metilpicolinamida o BLZ945), un inhibidor de tirosina quinasa de receptor (RTK) (por ejemplo, pexidartinib) o un anticuerpo dirigido contra CSF-1R (por ejemplo, emactuzumab o FPA008). En algunas formas de realización, el inhibidor de CSF-1/1R es BLZ945. En algunas formas de realización, el agente de unión a CSF-1/1R es MCS110. En otras formas de forma de realización, el agente de unión a CSF-1/1R es pexidartinib.

[362] En algunas formas de forma de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de c-MET. El c-MET, una tirosina quinasa de receptor sobreexpresado o mutado en muchos tipos de células tumorales, cumple una función clave en la proliferación, supervivencia, invasión, metástasis y angiogénesis tumoral. La inhibición de c-MET puede inducir muerte celular en células tumorales que sobreexpresan la proteína c-MET o que expresan la proteína c-MET activada constitutivamente. En algunas formas de realización, el inhibidor de c-MET se selecciona entre capmatinib (INC280), JNJ-3887605, AMG 337, LY2801653, MSC2156119J, crizotinib, tivantinib o golvatinib.

[363] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor del factor beta del crecimiento transformante (también conocido como TGF-β TGFβ, TGFb o TGF-beta, todos utilizados indistintamente en la presente). En algunas formas de realización, el inhibidor de TGF-β se selecciona entre fresolimumab o XOMA 089.

[364] En algunas formas de forma de realización, una combinación descrita en la presente comprende un antagonista del receptor de adenosina A2a (A2aR) (por ejemplo, un inhibidor de la vía A2aR, por ejemplo, un inhibidor de adenosina, por ejemplo, un inhibidor de A2aR o CD-73). En algunas formas de realización, el antagonista de A2aR se usa en combinación con un inhibidor de PD-1, y uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o todos) entre un inhibidor de CXCR2, un agente de unión CSF-1/1R, un inhibidor de LAG-3, un agonista de GITR, un inhibidor de c-MET o un inhibidor de IDO. En algunas formas de realización, la combinación se usa para tratar un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal, un cáncer gástrico o un melanoma (por ejemplo, un melanoma refractario). En algunas formas de realización, el antagonista de A2aR se selecciona entre PBF509 (NIR178) (Palobiofarma/Novartis), CPI444/V81444 (Corvus/Genentech), AZD4635/HTL-1071 (AstraZeneca/Heptares), Vipadenant (Redox/Juno), GBV-2034 (Globavir), AB928 (Arcus Biosciences), Teofilina, Istradefilina (Kyowa Hakko Kogyo), Tozadenant/SYN-115 (Acorda), KW-6356 (Kyowa Hakko Kogyo), ST-4206 (Leadiant Biosciences) o Preladenant/SCH 420814 (Merck/Schering). Sin considerar una teoría particular, se cree que en algunas formas de realización, la inhibición de A2aR conduce al aumento de la expresión de la IL-1b.

[365] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) y/o de la triptofano-2,3-dioxigenasa (TDO). En algunas formas de realización, el inhibidor de IDO se usa en combinación con un inhibidor de PD-1, y uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o todos) entre un inhibidor de TGF-β, un antagonista de A2aR, un agente de unión de CSF-1/1R, un inhibidor de c-MET o un agonista de GITR. En algunas formas de realización, la combinación se usa para tratar un cáncer de páncreas, un cáncer colorrectal, un cáncer gástrico o un melanoma (por ejemplo, un melanoma refractario). En algunas formas de realización, el inhibidor de IDO se selecciona entre (4E)-4-[(3-cloro-4-fluoroanilino)-nitrosometiliden]-1,2,5-oxadiazol-3-amina (también conocida como epacadostat o INCB24360), indoximod (NLG8189), (1-metil-D-triptofano), α-ciclohexil-5H-imidazo[5,1-a]isoindol-5-etanol (también conocido como NLG919), indoximod, BMS-986205 (antes F001287).

[366] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de galectina, por ejemplo, galectina-1 o galectina-3. En algunas formas de realización, la combinación comprende galectina-1 y un inhibidor de galectina-3. En algunas formas de realización, la combinación comprende un inhibidor biespecífico (por ejemplo, una molécula de anticuerpo biespecífica) dirigido a ambas galectina-1 y galectina-3. En algunas formas de realización, el inhibidor de galectina se usa en combinación con uno o más de los agentes terapéuticos que se describen en la presente. En algunas formas de realización, el inhibidor de galectina se selecciona entre una molécula de anticuerpo anti-galectina, GR-MD-02 (Galectina Therapeutics), galectina-3C (Mandal Med), Anginex u OTX-008 (OncoEthix, Merck).

[367] En algunas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor de MEK. En algunas formas de realización, el inhibidor de MEK se selecciona entre trametinib, selumetinib, AS703026, BIX 02189, BIX 02188, CI-1040, PD0325901, PD98059, U0126, XL-518, G-38963 o G02443714. En algunas formas de realización, el inhibidor de MEK es trametinib.

[368] En una forma de realización, una combinación descrita en la presente incluye un inhibidor de la interleuquina-1 beta (IL-1β). En algunas formas de realización, el inhibidor de IL-1β se selecciona entre canakinumab, gevokizumab, anakinra o rilonacept.

[369] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un complejo de IL-15/IL-15Ra. En algunas formas de realización, el complejo de IL-15/IL-15Ra se selecciona entre NIZ985 (Novartis), ATL-803 (Altor) o CYP0150 (Cytune).

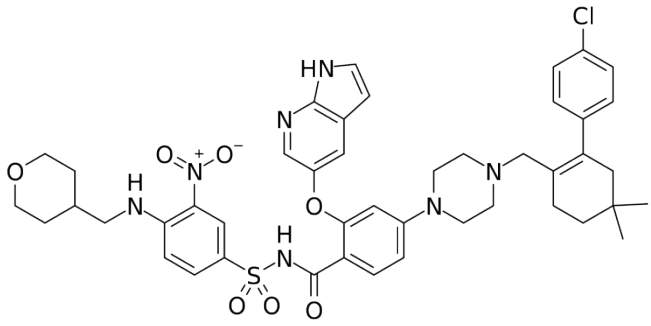
[370] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor del homólogo diminuto doble 2 de ratón (MDM2). El homólogo humano de MDM2 también se conoce como HDM2. En algunas formas de realización, un

inhibidor de MDM2 descrito en la presente también se conoce como un inhibidor de HDM2. En algunas formas de realización, el inhibidor de MDM2 se selecciona entre HDM201 o CGM097.

[371] En una forma de realización el inhibidor de MDM2 comprende (S)-1-(4-clorofenil)-7-isopropoxi-6-metoxi-2-(4-(metil(((1r,4S)-4-(4-metil-3-oxopiperazin-1-il)ciclohexil)metil)amino)fenil)-1,2-dihidroisoquinolin-3(4H)-ona (también conocida como CGM097) o un compuesto divulgado en la publicación PCT Nº: WO 2011/076786 para tratar un trastorno, por ejemplo, un trastorno descrito en la presente). En una forma de realización, un agente terapéutico divulgado en la presente se usa en combinación con CGM097.

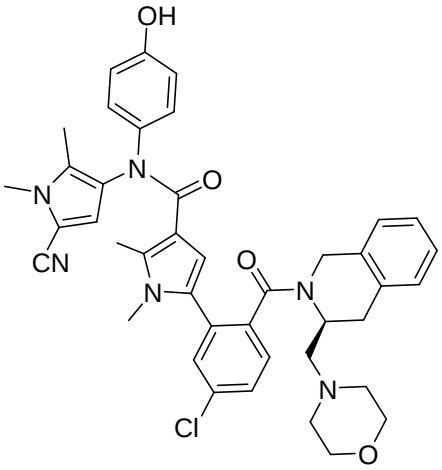
[372] En algunas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un agente hipometilante (HMA). En algunas formas de realización, el HMA se selecciona entre decitabine o azacitidine.

[373] En determinadas formas de realización, una combinación descrita en la presente comprende un inhibidor que actúa sobre proteínas pro-supervivencia de la familia Bcl2. En algunas formas de realización, el inhibidor de Bcl-2 es venetoclax.

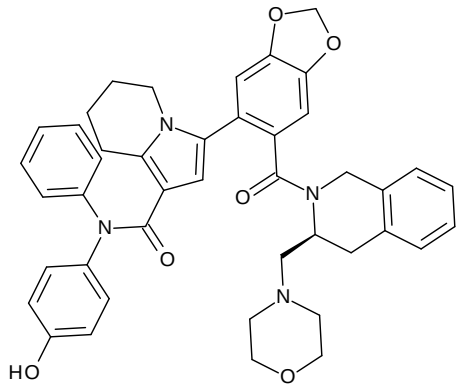


(venetoclax)

En una forma de realización, el inhibidor de Bcl-2 se selecciona entre los compuestos que se describe en WO 2013/110890 y WO 2015/011400. En algunas formas de realización, el inhibidor de Bcl-2 comprende navitoclax (ABT-263), ABT-737, BP1002, SPC2996, APG-1252, obatoclax mesilato (GX15-070MS), PNT2258, Zn-d5, BGB-11417 u oblimersen (G3139). En algunas formas de realización, el inhibidor de Bcl-2 es (S)-5-(5-cloro-2-(3-(morfolinometil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carbonil)fenil)-N-(5-ciano-1,2-dimetil-1H-pirrol-3-il)-N-(4-hidroxifenil)-1,2-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida), compuesto A1:



(compuesto A1). En algunas formas de realización, el inhibidor de Bcl-2 es N-(4-hidroxifenil)-3-[6-[(3S)-3-(morfolinometil)-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-2-carbonyl]-1,3-benzodioxol-5-il]-N-fenil-5,6,7,8-tetrahidroindolizin-1-carboxamida, compuesto A2:



(compuesto A2).

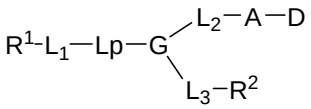
[374] En una forma de realización, los conjugados de anticuerpo-fármaco o las combinaciones que se divulgan en la presente son adecuados para el tratamiento de cáncer *in vivo*. Por ejemplo, la combinación se puede usar para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. La combinación también se puede usar en combinación con uno o más entre: un tratamiento de cuidado estándar (por ejemplo, para cánceres o trastornos infecciosos), una vacuna (por ejemplo, una vacuna terapéutica contra el cáncer), una terapia celular, una terapia de radiación, cirugía o cualquier otro agente o modalidad terapéutica, para tratar un trastorno en la presente. Por ejemplo, para lograr una mejora de la inmunidad específica de antígenos, la combinación se puede administrar junto con un antígeno de interés. Una combinación divulgada en la presente se puede administrar en cualquier orden o de manera simultánea.

FORMAS DE REALIZACIÓN ADICIONALES

[375] La divulgación provee las siguientes formas de realización adicionales para los grupos de conector-fármaco, conjugados de anticuerpo-fármaco, grupos conectores y métodos de conjugación.

Grupos de conector-fármaco

En algunas formas de realización, el grupo de conector-fármaco de la invención puede ser un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (A'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Fórmula (A')

en donde:

R^1 es un grupo reactivo;

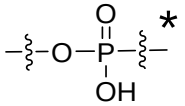
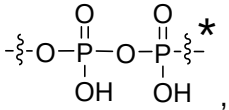
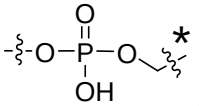
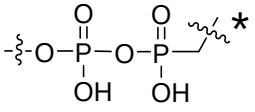
L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente;

G-L_2-A es un espaciador autoescindible;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora; y

D es una unidad de fármaco que puede inhibir la actividad de la proteína MCl-1, por ejemplo, cuando es liberada de los conjugados de anticuerpo-fármaco o inmunoconjugados que se divulgan en la presente.

El siguiente listado de las Formas de realización numeradas provee determinados aspectos y ejemplos de los grupos de conector-fármaco de la invención. Se comprenderá que las características especificadas en cada forma de realización se pueden combinar con otras características especificadas a fin de proveer formas de realización adicionales de la presente invención.

Forma de realización 1. El compuesto de la Fórmula (A'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 es un grupo reactivo;

L_1 es un espaciador formador de puentes;

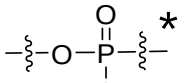
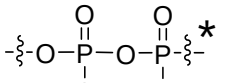
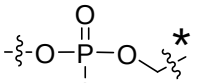
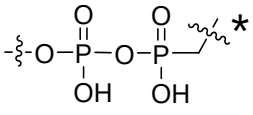
Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de

aminoácidos;

G-L_2-A es un espaciador autoescindible;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora; y

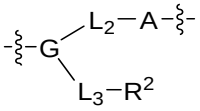
D es una unidad de fármaco definida en la presente, por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1.

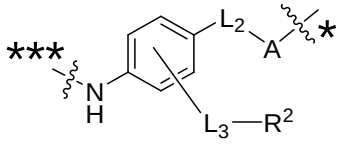
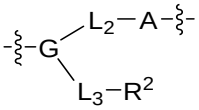
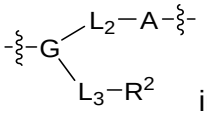
Forma de realización 2. El compuesto de la Fórmula (A'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 es un grupo reactivo;

L_1 es un espaciador formador de puentes;

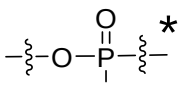
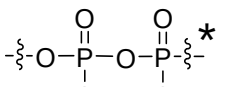
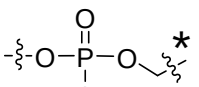
Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos;

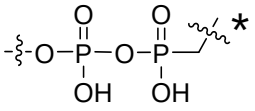
el grupo  se selecciona entre:

 , en donde * de  indica el punto de unión a D (por ejemplo, a un N u O de la unidad de fármaco), *** de  indica el punto de unión a Lp;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,

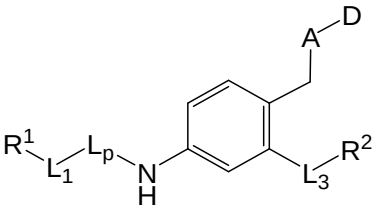


, -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora; y

D es una unidad de fármaco definida en la presente, por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1.

Forma de realización 3. El compuesto de la Fórmula (A'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de la Fórmula (B'):



Fórmula (B')

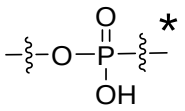
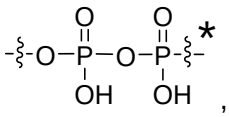
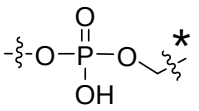
en donde:

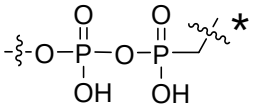
R^1 es un grupo reactivo;

L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos;

R^2 es una unidad hidrofílica;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,

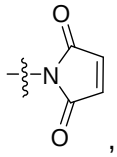
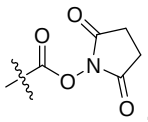
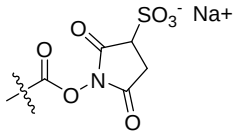
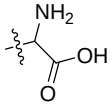
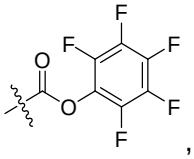
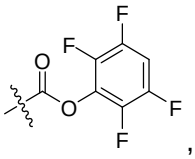
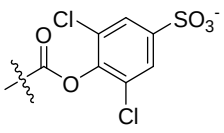
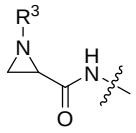
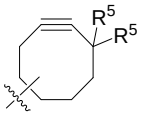
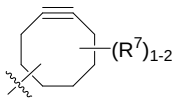
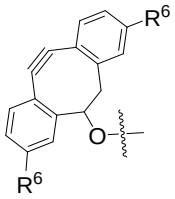
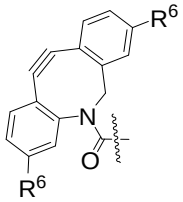
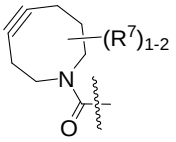
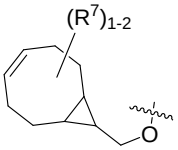
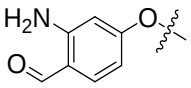
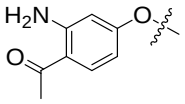
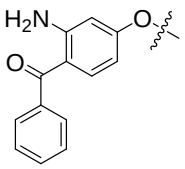
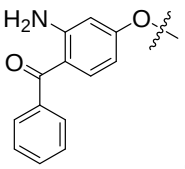
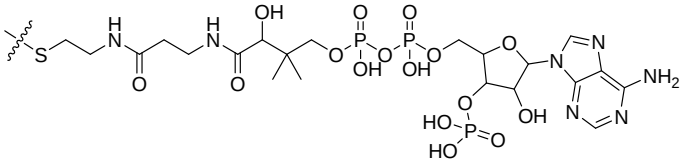
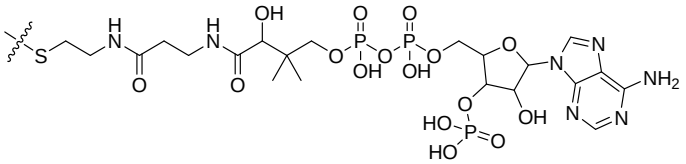
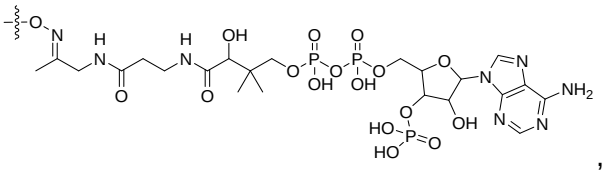
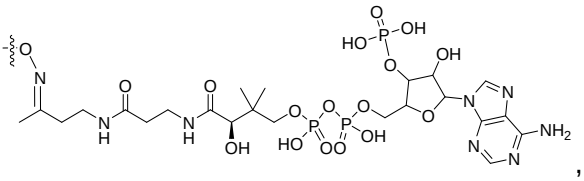
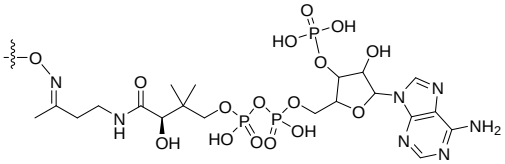
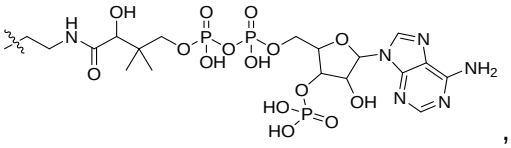
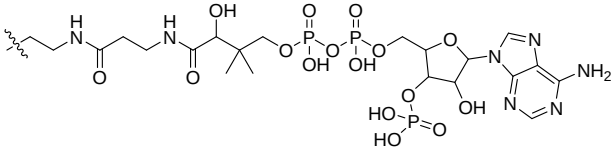


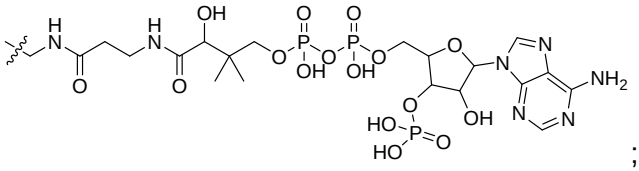
, -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

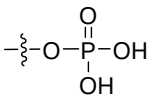
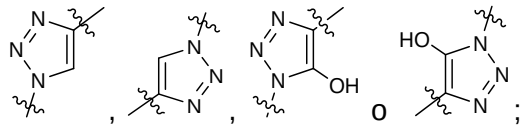
L_3 es una unidad espaciadora; y

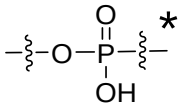
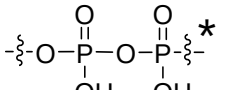
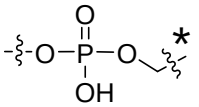
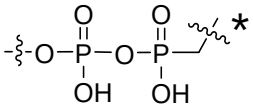
D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco.

Forma de realización 4. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 es  , $-ONH_2$, $-NH_2$,  ,  ,  ,  ,  ,  , $-N_3$, , -SH, $-SR^3$, $-SSR^4$, $-S(=O)_2(CH=CH_2)$, $-(CH_2)_2S(=O)_2(CH=CH_2)$, $-NHS(=O)_2(CH=CH_2)$, $-NHC(=O)CH_2Br$, $-NHC(=O)CH_2I$,  , $-C(O)NHNH_2$,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , o

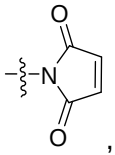
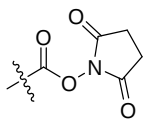
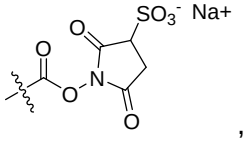
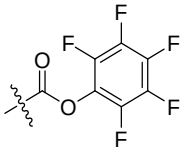
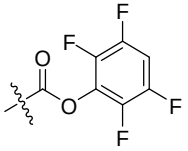

;

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$-**;
*-C(=O)$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)NH(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$-**; *-
C(=O)O$(CH_2)_m$SSC(R^3)$_2$$(CH_2)_m$C(=O)N$R^3$$(CH_2)_mNR^3$C(=O)$(CH_2)_m$-**;
*-C(=O)O$(CH_2)_m$C(=O)NH$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$NH$(CH_2)_m$-**;
*-C(=O)$(CH_2)_m$NH$(CH_2)_n$C(=O)-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$$X_1$$(CH_2)_m$-**;
*-C(=O)(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$$X_1$$(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-**;
*-C(=O)(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-**;
*-C(=O)$(CH_2)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$$X_1$$(CH_2)_n$-**;
*-C(=O)(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$$X_1$$(CH_2)_n$-**;
*-C(=O)(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$C(=O)NH$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$C($R^3$)$_2$-**; o
*-C(=O)$(CH_2)_m$C(=O)NH$(CH_2)_m$-**,
donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1;
R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar,
un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;
cada R^3 se selecciona de manera independiente entre H y C_1-C_6alquilo;
R^4 es 2-piridilo o 4-piridilo;
cada R^5 se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo, F, Cl y –OH;
cada R^6 se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo, F, Cl, -NH_2, -OCH_3, -OCH_2CH_3, -$N(CH_3)_2$, -CN, -NO_2 y –OH;
cada R^7 se selecciona de manera independiente entre H, C_{1-6}alquilo, fluoro, benciloxi sustituido con –C(=O)OH, bencilo sustituido con –C(=O)OH, C_{1-4}alcoxi sustituido con –C(=O)OH y C_{1-4}alquilo sustituido con –C(=O)OH;
X_1 es  ;
cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;
Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende un residuo de aminoácido seleccionado entre glicina, valina, citrulina, lisina, isoleucina, fenilalanina, metionina, asparagina, prolina, alanina, leucina, triptofano y tirosina;

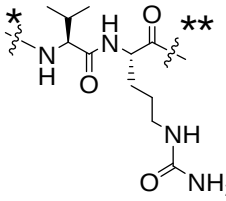
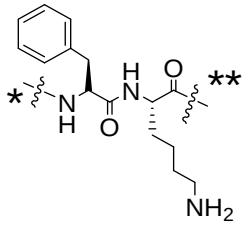
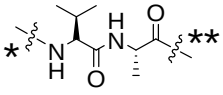
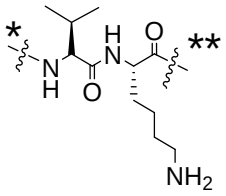
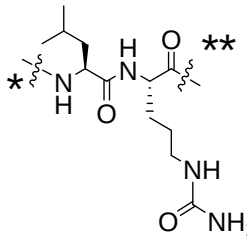
A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,
donde
W es -CH_2O-**, -CH_2N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NHC(=O)O-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NH-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NHC(=O)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -S(O)$_2$NH-**, -NHS(O)$_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;
X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2; y
* de L_3 indica el punto de unión a R^2;
y
D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco.

Forma de realización 5. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 es  , -ONH_2,  ,  ,  o  ;

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_m$O$)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH$((CH_2)_m$O$)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1;
cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit),  (PheLys),  (ValAla),  (ValLys) y  (LeuCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo –NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

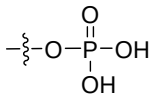
donde

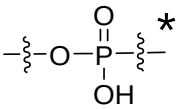
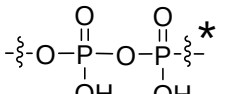
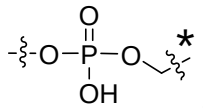
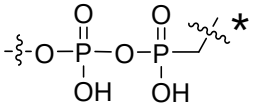
W es $-CH_2O-$**, $-CH_2N(R^b)C(=O)O-$**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-$**, $-NHC(=O)CH_2NH-$**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)-$**, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)O-$**, $-C(=O)N(X-R^2)-$**, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)-$**, $-C(=O)NR^b-$**, $-C(=O)NH-$**, $-CH_2NR^bC(=O)-$**, $-CH_2NR^bC(=O)NH-$**, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b-$**, $-NHC(=O)-$**, $-NHC(=O)O-$**, $-NHC(=O)NH-$**, $-OC(=O)NH-$**, $-S(O)_2NH-$**, $-NHS(O)_2-$**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

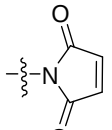
R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , $-OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-$* o -

$OC(=O)N(CH_3)C(R^a)_2C(R^a)_2N(CH_3)C(=O)$-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D; y

D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco.

Forma de realización 6. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

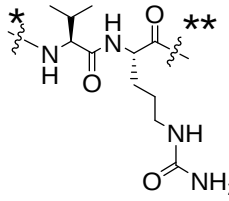
R^1 es  ;

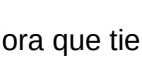
L_1 es *-$C(=O)(CH_2)_mO(CH_2)_m$-**; *-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-$C(=O)(CH_2)_m$-**; o *-$C(=O)NH((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo –NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

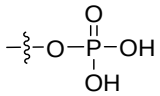
W es -CH_2O-**, -$CH_2N(R^b)C(=O)O$-**, -$NHC(=O)CH_2NHC(=O)O$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, -$C(=O)N(X\text{-}R^2)$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)$-**, -$C(=O)NR^b$-**, -C(=O)NH-**, -$CH_2NR^bC(=O)$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NH$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NR^b$-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -$OC(=O)NH$-**, -$S(O)_2NH$-**, -$NHS(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

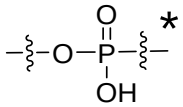
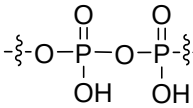
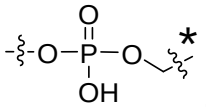
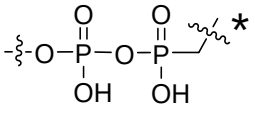
X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar,

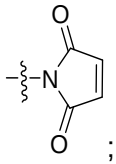
un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

y

D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco.

Forma de realización 7. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

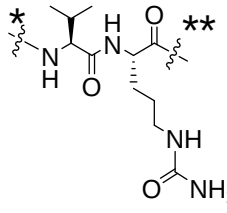
R^1 es  ;

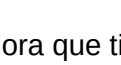
L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)(($CH_2)_m$O)$_t$($CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH(($CH_2)_m$O)$_t$($CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

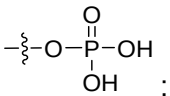
W es -CH_2O-**, -CH_2N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -

$CH_2NR^bC(=O)NR^b$-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-** o -NHC(=O)NH-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indican el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

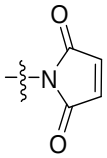
R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

A es un enlace o -OC(=O)*, en donde * indica el punto de unión a D;

y

D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco.

Forma de realización 8. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

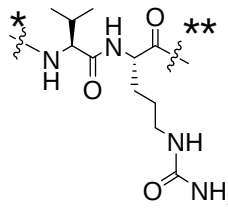
R^1 es  ;

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)(($CH_2)_m$O)$_t$($CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH(($CH_2)_m$O)$_t$($CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo –NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura ,

donde

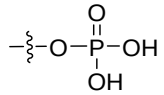
W es -CH_2O-**, -CH_2N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, o

-C(=O)N(X-R^2)-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

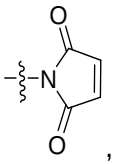
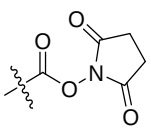
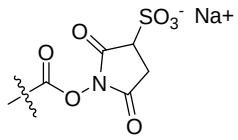
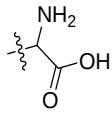
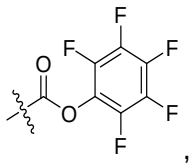
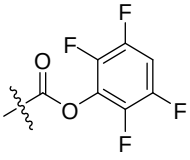
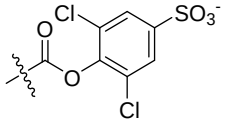
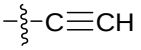
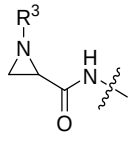
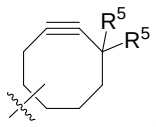
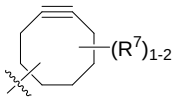
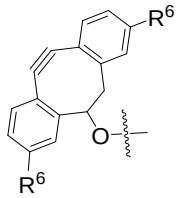
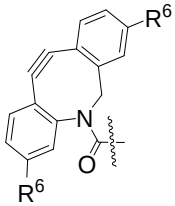
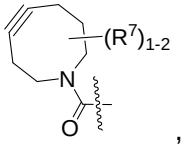
A es un enlace o -OC(=O)* en donde * indica el punto de unión a D;

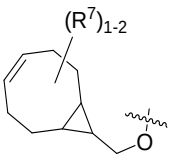
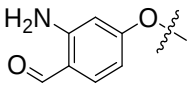
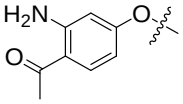
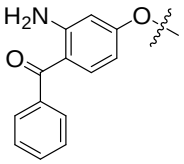
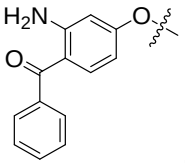
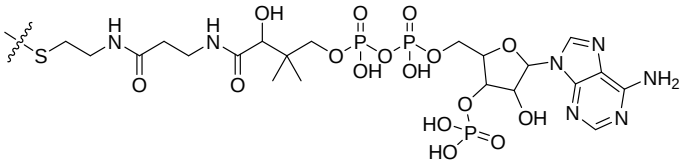
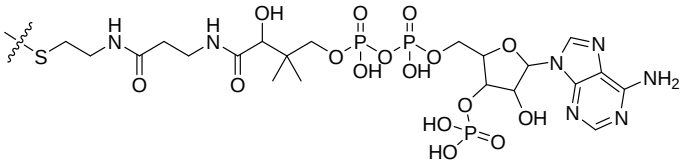
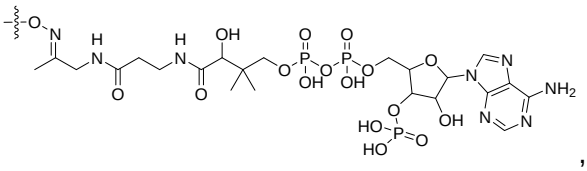
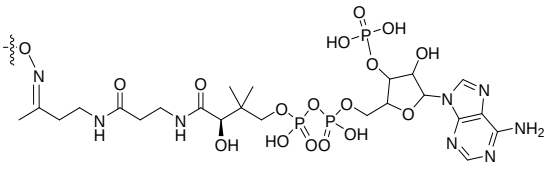
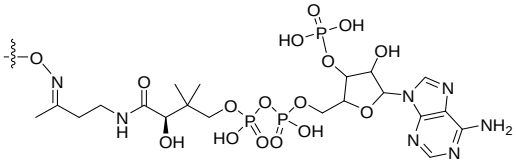
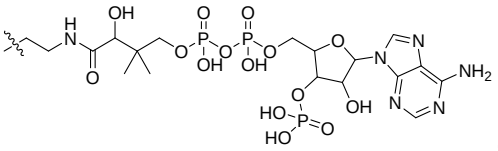
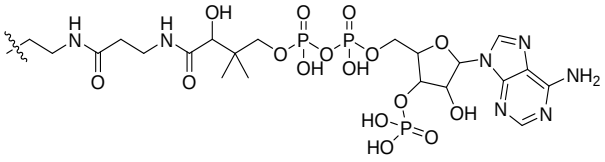
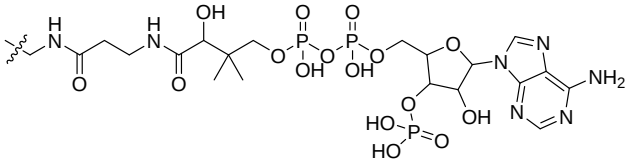
y

D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco.

Forma de realización 9. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es un grupo reactivo seleccionado entre Tabla 8.

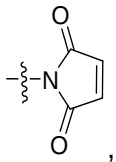
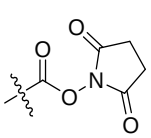
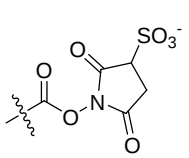
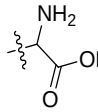
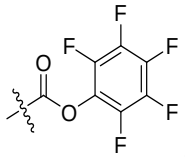
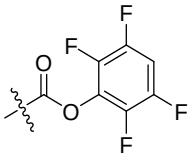
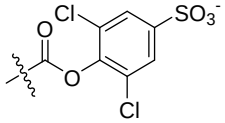
Forma de realización 10. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

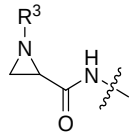
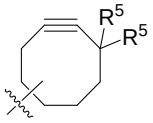
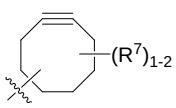
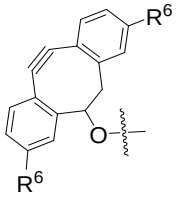
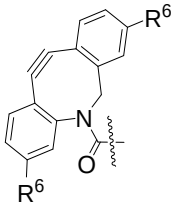
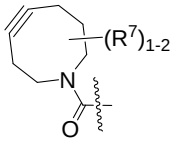
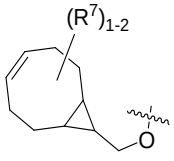
R^1 es  , -ONH_2, -NH_2,  ,  ,  ,  ,  ,  , -N_3,  , -SH, -SR^3, -SSR^4, -$S(=O)_2(CH=CH_2)$, -$(CH_2)_2S(=O)_2(CH=CH_2)$, -$NHS(=O)_2(CH=CH_2)$, -$NHC(=O)CH_2Br$, -$NHC(=O)CH_2I$,  , -$C(O)NHNH_2$,  ,  ,  ,  ,  ,

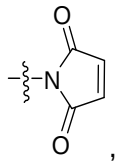
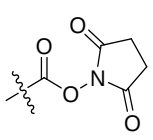
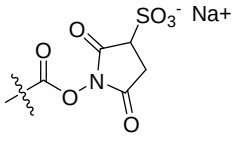
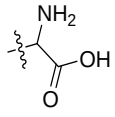
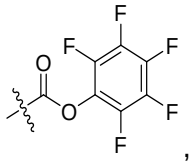
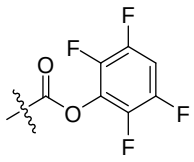
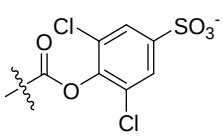
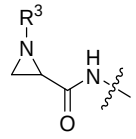
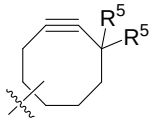
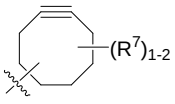
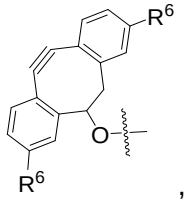
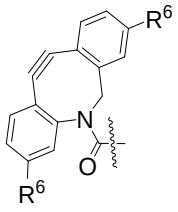
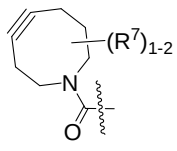
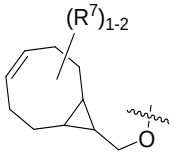
o

Forma de realización 11. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

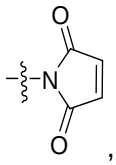
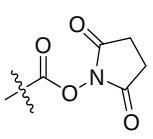
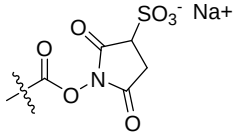
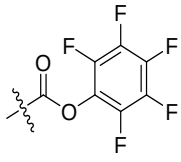
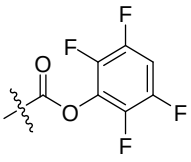
R^1 es  , $-ONH_2$, $-NH_2$,  ,  ,  ,  ,  ,  , $-N_3$,  , -SH, $-SR^3$, $-SSR^4$, $-S(=O)_2(CH=CH_2)$, -

$(CH_2)_2S(=O)_2(CH=CH_2)$, $-NHS(=O)_2(CH=CH_2)$, $-NHC(=O)CH_2Br$, $-NHC(=O)CH_2I$,  , $-C(O)NHNH_2$,  ,  ,  ,  ,  , o  .

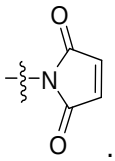
Forma de realización 12. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 es  , $-ONH_2$,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , $-$  ,  ,  ,  ,  , o  .

Forma de realización 13. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R^1 es  , $-ONH_2$,  ,  ,  , o  .

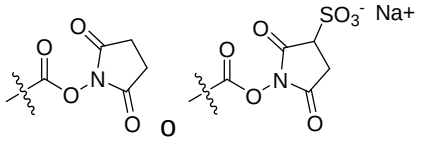
Forma de realización 14. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es



.

Forma de realización 15. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 es -ONH_2.

Forma de realización 16. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde: R^1 es

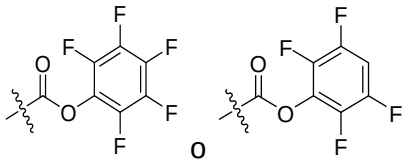


o

.

Forma de realización 17. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

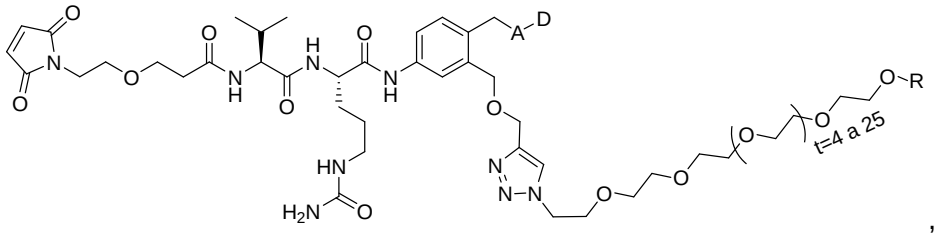
R^1 es



o

.

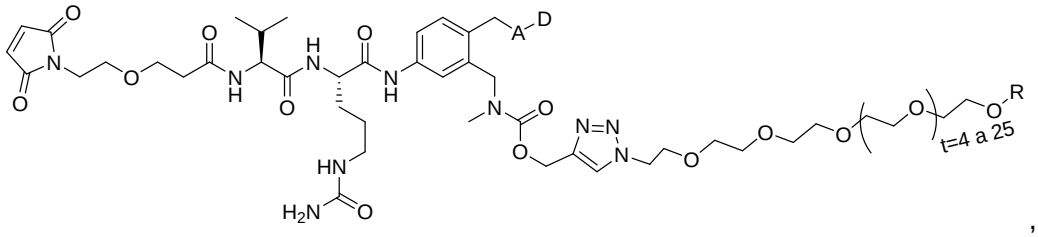
Forma de realización 18. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



,

donde R es H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 19. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:

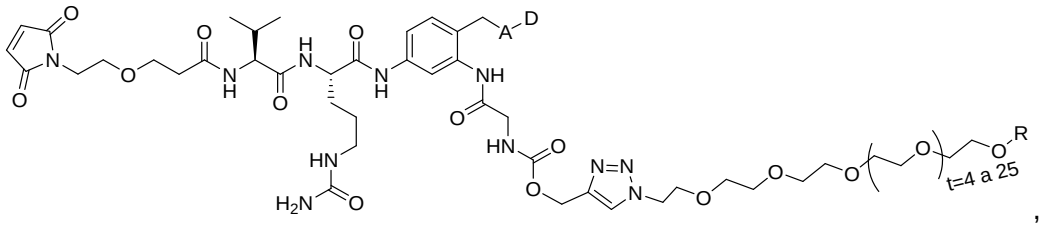


,

donde R es H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$.

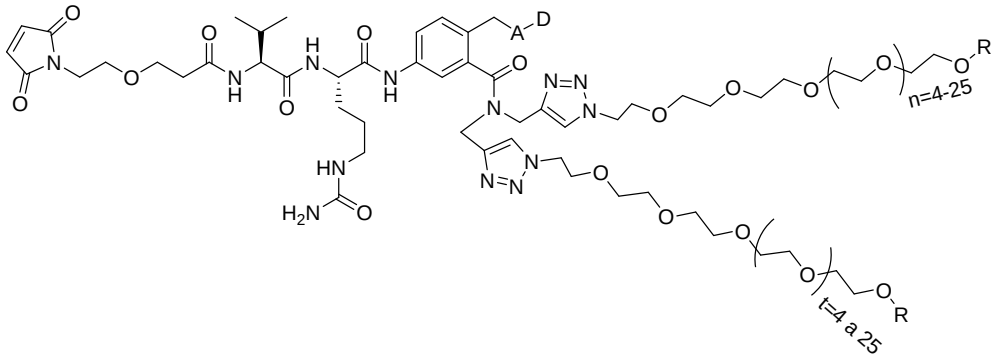
Forma de realización 20. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas

de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



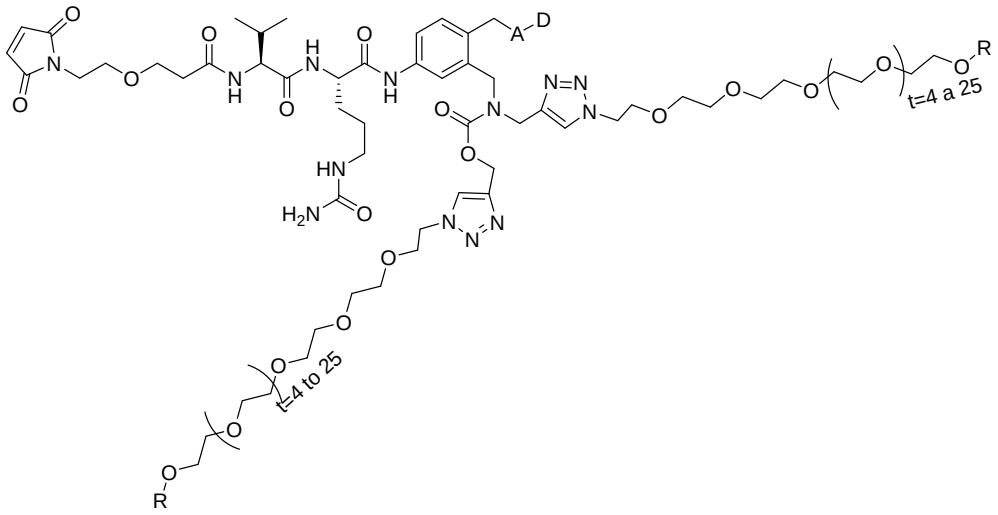
donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 21. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



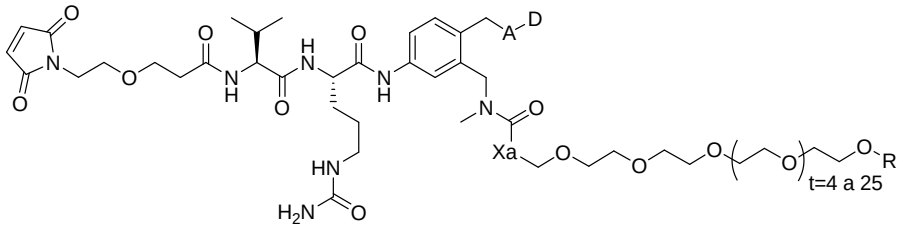
donde cada R se selecciona de manera independiente entre H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 22. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



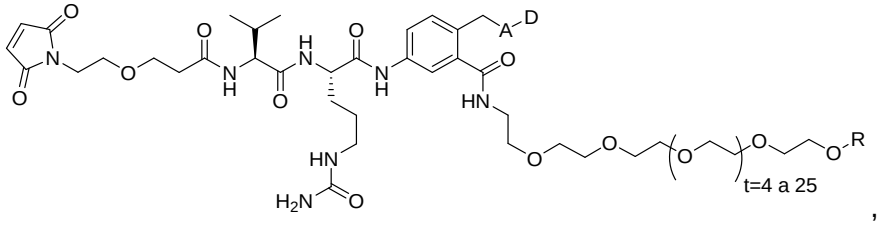
donde cada R se selecciona de manera independiente entre H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 23. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



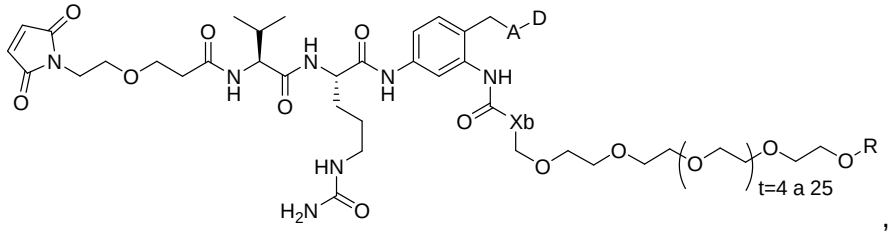
donde Xa es $–CH_2-$, $-OCH_2-$, $-NHCH_2-$ o $–NRCH_2-$ y cada R es de manera independiente H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 24. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



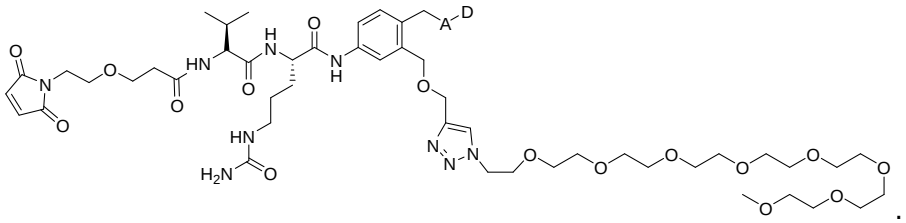
donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 25. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:

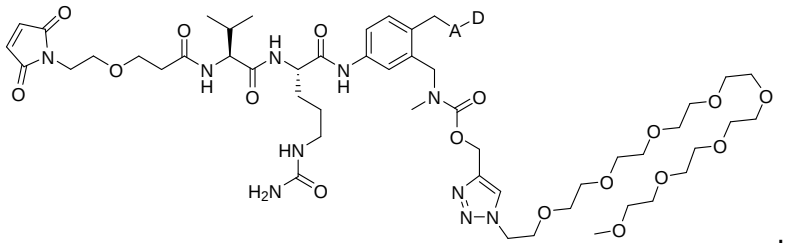


donde Xb es $-CH_2-$, $-OCH_2-$, $-NHCH_2-$ o $–NRCH_2-$ y cada R es de manera independiente H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

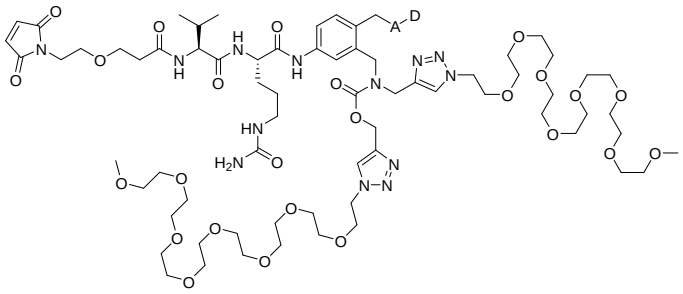
Forma de realización 26. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



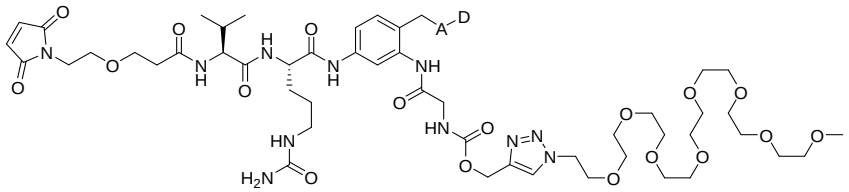
Forma de realización 27. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



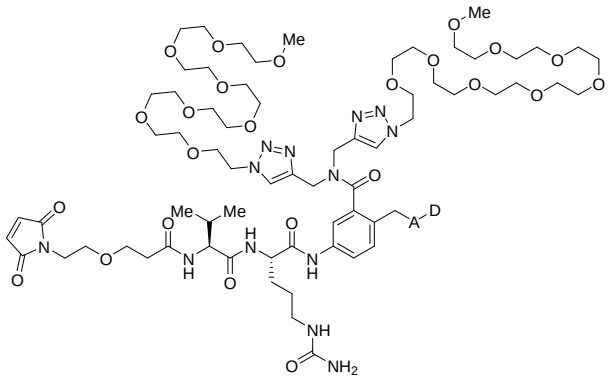
Forma de realización 28. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



Forma de realización 29. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



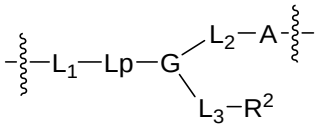
Forma de realización 30. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



Forma de realización 31. El compuesto de la Fórmula (A') o de cualquiera de las Formas de realización 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura de un compuesto en la Tabla A.

Forma de realización 32. Un conector del grupo de conector-fármaco de la Fórmula (A')

que tiene la estructura de la Fórmula (C'),



Fórmula (C')

en donde

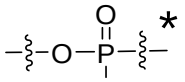
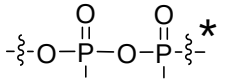
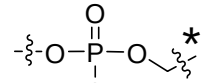
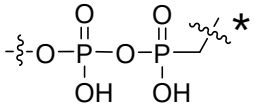
L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente;

G-L_2-A es un espaciador autoescindible;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D,

y

L_3 es una unidad espaciadora.

Forma de realización 33. El conector de la Forma de realización 32, en donde:

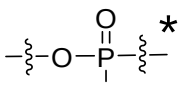
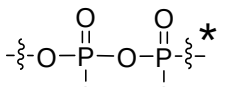
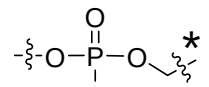
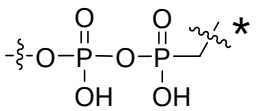
L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos;

G-L_2-A es un espaciador autoescindible;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D,

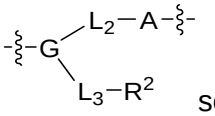
y

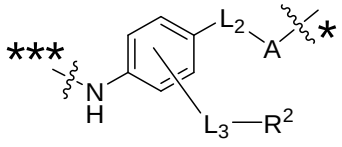
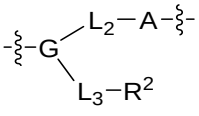
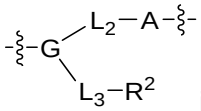
L_3 es una unidad espaciadora.

Forma de realización 34. El conector de la Forma de realización 32 ó 33, en donde:

L_1 es un espaciador formador de puentes;

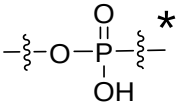
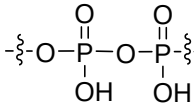
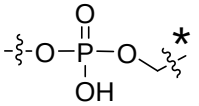
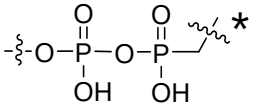
Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos;

el grupo  se selecciona entre:

 , en donde * de  indica el punto de unión a D (por ejemplo, a un N o un O de la unidad de fármaco), *** de  indican el punto de unión a Lp;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D,

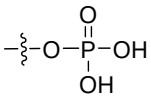
y

L_3 es una unidad espaciadora.

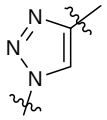
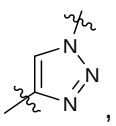
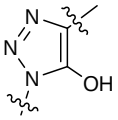
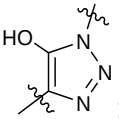
Forma de realización 35. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 34, en donde:

L_1 es *-C(=O)(CH_2)$_m$O(CH_2)$_m$-**; *-C(=O)((CH_2)$_m$O)$_t$(CH_2)$_n$-**; *-C(=O)(CH_2)$_m$-**; *-C(=O)NH((CH_2)$_m$O)$_t$(CH_2)$_n$-**; *-C(=O)O(CH_2)$_m$SSC(R^3)$_2$(CH_2)$_m$C(=O)NR^3(CH_2)$_m$NR^3C(=O)(CH_2)$_m$-**; *-C(=O)O(CH_2)$_m$C(=O)NH(CH_2)$_m$-**; *-C(=O)(CH_2)$_m$NH(CH_2)$_m$-**; *-C(=O)(CH_2)$_m$NH(CH_2)$_n$C(=O)-**; *-C(=O)(CH_2)$_m$$X_1$($CH_2$)$_m$-**; *-C(=O)(($CH_2$)$_m$O)$_t$($CH_2$)$_n$$X_1$($CH_2$)$_n$-**; *-C(=O)($CH_2$)$_m$NHC(=O)($CH_2$)$_n$-**; *-C(=O)(($CH_2$)$_m$O)$_t$($CH_2$)$_n$NHC(=O)($CH_2$)$_n$-**; *-C(=O)($CH_2$)$_m$NHC(=O)($CH_2$)$_n$$X_1$($CH_2$)$_n$-**; *-

$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_m$-**; *-$C(=O)(CH_2)_mC(R^3)_2$-** o *-$C(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

cada R^3 se selecciona de manera independiente entre H y C_1-C_6alquilo;

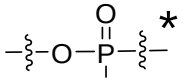
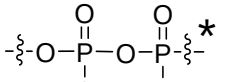
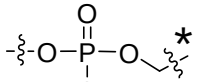
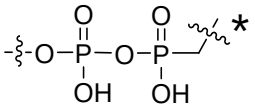
X_1 es  ,  ,  o  ;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende un residuo de aminoácido seleccionado entre glicina, valina, citrulina, lisina, isoleucina, fenilalanina, metionina, asparagina, prolina, alanina, leucina, triptofano y tirosina;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura ,

donde

W es -CH_2O-**, -CH_2N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NHC(=O)O-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NH-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NHC(=O)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -$S(O)_2$NH-**, -NH$S(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

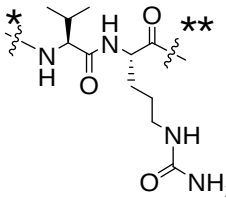
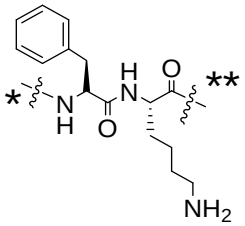
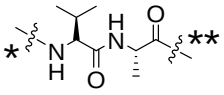
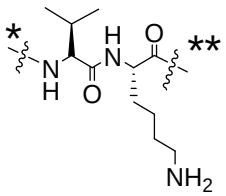
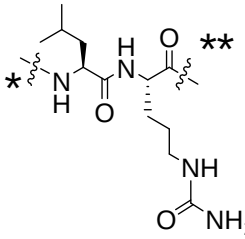
Forma de realización 36. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 35, en donde:

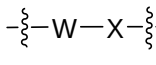
L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit),  (PheLys),  (ValAla),  (ValLys) y  (LeuCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

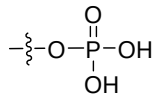
donde

W es -CH_2O-**, -CH_2N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NH-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -S(O)$_2$NH-**, -NHS(O)$_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

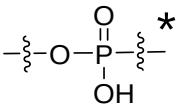
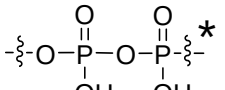
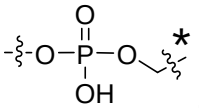
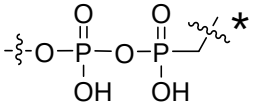
X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

y

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D.

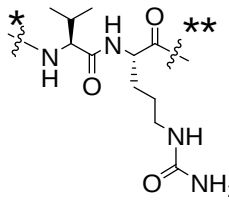
Forma de realización 37. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 36, en donde:

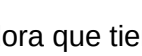
L_1 es *-C(=O)(CH_2)$_m$O(CH_2)$_m$-**; *-C(=O)((CH_2)$_m$O)$_t$(CH_2)$_n$-**; *-C(=O)(CH_2)$_m$-**; o *-C(=O)NH((CH_2)$_m$O)$_t$(CH_2)$_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

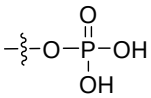
W es -CH_2O-**, -CH2N(Rb)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -S(O)$_2$NH-**, -NHS(O)$_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W

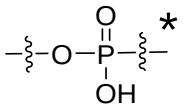
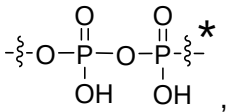
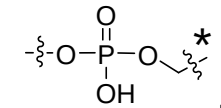
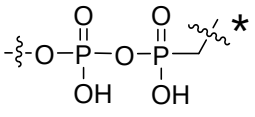
y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

y

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D.

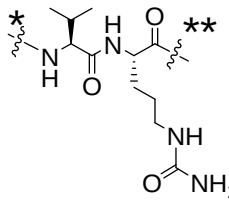
Forma de realización 38. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 37, en donde:

L_1 es *-C(=O)(CH_2)$_m$O(CH_2)$_m$-**; *-C(=O)((CH_2)$_m$O)$_t$(CH_2)$_n$-**; *-C(=O)(CH_2)$_m$-**; o *-C(=O)NH((CH_2)$_m$O)$_t$(CH_2)$_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

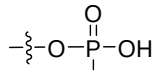
donde

W es -CH_2O-**, -CH2N(Rb)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-** o -NHC(=O)NH-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

y

A es un enlace o -OC(=O)* en donde * indica el punto de unión a D.

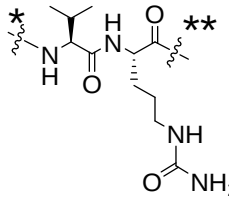
Forma de realización 39. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 38, en donde:

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH(($(CH_2)_m$O)$_t$$(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

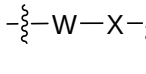
cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde

* de Lp indica el punto de unión a L_1;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

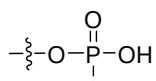
donde

W es -CH_2O-**, -CH2N(Rb)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, o -C(=O)N(X-R^2)-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

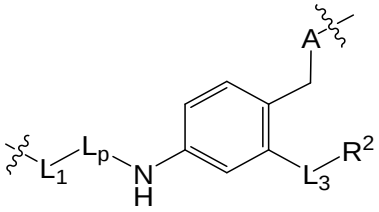
* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

y

A es un enlace o -OC(=O)* en donde * indica el punto de unión a D.

Forma de realización 40. El conector de la Fórmula (C') que tiene la estructura de la Fórmula (D'),



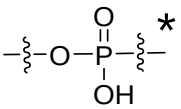
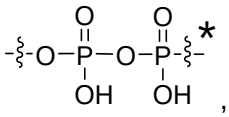
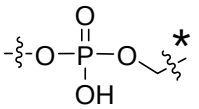
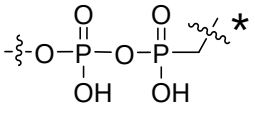
Fórmula (D')

en donde

L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente;

R^2 es una unidad hidrofílica;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D,

y

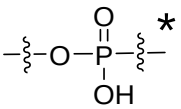
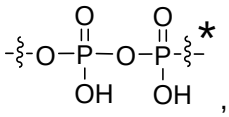
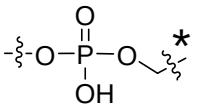
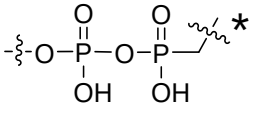
L_3 es una unidad espaciadora.

Forma de realización 41. El conector de las Formas de realización 40, en donde:

L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos;

R^2 es una unidad hidrofílica;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a

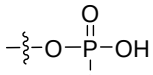
D,

y

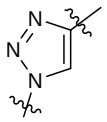
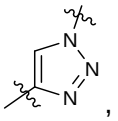
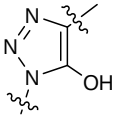
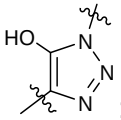
L_3 es una unidad espaciadora.

Forma de realización 42. El conector de la Forma de realización 40 ó 41, en donde:

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)O$(CH_2)_m$SSC$(R^3)_2(CH_2)_m$C(=O)N$R^3(CH_2)_m$NR^3C(=O)$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)O$(CH_2)_m$C(=O)NH$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$NH$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$NH$(CH_2)_n$C(=O)-**; *-C(=O)$(CH_2)_mX_1(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$NHC(=O)$(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$C(=O)NH$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mC(R^3)_2$-** o *-C(=O)$(CH_2)_m$C(=O)NH$(CH_2)_m$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

cada R^3 se selecciona de manera independiente entre H y C_1-C_6alquilo;

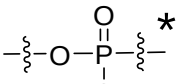
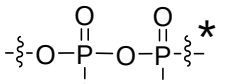
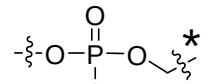
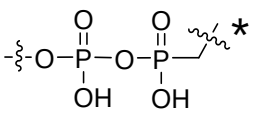
X_1 es  ,  ,  o  ;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

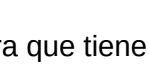
cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende un residuo de aminoácido seleccionado entre glicina, valina, citrulina, lisina, isoleucina, fenilalanina, metionina, asparagina, prolina, alanina, leucina, triptofano y tirosina;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N$(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)$C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C$(R^a)_2$C$(R^a)_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a

D;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

W es -CH_2O-**, -CH2N(Rb)C(=O)O-**, -$NHC(=O)CH_2NHC(=O)O$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, -$C(=O)N(X\text{-}R^2)$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)$-**, -$C(=O)NR^b$-**, -C(=O)NH-**, -$CH_2NR^bC(=O)$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NH$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NR^b$-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -$S(O)_2NH$-**, -$NHS(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

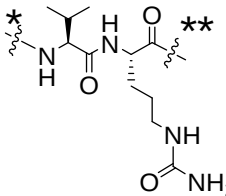
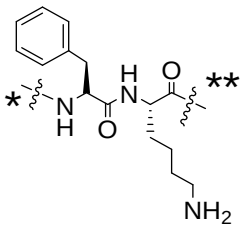
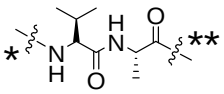
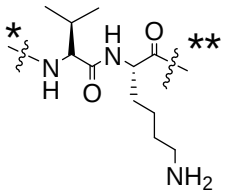
Forma de realización 43. El conector de cualquiera de las Formas de realización 40 a 42, en donde:

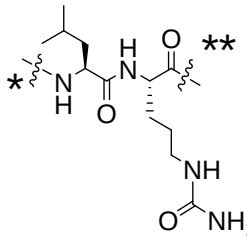
L_1 es *-$C(=O)(CH_2)_mO(CH_2)_m$-**; *-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-$C(=O)(CH_2)_m$-**; o *-$C(=O)NH((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit),  (PheLys),  (ValAla),  (ValLys) y



(LeuCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

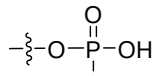
donde

W es -CH_2O-**, -CH2N(Rb)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -$S(O)_2$NH-**, -NHS$(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

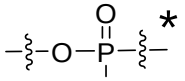
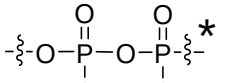
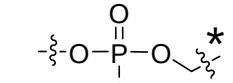
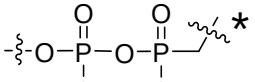
X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

y

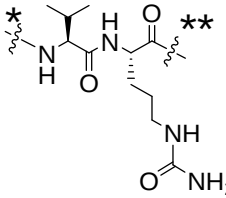
A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)$N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)$C(=O)-* o -OC(=O)$N(CH_3)C(R^a)_2C(R^a)_2N(CH_3)$C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D.

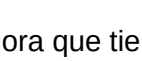
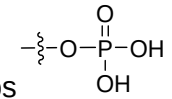
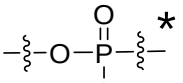
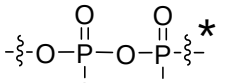
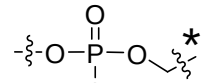
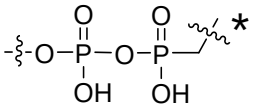
Forma de realización 44. El conector de cualquiera de las Formas de realización 40 a 43, en donde:

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_mO(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;
cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde
* de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,
donde
W es $-CH_2O-$**, $-CH_2N(Rb)C(=O)O-$**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-$**, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)O-$**, $-C(=O)N(X-R^2)-$**, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)-$**, $-C(=O)NR^b-$**, -C(=O)NH-**, $-CH_2NR^bC(=O)-$**, $-CH_2NR^bC(=O)NH-$**, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b-$**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, $-S(O)_2NH-$**, $-NHS(O)_2-$**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;
X es un enlace, triazolilo o ***-CH2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;
y
* de L_3 indica el punto de unión a R^2;
R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;
y
A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , $-OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-$* o $-OC(=O)N(CH_3)C(R^a)_2C(R^a)_2N(CH_3)C(=O)-$*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D.

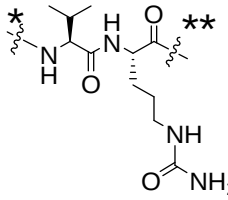
Forma de realización 45. El conector de cualquiera de las Formas de realización 40 a 44, en donde:

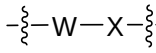
L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

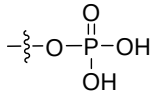
donde

W es -CH_2O-**, -CH_2N(Rb)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-** o -NHC(=O)NH-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

y

A es un enlace o -OC(=O)* en donde * indica el punto de unión a D.

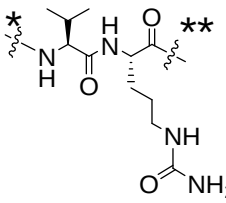
Forma de realización 46. El conector de cualquiera de las Formas de realización 40 a 45, en donde:

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp;

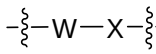
cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde

* de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

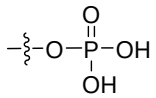
donde

W es $-CH_2O-$**, $-CH_2N(Rb)C(=O)O-$**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-$**, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)O-$** o $-C(=O)N(X-R^2)-$**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

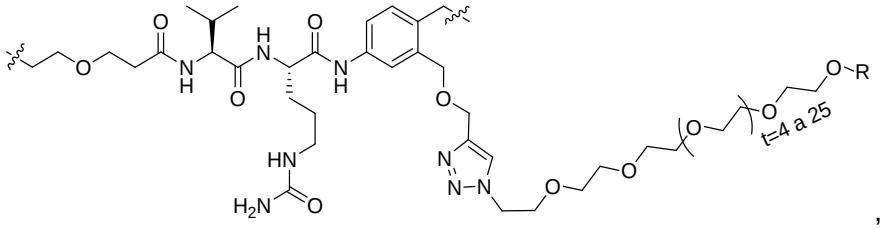
* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

y

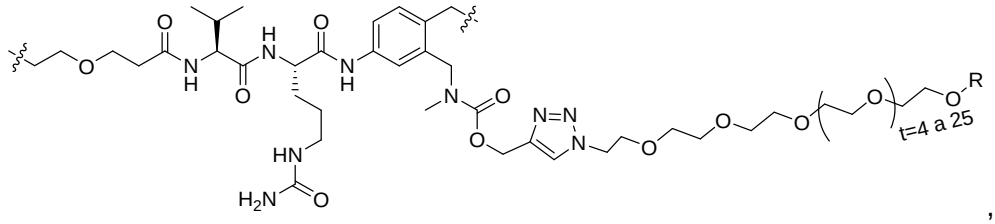
A es un enlace o -OC(=O)* en donde * indica el punto de unión a D.

Forma de realización 47. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:

 ,

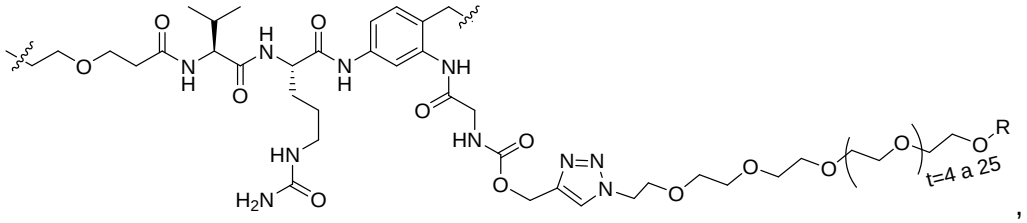
donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 48. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



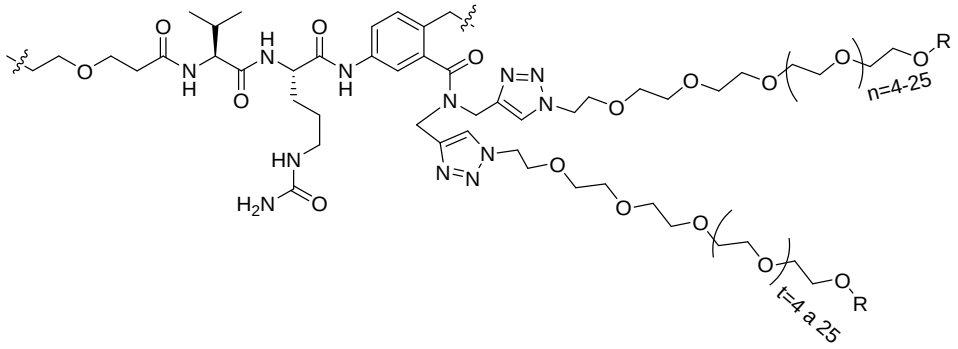
donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 49. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



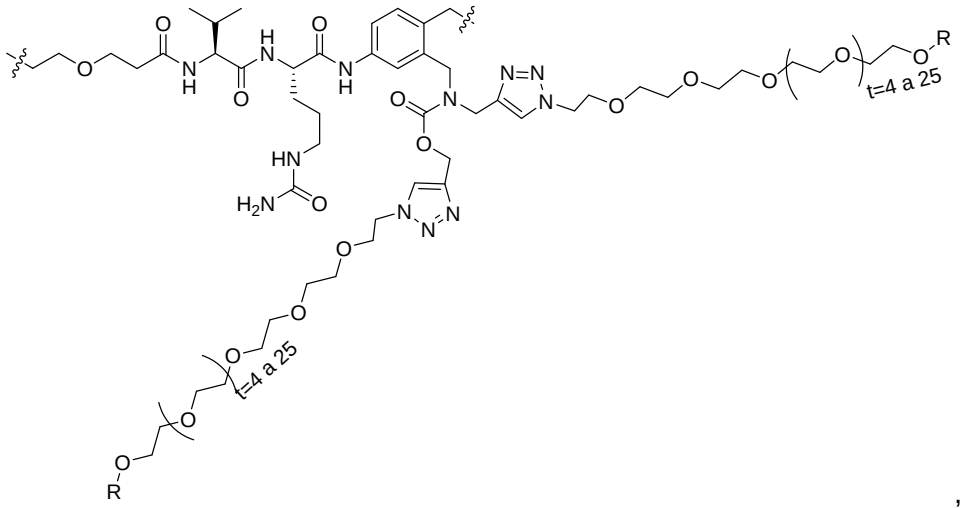
donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 50. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



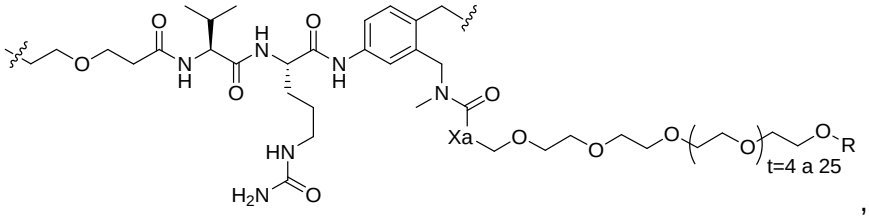
donde cada R se selecciona de manera independiente entre H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 51. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



donde cada R se selecciona de manera independiente entre H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$.

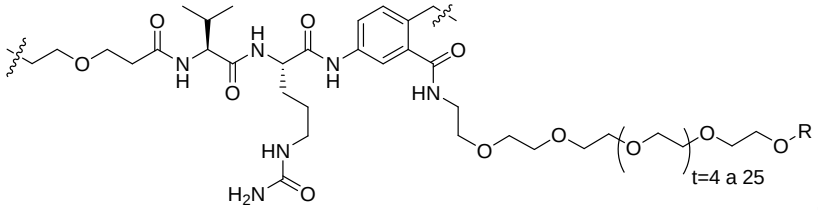
Forma de realización 52. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



,

donde Xa es –CH_2-, -OCH_2-, -$NHCH_2$- o –$NRCH_2$- y cada R es de manera independiente H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$.

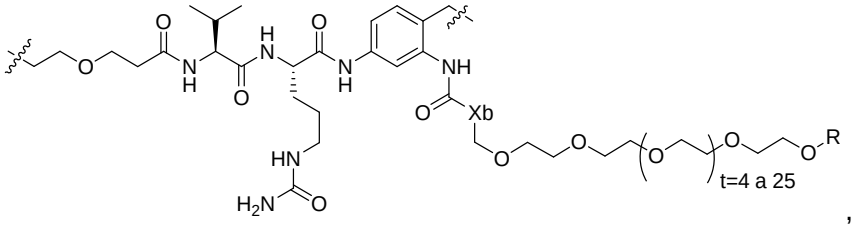
Forma de realización 53. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



,

donde R es H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$.

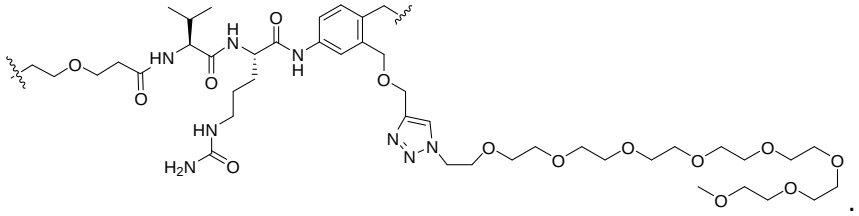
Forma de realización 54. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



,

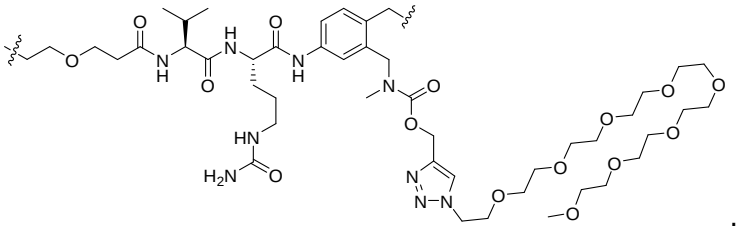
donde Xb es -CH_2-, -OCH_2-, -$NHCH_2$- o –$NRCH_2$- y cada R es de manera independiente H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$.

Forma de realización 55. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:

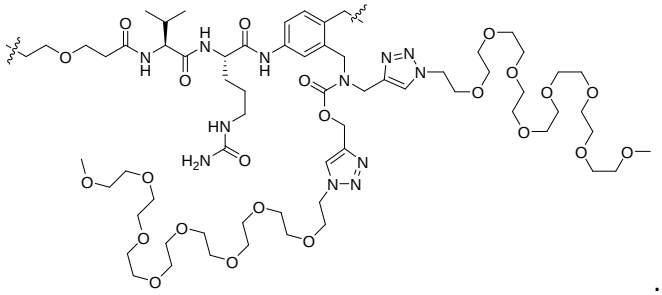


.

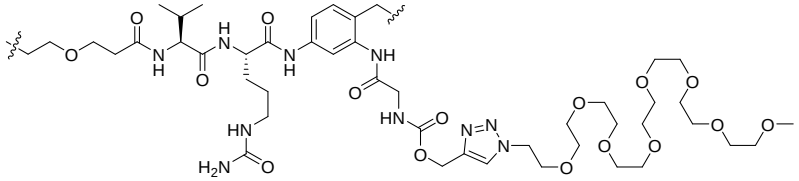
Forma de realización 56. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



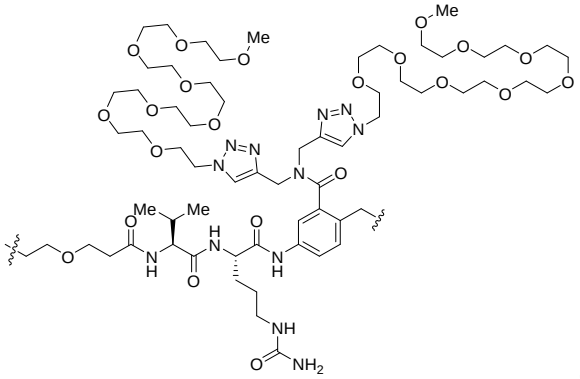
Forma de realización 57. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



Forma de realización 58. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:



Forma de realización 59. El conector de cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, que tiene la estructura:

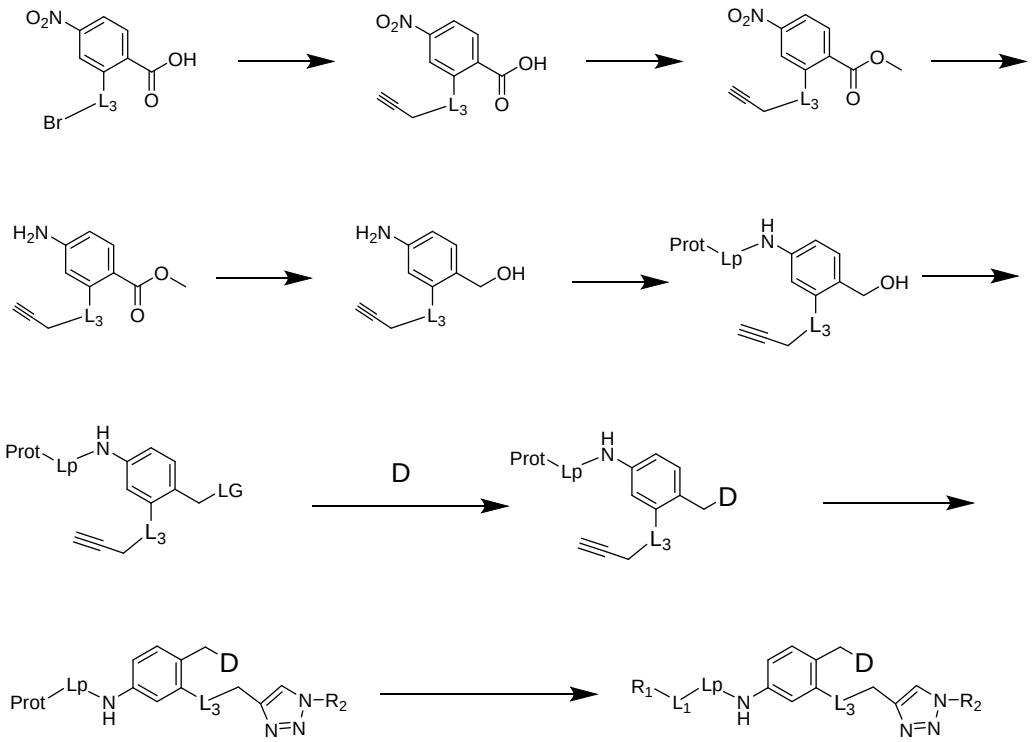


A efectos ilustrativos, los esquemas de reacción generales que se muestran en la presente proveen rutas potenciales para sintetizar los compuestos de la presente invención así como los intermediarios clave. Por una descripción más detallada de los pasos de reacción individuales, véase la sección de ejemplos más adelante. Aunque se muestran materiales de partida y reactivos específicos en los esquemas y se describen a continuación, otros materiales de partida y reactivos pueden ser fácilmente sustituidos para proveer una variedad de derivados y/o condiciones de reacción. Además, muchos de los compuestos preparados mediante los métodos que se describen más adelante se pueden modificar adicionalmente a

la luz de esta divulgación usando la química convencional bien conocida por los especialistas en el arte.

A modo de ejemplo, la síntesis general para los compuestos de la Fórmula (B') se muestra a continuación en el Esquema 1.

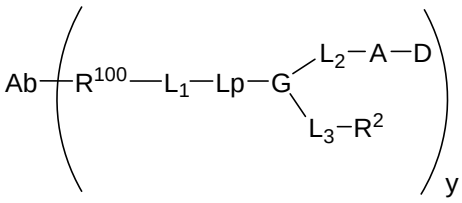
Esquema 1



Conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención

La presente invención provee conjugados de anticuerpo-fármaco, también denominados inmunoconjugados en la presente, que comprenden conectores que comprenden una o más unidades hidrofílicas.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención tienen la estructura de la Fórmula (E'):



Fórmula (E')

en donde:

Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

R^{100} es un grupo de acoplamiento;

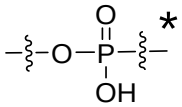
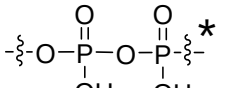
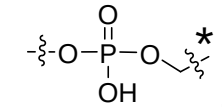
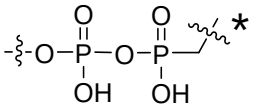
L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente;

G-L_2-A es un espaciador autoescindible;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora;

D es una unidad de fármaco definida en la presente, por ejemplo, un inhibidor de Mcl-1, y puede comprender un N u O, en donde D se puede unir a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco,

e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

En el siguiente listado de formas de realización numeradas se proveen determinados aspectos y ejemplos de los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención. Se comprenderá que las características especificadas en cada forma de realización se pueden combinar con otras características especificadas para proveer formas de realización adicionales de la presente invención.

Forma de realización 60. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') en donde:

Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

R^{100} es un grupo de acoplamiento;

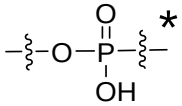
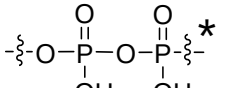
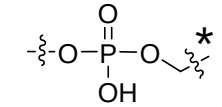
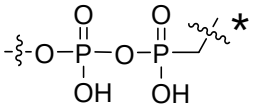
L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos;

G-L_2-A es un espaciador autoescindible;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera

independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora;

D es una unidad de fármaco definida en la presente en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A a D (por ejemplo, un N u O de la unidad de fármaco),

e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

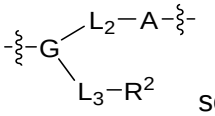
Forma de realización 61. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o la Forma de realización 60, en donde:

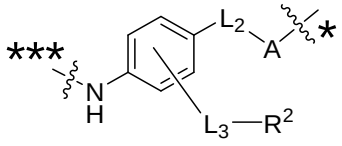
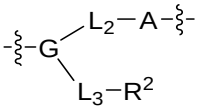
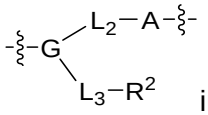
Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

R^{100} es un grupo de acoplamiento;

L_1 es un espaciador formador de puentes;

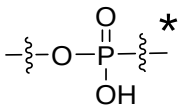
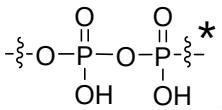
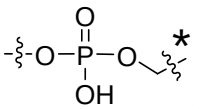
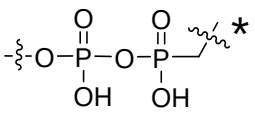
Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos;

El grupo  se selecciona entre:

 , en donde * de  indica el punto de unión a D (por ejemplo, a un N o un O de la unidad de fármaco), *** de  indica el punto de unión a Lp;

R^2 es una unidad hidrofílica;

L_2 es un enlace, un metileno, un neopentileno o un C_2-C_3alquenileno;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

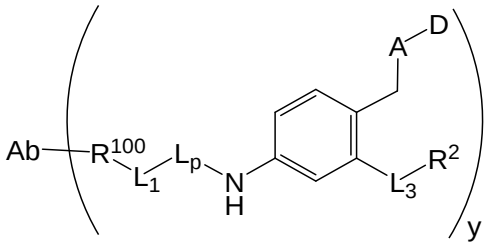
L_3 es una unidad espaciadora;

D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco,

e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 62. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 61 que tiene la estructura de la Fórmula (F'),



Fórmula (F')

en donde:

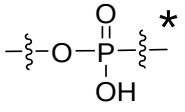
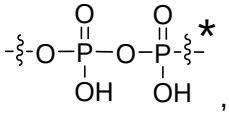
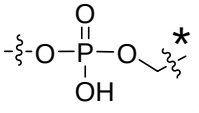
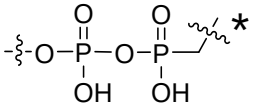
Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

R^{100} es un grupo de acoplamiento;

L_1 es un espaciador formador de puentes;

Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos;

R^2 es una unidad hidrofílica;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora;

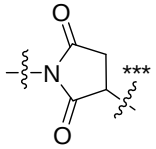
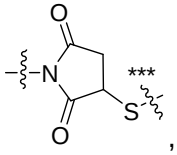
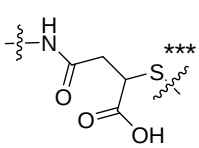
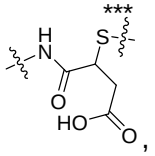
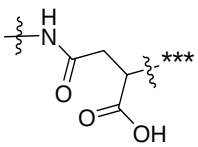
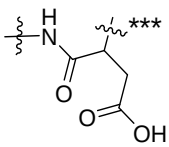
D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco,

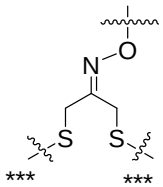
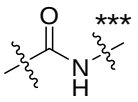
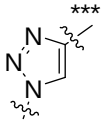
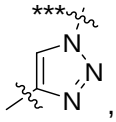
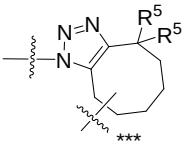
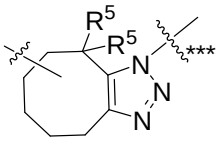
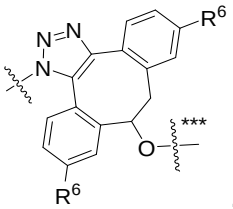
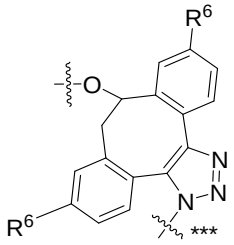
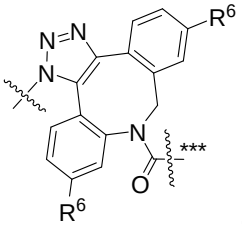
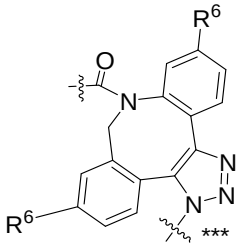
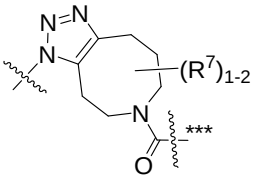
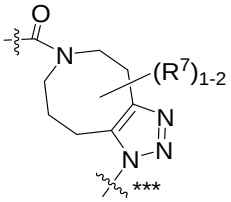
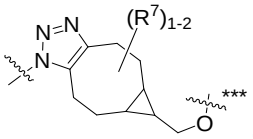
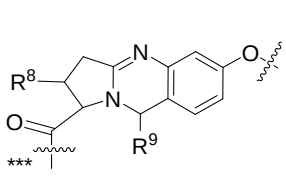
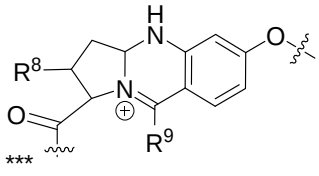
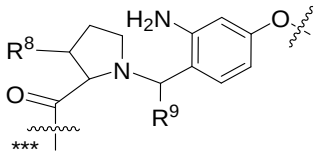
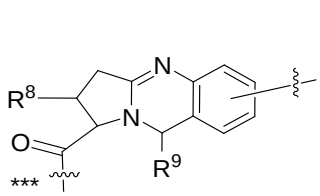
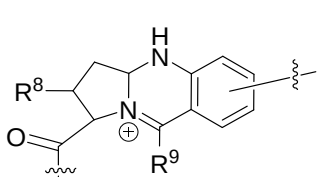
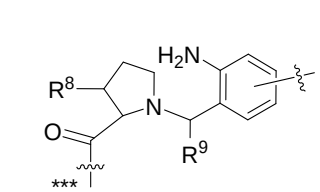
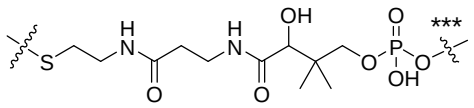
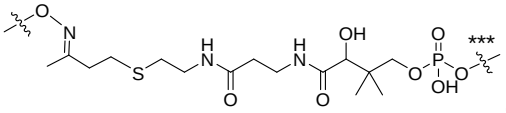
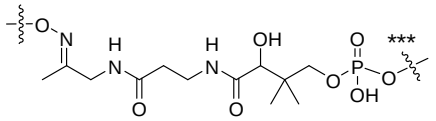
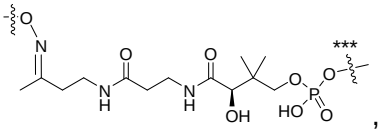
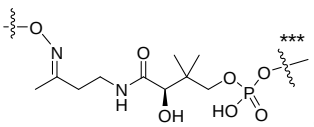
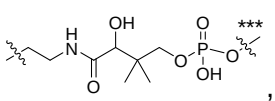
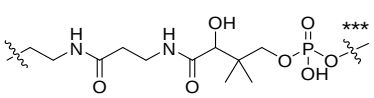
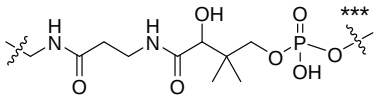
e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 63. El inmunoconjugado de la Fórmula (D') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 62, en donde:

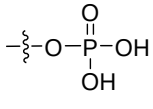
Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

R^{100} es  ,  ,  ,  ,  , 



, , -S-, -C(=O)-, -ON=***, -NHC(=O)CH_2-***, -S(=O)$_2$$CH_2$$CH_2$-***, -($CH_2$)$_2$S(=O)$_2$$CH_2$$CH_2$-***, -NHS(=O)$_2$$CH_2$$CH_2$-***, -NHC(=O)$CH_2$$CH_2$-***, -$CH_2NHCH_2$$CH_2$-***, -NH$CH_2$$CH_2$-***,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , , , ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , o  , donde ***

de R^{100} indican el punto de unión a Ab;

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_mO(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)O$(CH_2)_mSSC(R^3)_2(CH_2)_mC(=O)NR^3(CH_2)_mNR^3C(=O)(CH_2)_m$-**; *-C(=O)O$(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNH(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNH(CH_2)_nC(=O)$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mX_1(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mC(R^3)_2$-** o *-C(=O)$(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100};

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

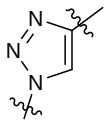
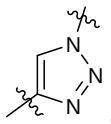
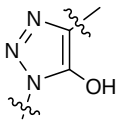
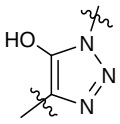
cada R^3 se selecciona de manera independiente entre H y C_1-C_6alquilo;

R^4 es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada R^5 se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo, F, Cl y -OH;

cada R^6 se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, -CN, $-NO_2$ y -OH;

cada R^7 se selecciona de manera independiente entre H, C_{1-6}alquilo, fluoro, benciloxi sustituido con –C(=O)OH, bencilo sustituido con –C(=O)OH, C_{1-4}alcoxi sustituido con -C(=O)OH y C_{1-4}alquilo sustituido con –C(=O)OH;

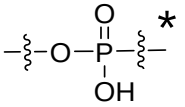
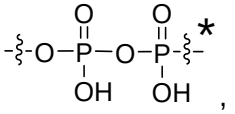
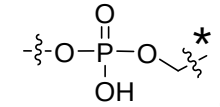
X_1 es  ,  ,  o  ;

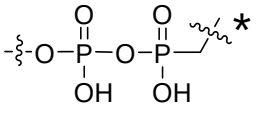
cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende un residuo de aminoácido seleccionado entre valina, citrulina, lisina, isoleucina, fenilalanina, metionina, asparagina, prolina, alanina, leucina, triptofano y tirosina;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,



, -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

W es -CH_2O-**, -CH_2N(Rb)C(=O)O-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NHC(=O)O-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NH-**, -NHC(=O)C(R^b)$_2$NHC(=O)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -$S(O)_2$NH-**, -NHS$(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

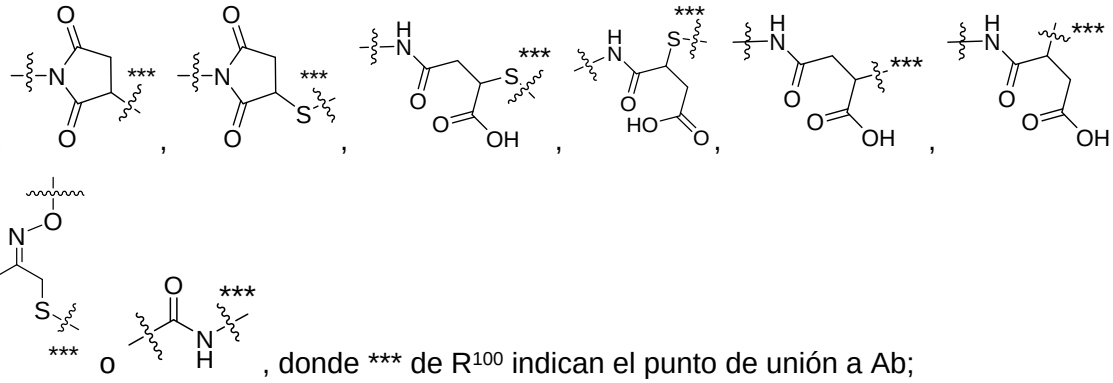
D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco,

e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 64. El inmunoconjugado de la Fórmula (D') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 63, en donde:

Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

R^{100} es  , donde *** de R^{100} indican el punto de unión a Ab;

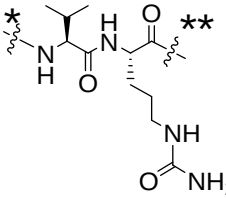
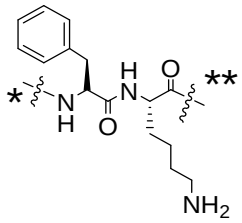
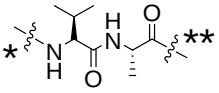
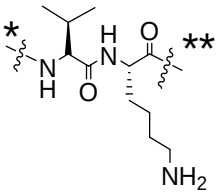
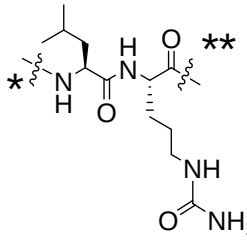
L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_m$O$)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH$((CH_2)_m$O$)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el

punto de unión a R^{100};

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit),  (PheLys),  (ValAla),  (ValLys) y  (LeuCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

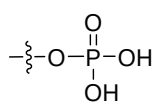
donde

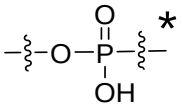
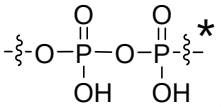
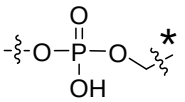
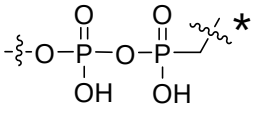
W es $-CH_2O-$**, $-CH_2N(Rb)C(=O)O-$**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-$**, $-NHC(=O)CH_2NH-$**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)-$**, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)O-$**, $-C(=O)N(X-R^2)-$**, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)-$**, $-C(=O)NR^b-$**, $-C(=O)NH-$**, $-CH_2NR^bC(=O)-$**, $-CH_2NR^bC(=O)NH-$**, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b-$**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, $-OC(=O)NH-$**, $-S(O)_2NH-$**, $-NHS(O)_2-$**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

A es un enlace, -OC(=O)-*,  ,  ,  ,  , -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

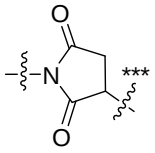
D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco,

e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 65. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 64, en donde:

Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

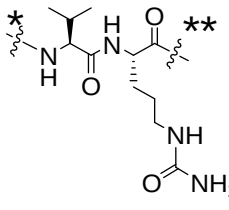
R^{100} es  , donde *** de R^{100} indican el punto de unión a Ab;

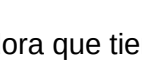
L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_m$O$)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH$((CH_2)_m$O$)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100};

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

W es -CH_2O-**, -CH_2N(Rb)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)-**, -CH_2NR^bC(=O)NH-**, -CH_2NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -

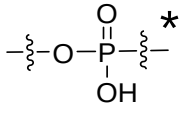
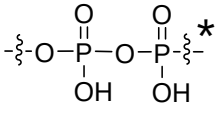
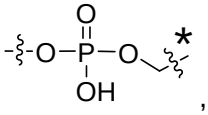
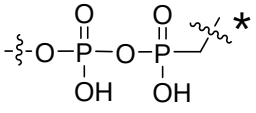
OC(=O)NH-**, -$S(O)_2$NH-**, -NHS$(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 A es un enlace, -OC(=O)-*,


,

,

,

, -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)-* o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-*, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6 alquilo y C_3-C_8 cicloalquilo y el * de A indica el punto de unión a D;

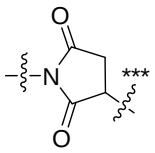
D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco,

e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 66. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 65, en donde:

Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

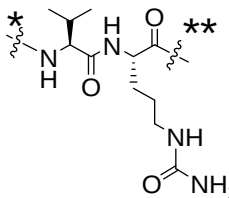
R^{100} es  , donde *** de R^{100} indican el punto de unión a Ab;

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; o *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp y ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100};

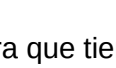
cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde

* de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo –NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

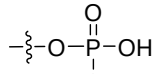
donde

W es -CH_2O-**, -$CH_2N(Rb)C(=O)O$-**, -$NHC(=O)CH_2NHC(=O)O$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, -$C(=O)N(X\text{-}R^2)$-**, -$C(=O)NR^b$-**, -$C(=O)NH$-**, -$CH_2NR^bC(=O)$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NH$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NR^b$-**, -$NHC(=O)$-**, -$NHC(=O)O$-** o -$NHC(=O)NH$-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

A es un enlace o -OC(=O)* en donde * indica el punto de unión a D;

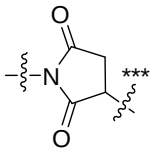
D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco,

e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 67. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 66, en donde:

Ab es un anticuerpo o un fragmento del mismo;

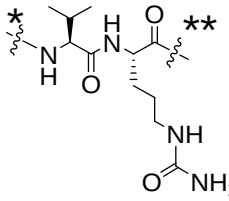
R^{100} es  , donde *** de R^{100} indica el punto de unión a Ab;

L_1 es *-$C(=O)(CH_2)_mO(CH_2)_m$-**; *-$C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-$C(=O)(CH_2)_m$-**; o *-$C(=O)NH((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp y ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100};

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada t se selecciona de manera independiente entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30;

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit), donde

* de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de G;

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

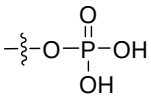
donde

W es $-CH_2O-$**, $-CH_2N(Rb)C(=O)O-$**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-$**, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)O-$**, o $-C(=O)N(X-R^2)-$**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2;

R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  ;

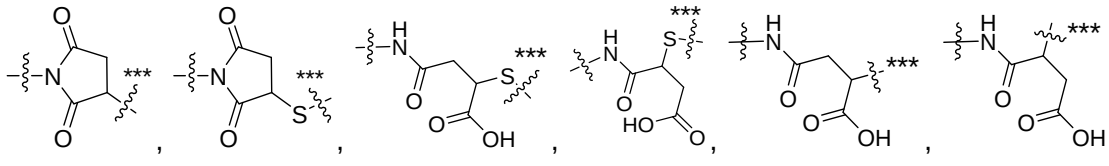
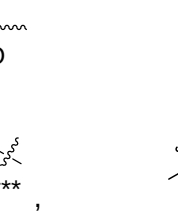
A es un enlace o -OC(=O)* en donde * indica el punto de unión a D;

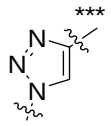
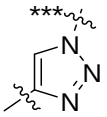
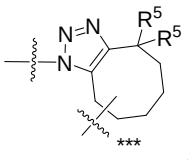
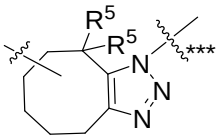
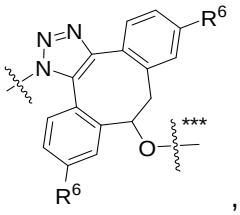
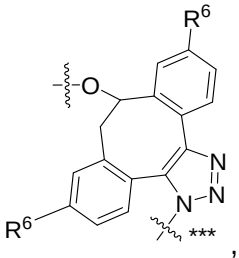
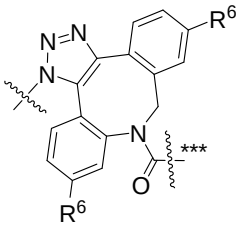
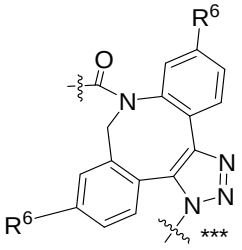
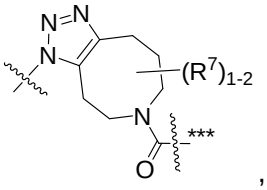
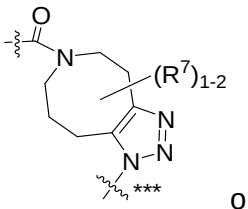
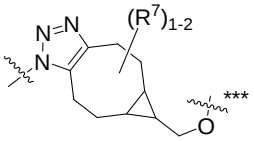
D es una unidad de fármaco definida en la presente y comprende un N u O, en donde D está unido a A por medio de un enlace directo de A al N o al O de la unidad de fármaco,

e

y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

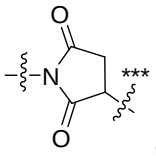
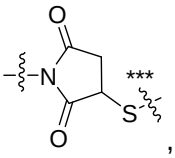
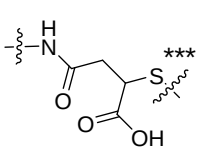
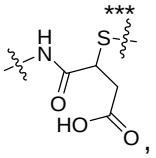
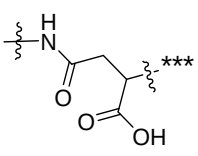
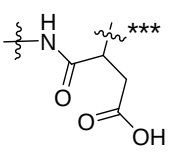
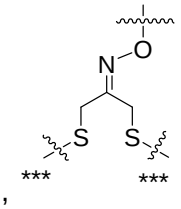
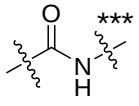
Forma de realización 68. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 63, en donde

R^{100} es  ,  , -S-, -C(=O)-, -ON=***, -NHC(=O)CH_2-***, -$S(=O)_2CH_2CH_2$-***, -$(CH_2)_2S(=O)_2CH_2CH_2$-***, -$NHS(=O)_2CH_2CH_2$-***, -$NHC(=O)CH_2CH_2$-***, -$CH_2NHCH_2CH_2$-***,

-NHCH$_2$CH$_2$-***,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , o  ,

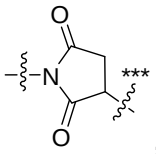
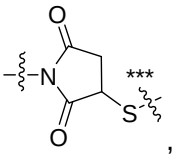
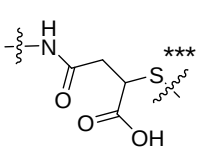
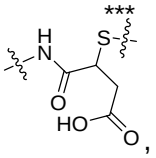
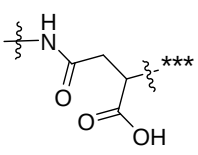
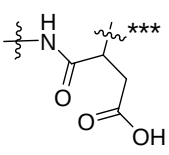
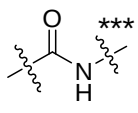
donde *** de R^{100} indican el punto de unión a Ab.

Forma de realización 69. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 63, en donde

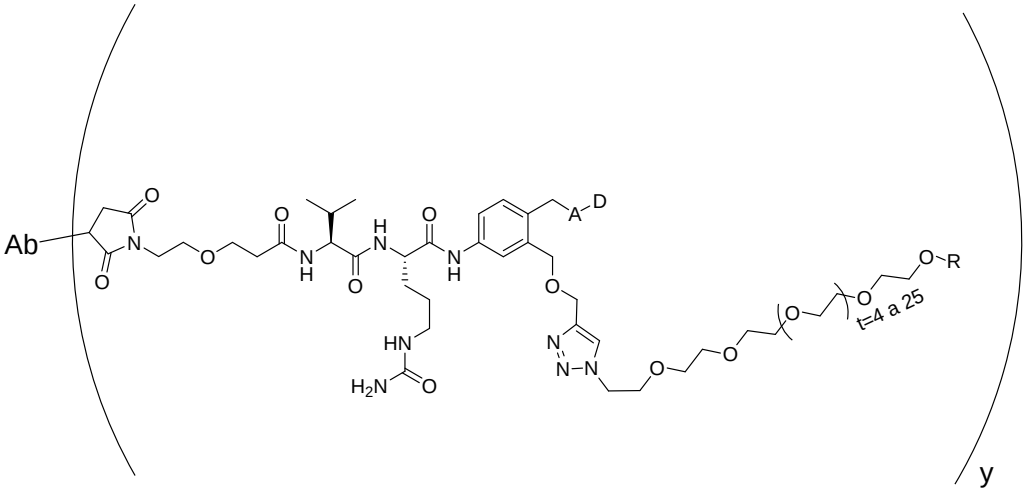
R^{100} es  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , o ,

donde *** de R^{100} indican el punto de unión a Ab.

Forma de realización 70. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 63, en donde

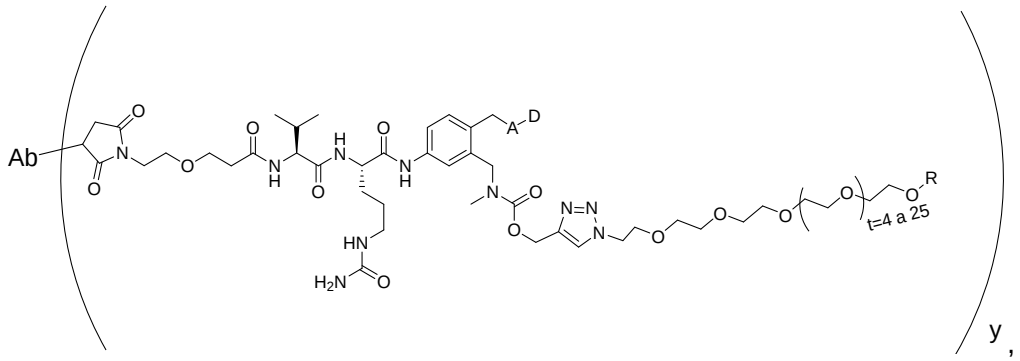
R^{100} es  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , o , donde *** de R^{100} indica el punto de unión a Ab.

Forma de realización 71. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



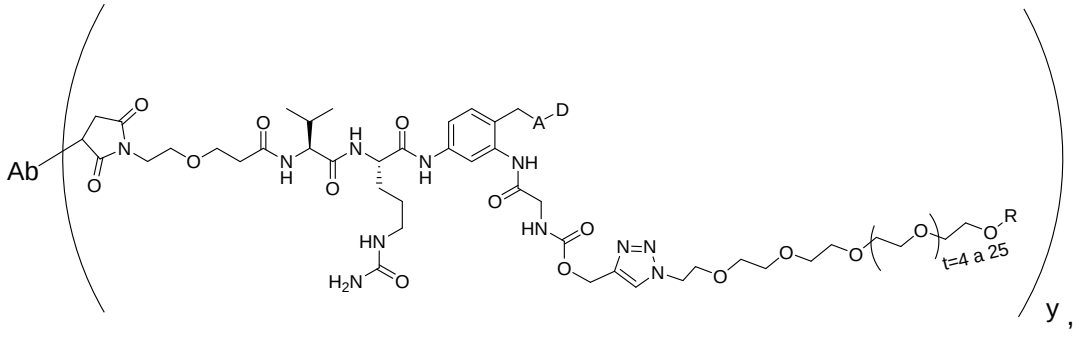
donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$ e y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 72. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



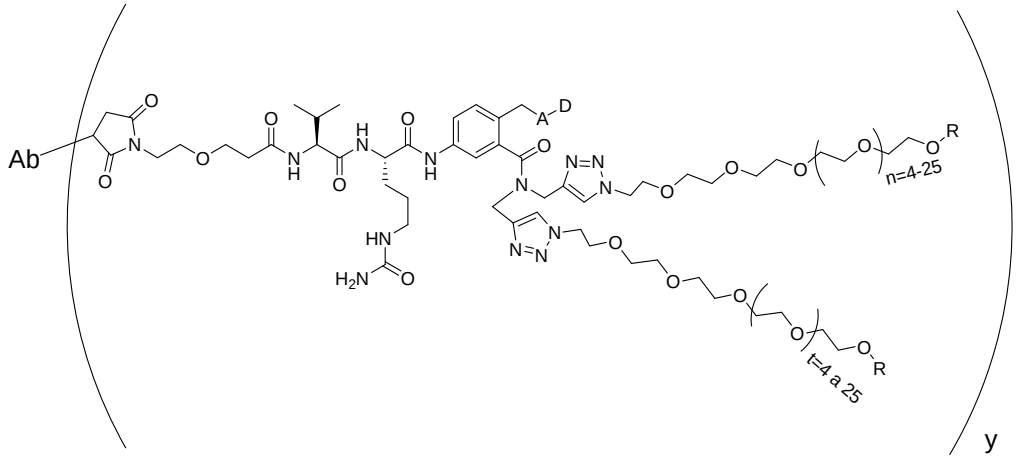
donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$ e y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 73. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$ e y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

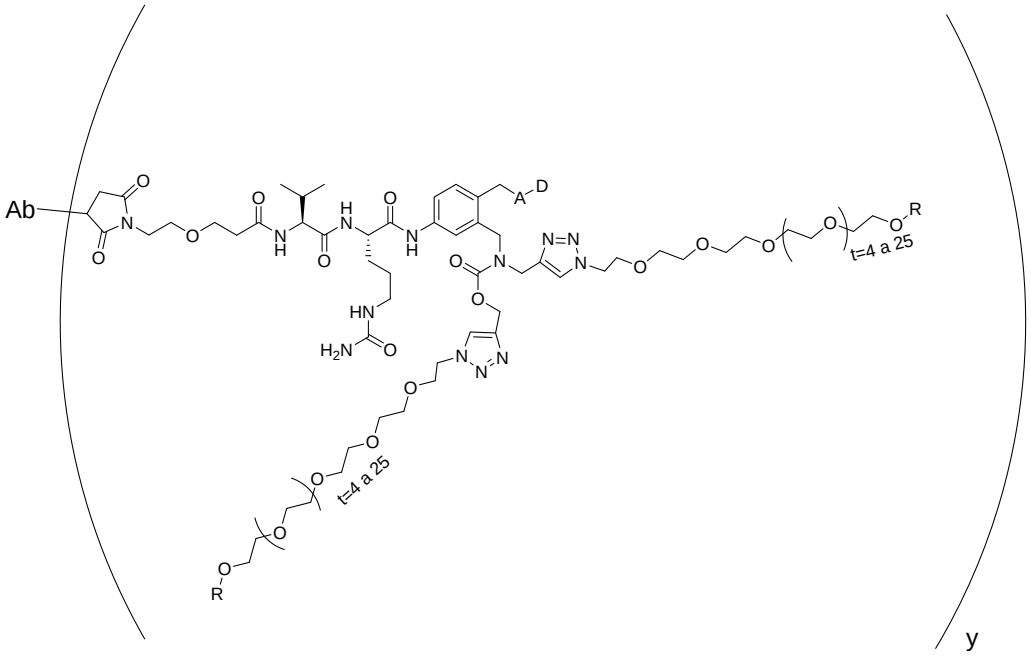
Forma de realización 74. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



y ,

donde cada R se selecciona de manera independiente entre H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$ e y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

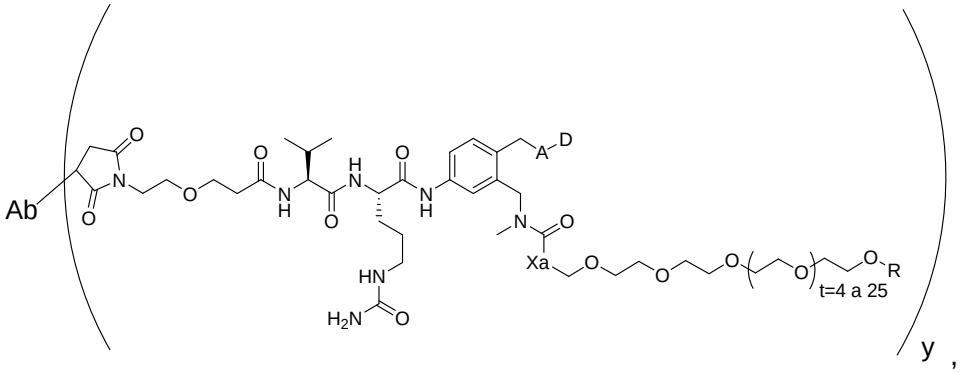
Forma de realización 75. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



y ,

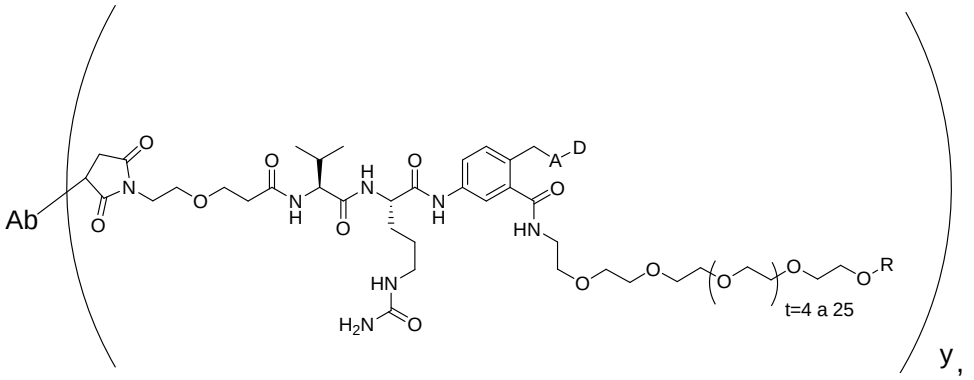
donde cada R se selecciona de manera independiente entre H, -CH_3 o -$CH_2CH_2C(=O)OH$ e y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 76. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



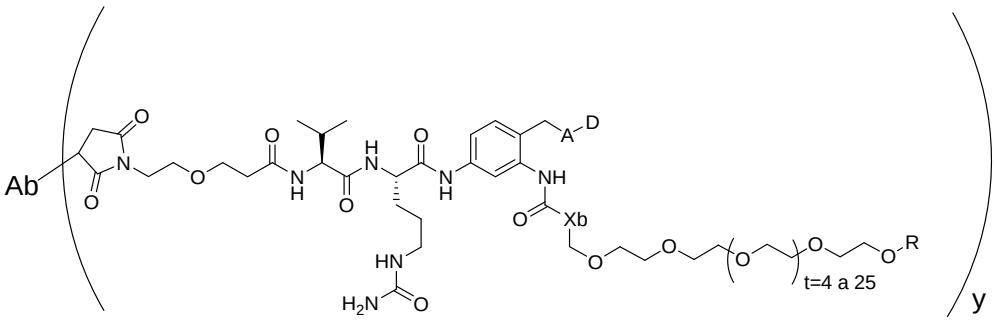
donde Xa es $–CH_2-$, $-OCH_2-$, $-NHCH_2-$ o $–NRCH_2-$ y cada R es de manera independiente H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$ e y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 77. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



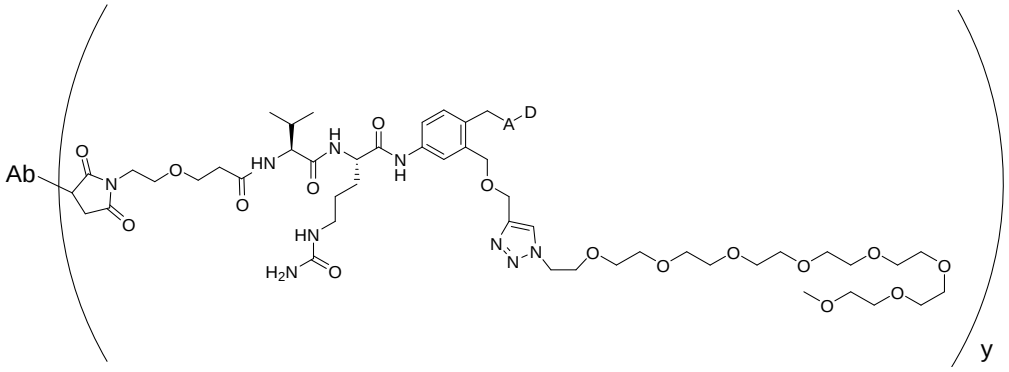
donde R es H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$ e y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 78. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



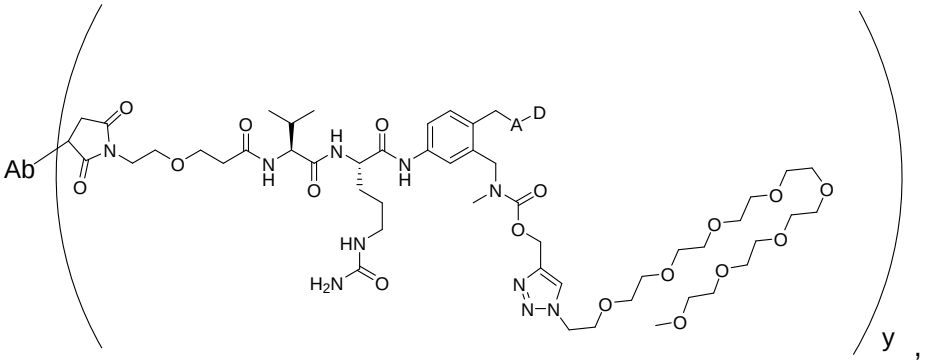
donde Xb es $-CH_2-$, $-OCH_2-$, $-NHCH_2-$ o $–NRCH_2-$ y cada R es de manera independiente H, $-CH_3$ o $-CH_2CH_2C(=O)OH$ e y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 79. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



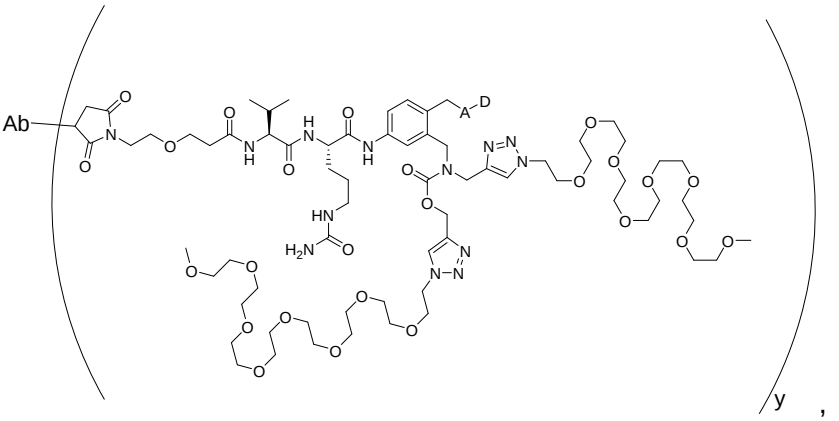
donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 80. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



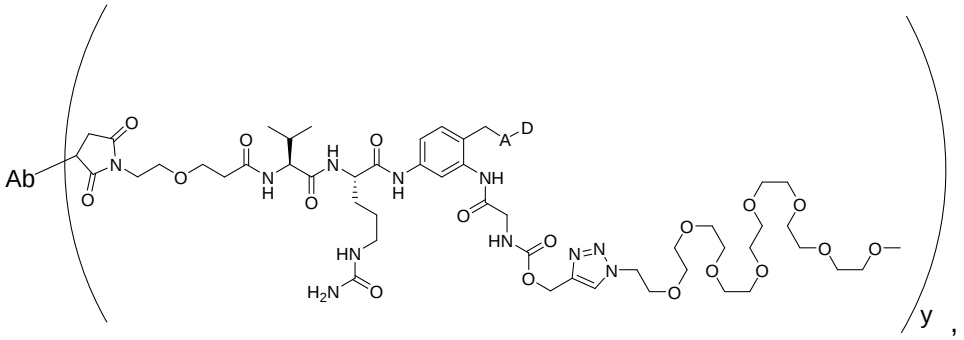
donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 81. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



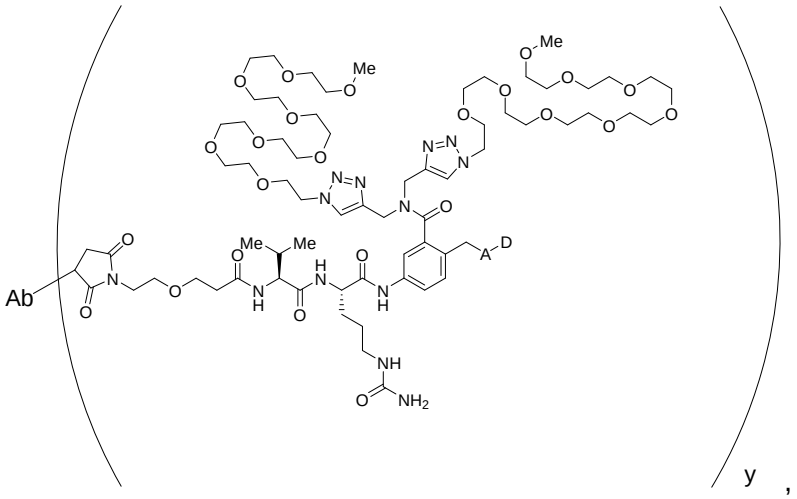
donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

Forma de realización 82. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

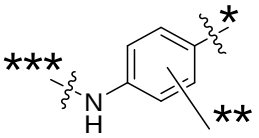
Forma de realización 83. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70 que tiene la estructura:



donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

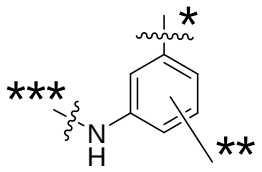
En el siguiente listado de formas de realización enumerados se proveen determinados aspectos y ejemplos de los grupos de conector-fármaco, los conectores y los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención. Se comprenderá que las características especificadas en cada forma de realización se pueden combinar con otras características especificadas para proveer formas de realización adicionales de la presente invención.

Forma de realización 84. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 39, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 61, en donde:

G es  , donde * de G indica el punto de unión a L_2, y ** de G indican el punto de unión a L_3 y *** de G indican el punto de unión a Lp.

Forma de realización 85. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de

realización 1 a 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 39, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 61, en donde:

G es  , donde * de G indica el punto de unión a L_2, y ** de G indican el punto de unión a L_3 y *** de G indican el punto de unión a Lp.

Forma de realización 86. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, en donde:

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_mO(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)O$(CH_2)_mSSC(R^3)_2(CH_2)_mC(=O)NR^3(CH_2)_mNR^3C(=O)(CH_2)_m$-**; *-C(=O)O$(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNH(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNH(CH_2)_nC(=O)$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mX_1(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mC(R^3)_2$-** o *-C(=O)$(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1 si está presente o ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100} si está presente.

Forma de realización 87. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46 y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, en donde:

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_mO(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNH(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNH(CH_2)_nC(=O)$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_mC(R^3)_2$-** o *-C(=O)$(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1 si está presente o ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100} si está presente.

Forma de realización 88. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46 y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, en donde:

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$NH$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$NH$(CH_2)_n$C(=O)-**; o *-C(=O)$(CH_2)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1 si está presente o ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100} si está presente.

Forma de realización 89. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, en donde:

L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**; *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**; *-C(=O)$(CH_2)_m$-** o *-C(=O)NH$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1 si está presente o ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100} si está presente.

Forma de realización 90. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, en donde L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$O$(CH_2)_m$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1 si está presente o ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100} si está presente.

Forma de realización 91. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, en donde L_1 es *-C(=O)$((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1 si está presente o ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100} si está presente.

Forma de realización 92. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, en donde L_1 es *-C(=O)$(CH_2)_m$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de

unión a R^1 si está presente o ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100} si está presente.

Forma de realización 93. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, en donde L_1 es *-$C(=O)NH((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n$-**, donde * de L_1 indica el punto de unión a Lp, y ** de L_1 indican el punto de unión a R^1 si está presente o ** de L_1 indican el punto de unión a R^{100} si está presente.

Forma de realización 94. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 93, en donde Lp es un péptido espaciador bivalente enzimáticamente escindible.

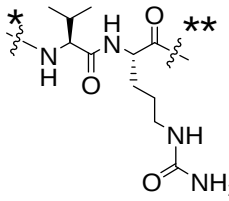
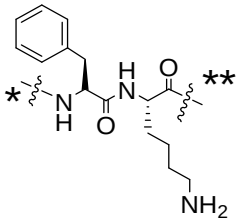
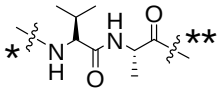
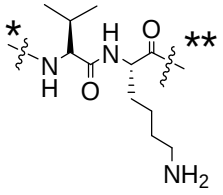
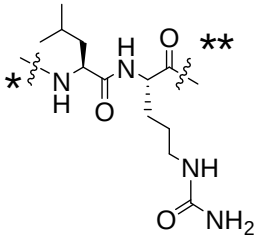
Forma de realización 95. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 94, en donde Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende un residuo de aminoácido seleccionado entre glicina, valina, citrulina, lisina, isoleucina, fenilalanina, metionina, asparagina, prolina, alanina, leucina, triptofano y tirosina.

Forma de realización 96. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 95, en donde Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos.

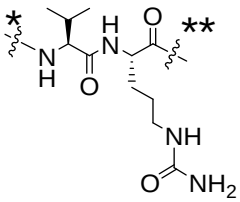
Forma de realización 97. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 96, en donde Lp es un espaciador peptídico bivalente que comprende dos a cuatro residuos de aminoácidos cada uno seleccionado de manera independiente entre glicina, valina, citrulina, lisina, isoleucina, fenilalanina, metionina, asparagina, prolina, alanina, leucina, triptofano y tirosina.

Forma de realización 98. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de

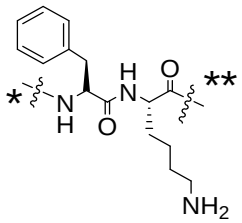
realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 97, en donde:

Lp es un espaciador peptídico bivalente seleccionado entre  (ValCit),  (PheLys),  (ValAla),  (ValLys) y  (LeuCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de la Fórmula (B') o ** de Lp indican el punto de unión al G de la Fórmula (A').

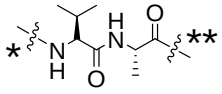
Forma de realización 99. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 98, en donde:

Lp es  (ValCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de la Fórmula (B') o ** de Lp indican el punto de unión al G de la Fórmula (A').

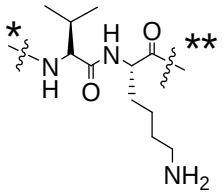
Forma de realización 100. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 98, en donde:

Lp es  (PheLys), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de la Fórmula (B') o ** de Lp indican el punto de unión al G de la Fórmula (A').

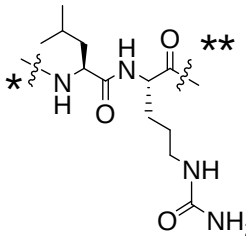
Forma de realización 101. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 98, en donde:

Lp es  (ValAla), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de la Fórmula (B') o ** de Lp indican el punto de unión al G de la Fórmula (A').

Forma de realización 102. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 98, en donde:

Lp es  (ValLys), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión al grupo -NH- de la Fórmula (B') o ** de Lp indican el punto de unión al G de la Fórmula (A').

Forma de realización 103. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 98, en donde:

Lp es  (LeuCit), donde * de Lp indica el punto de unión a L_1 y ** de Lp indican el punto de unión a -NH- grupo de la Fórmula (B') o ** de Lp indican el punto de unión al G de la Fórmula (A').

Forma de realización 104. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 103, en donde L_2 es un enlace, un metileno o un C_2-C_3alquenileno.

Forma de realización 105. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 104, en donde L_2 es un enlace o un metileno.

Forma de realización 106. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 105, en donde L_2 es un enlace.

Forma de realización 107. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 105, en donde L_2 es un metileno.

Forma de realización 108. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 30, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 83, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 107, en donde:

A es un enlace, -OC(=O)-, -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)- o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o un C_3-C_8cicloalquilo.

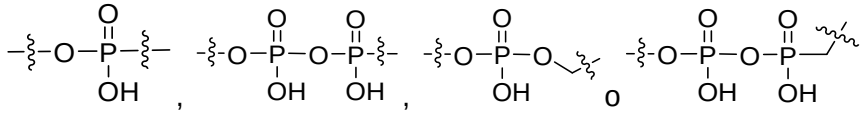
Forma de realización 109. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las

Formas de realización 1 a 30, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 83, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 107, en donde A es un enlace o -OC(=O).

Forma de realización 110. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 30, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 83, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 109, en donde A es un enlace.

Forma de realización 111. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 30, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 83, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 109, en donde A es -OC(=O).

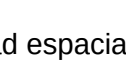
Forma de realización 112. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 30, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 83, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 107, en donde:

A es  .

Forma de realización 113. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 30, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 83, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 107, en donde:

A es -OC(=O)N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)C(=O)- o -OC(=O)N(CH_3)C(R^a)$_2$C(R^a)$_2$N(CH_3)C(=O)-, en donde cada R^a se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o un C_3-C_8cicloalquilo.

Forma de realización 114. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 113, en donde:

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

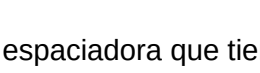
W es -CH_2O-**, -$CH_2N(R^b)C(=O)O$-**, -$NHC(=O)C(R^b)_2NHC(=O)O$-**, -$NHC(=O)C(R^b)_2NH$-**, -$NHC(=O)C(R^b)_2NHC(=O)$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, -$C(=O)N(X\text{-}R^2)$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)$-**, -$C(=O)NR^b$-**, -C(=O)NH-**, -$CH_2NR^bC(=O)$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NH$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NR^b$-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -$OC(=O)NH$-**, -$S(O)_2NH$-**, -$NHS(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

Forma de realización 115. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 114, en donde:

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

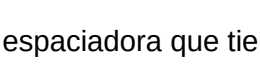
W es -CH_2O-**, -$CH_2N(R^b)C(=O)O$-**, -$NHC(=O)CH_2NHC(=O)O$-**, -$NHC(=O)CH_2NH$-**, -$NHC(=O)CH_2NHC(=O)$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, -$C(=O)N(X\text{-}R^2)$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)$-**, -$C(=O)NR^b$-**, -C(=O)NH-**, -$CH_2NR^bC(=O)$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NH$-**, -$CH_2NR^bC(=O)NR^b$-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -$OC(=O)NH$-**, -$S(O)_2NH$-**, -$NHS(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es un enlace;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

Forma de realización 116. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 115, en donde:

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

W es -CH_2O-**, -$CH_2N(R^b)C(=O)O$-**, -$NHC(=O)CH_2NHC(=O)O$-**, -$NHC(=O)CH_2NH$-**, -

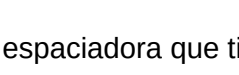
$NHC(=O)CH_2NHC(=O)$-**, $-CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, $-C(=O)N(X\text{-}R^2)$-**, $-CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)$-**, $-C(=O)NR^b$-**, -C(=O)NH-**, $-CH_2NR^bC(=O)$-**, $-CH_2NR^bC(=O)NH$-**, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b$-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, $-S(O)_2NH$-**, $-NHS(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es a triazolilo, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

Forma de realización 117. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 115, en donde:

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

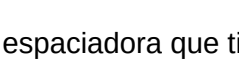
W es $-CH_2O$-**, $-CH_2N(R^b)C(=O)O$-**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)O$-**, $-NHC(=O)CH_2NH$-**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)$-**, $-CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, $-C(=O)N(X\text{-}R^2)$-**, $-CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)$-**, $-C(=O)NR^b$-**, -C(=O)NH-**, $-CH_2NR^bC(=O)$-**, $-CH_2NR^bC(=O)NH$-**, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b$-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, $-S(O)_2NH$-**, $-NHS(O)_2$-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** o -NH-, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

Forma de realización 118. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 115, en donde:

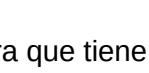
L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

donde

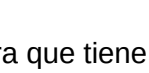
W es $-CH_2O$-**, $-CH_2N(R^b)C(=O)O$-**, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)O$-**, $-CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, -

C(=O)N(X-R^2)-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;
X es un enlace, triazolilo o ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;
y
* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

Forma de realización 119. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 115, en donde:

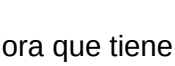
L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,
donde
W es -CH_2O-**, -CH_2N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;
X es un enlace ;
y
* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

Forma de realización 120. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 115, en donde:

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,
donde
W es -CH_2O-**, -CH_2N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-**, -CH_2N(X-R^2)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R^2)-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;
X es a triazolilo, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;
y
* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

Forma de realización 121. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector

de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 115, en donde:

L_3 es una unidad espaciadora que tiene la estructura  ,

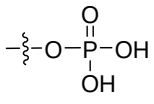
donde

W es -CH_2O-**, -$CH_2N(R^b)C(=O)O$-**, -$NHC(=O)CH_2NHC(=O)O$-**, -$CH_2N(X\text{-}R^2)C(=O)O$-**, -$C(=O)N(X\text{-}R^2)$-**, en donde cada R^b se selecciona de manera independiente entre H, C_1-C_6alquilo o C_3-C_8cicloalquilo y en donde ** de W indican el punto de unión a X;

X es ***-CH_2-triazolil-*, en donde *** de X indican el punto de unión a W y el * de X indica el punto de unión a R^2;

y

* de L_3 indica el punto de unión a R^2.

Forma de realización 122. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 121, en donde R^2 es una unidad hidrofílica seleccionada entre polietilenglicol, polialquilenglicol, un azúcar, un oligosacárido, un polipéptido o C_2-C_6alquilo sustituido con 1 a 3 grupos  .

Forma de realización 123. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es un azúcar.

Forma de realización 124. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es un oligosacárido.

Forma de realización 125. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es un polipéptido.

Forma de realización 126. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es a polialquilenglicol.

Forma de realización 127. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es un polialquilenglicol que tiene la estructura -$(O(CH_2)_m)_tR'$, donde R' es OH, OCH_3 o $OCH_2CH_2C(=O)OH$, m es 1-10 y t es 4-40.

Forma de realización 128. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es un polialquilenglicol que tiene la estructura -$((CH_2)_mO)_tR''$-, donde R'' es H, CH_3 o $CH_2CH_2C(=O)OH$, m es 1-10 y t es 4-40.

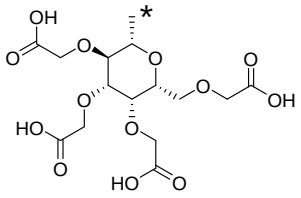
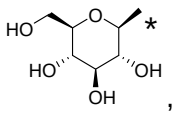
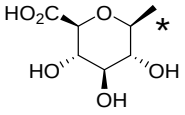
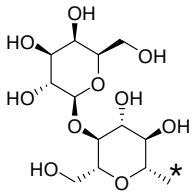
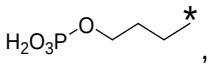
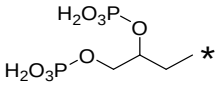
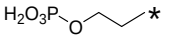
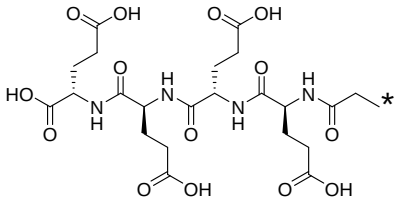
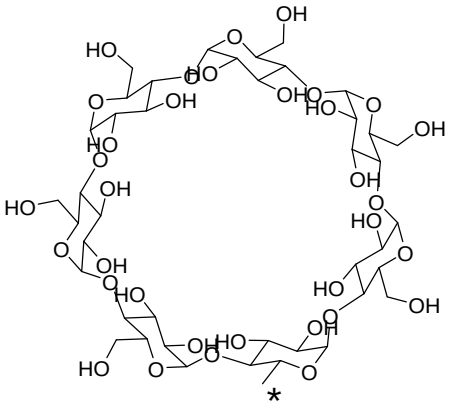
Forma de realización 129. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es un polietilenglicol.

Forma de realización 130. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es un polietilenglicol que tiene la estructura -$(OCH_2CH_2)_tR'$, donde R' es OH, OCH_3 o $OCH_2CH_2C(=O)OH$ y t es 4-40,

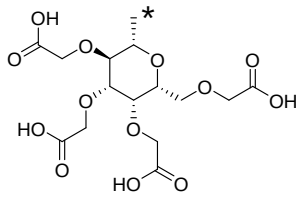
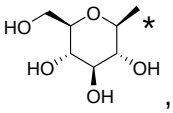
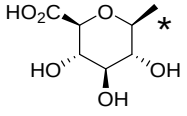
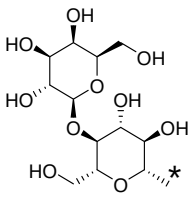
Forma de realización 131. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde R^2 es un polietilenglicol que tiene la estructura -$(CH_2CH_2O)_tR''$-, donde R'' es H, CH_3 o $CH_2CH_2C(=O)OH$ y t es 4-40.

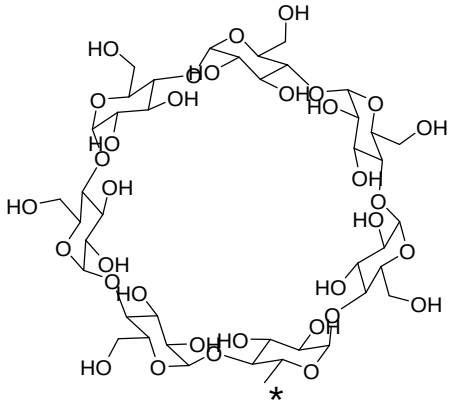
Forma de realización 132. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector

de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde:

R^2 es  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , o  , donde * de R^2 indica el punto de unión a X o L_3.

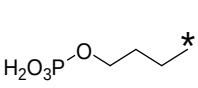
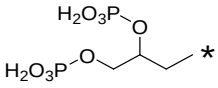
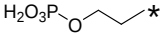
Forma de realización 133. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde:

R^2 es  ,  ,  ,  , o

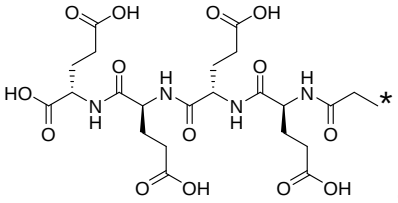


, donde * de R^2 indica el punto de unión a X o L_3.

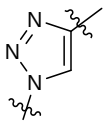
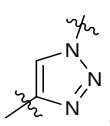
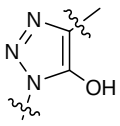
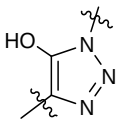
Forma de realización 134. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde:

R^2 es  ,  o  , donde * de R^2 indica el punto de unión a X o L_3.

Forma de realización 135. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 122, en donde:

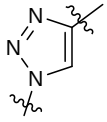
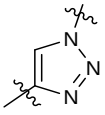
R^2 es  , donde * de R^2 indica el punto de unión a X o L_3.

Forma de realización 136. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 135, en donde:

X_1 es  ,  ,  o  .

Forma de realización 137. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector

de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 135, en donde:

X_1 es  o  .

Forma de realización 138. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 137, en donde:

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4 y 5.

Forma de realización 139. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 137, en donde:

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2 y 3.

Forma de realización 140. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 139, en donde:

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4 y 5.

Forma de realización 141. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 139, en donde:

cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2 y 3.

Forma de realización 142. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 141, en donde:

cada t se selecciona de manera independiente entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

Forma de realización 143. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 141, en donde:
cada t se selecciona de manera independiente entre 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25.

Forma de realización 144. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conector de la Fórmula (C') o cualquiera de las Formas de realización 32 a 46, y el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 141, en donde:
cada t se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Forma de realización 145. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14.

Forma de realización 146. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12.

Forma de realización 147. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

Forma de realización 148. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ú 8.

Forma de realización 149. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Forma de realización 150. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 1, 2, 3 ó 4.

Forma de realización 151. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 1 ó 2.

Forma de realización 152. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de

las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 2.

Forma de realización 153. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 4.

Forma de realización 154. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 6.

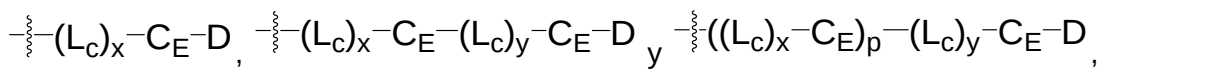
Forma de realización 155. El inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 144, en donde y es 8.

Forma de realización 156. El compuesto de la Fórmula (A') o cualquiera de las Formas de realización 1 a 30, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el inmunoconjugado de la Fórmula (E') o cualquiera de las Formas de realización 60 a 70, o cualquiera de las Formas de realización 84 a 155, en donde D es un inhibidor de Mcl-1 cuando es liberado de los inmunoconjugados.

Otros grupos conectores

Otros ejemplos de grupos conectores que son adecuados para elaborar los ADC o los inmunoconjugados de un inhibidor de Mcl-1 divulgado en la presente incluyen los que se divulgan en las publicaciones de Solicitud Internacional tales como WO2018200812, WO2017214456, WO2017214458, WO2017214462, WO2017214233, WO2017214282, WO2017214301, WO2017214322, WO2017214335, WO2017214339, WO2016094509, WO2016094517 y WO2016094505, cada uno de cuyos contenidos se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

Por ejemplo, los inmunoconjugados de inhibidores de Mcl-1 que se divulgan en la presente pueden presentar una estructura de conector-carga útil ("-L-D") seleccionada entre:



en donde:

Lc es un componente conector y cada Lc se selecciona de manera independiente entre un componente conector divulgado en la presente;

x es un número entero seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20;

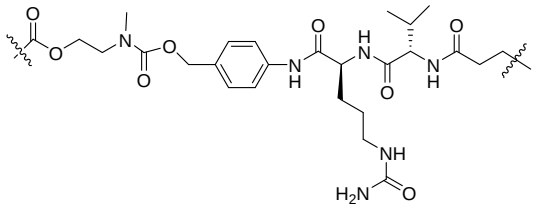
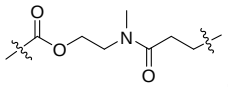
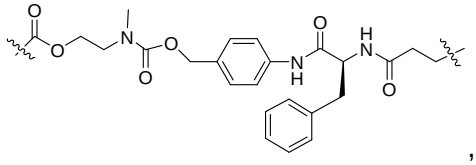
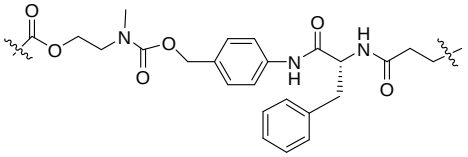
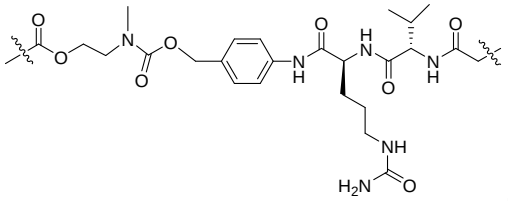
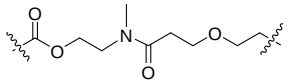
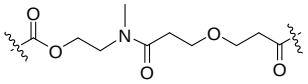
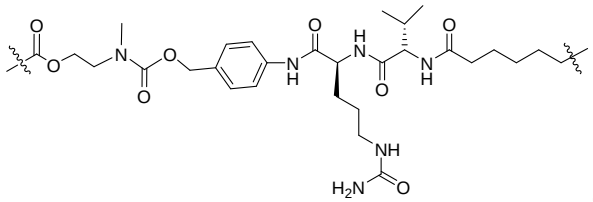
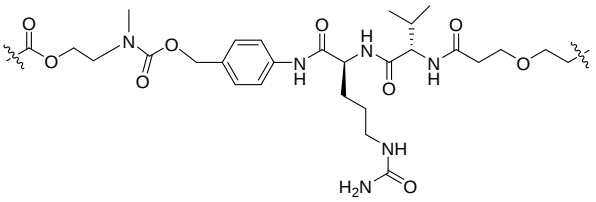
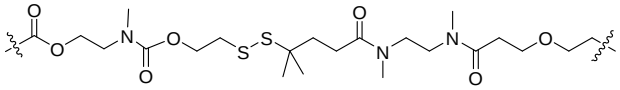
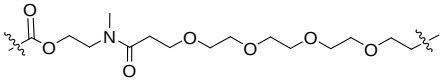
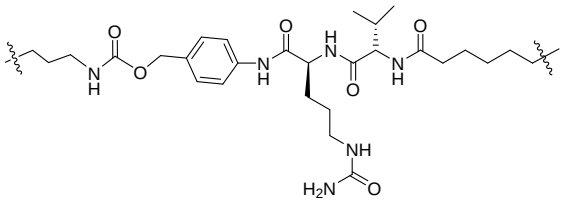
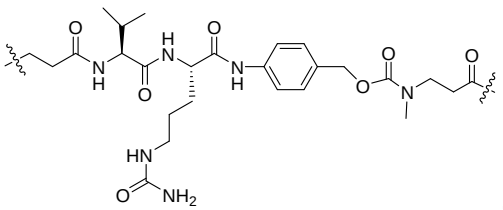
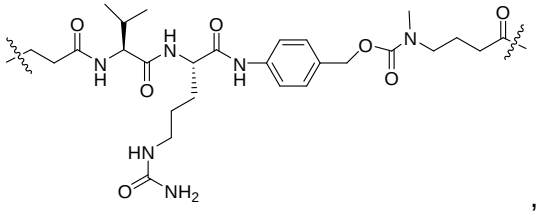
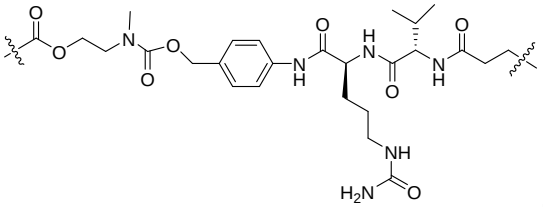
y es un número entero seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20;

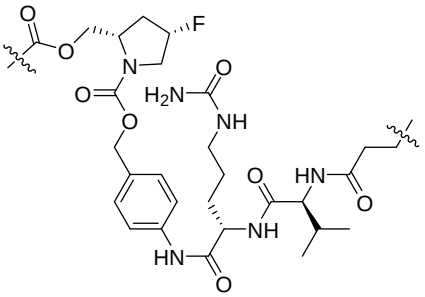
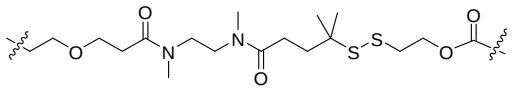
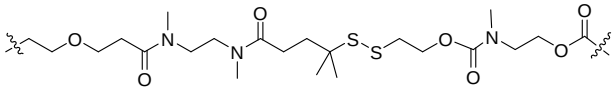
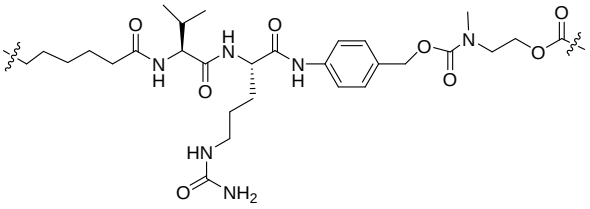
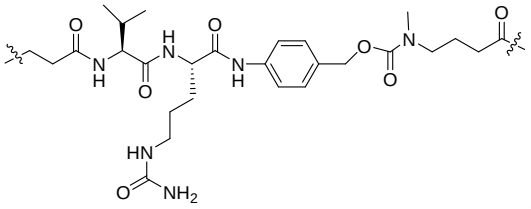
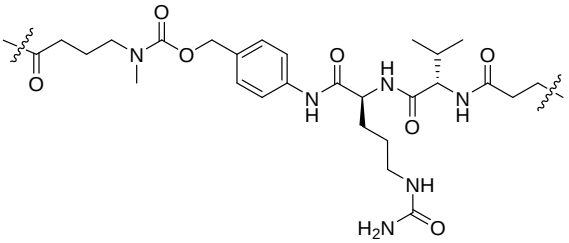
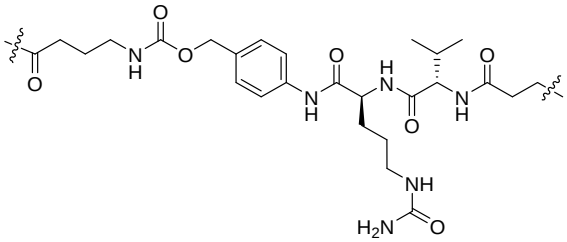
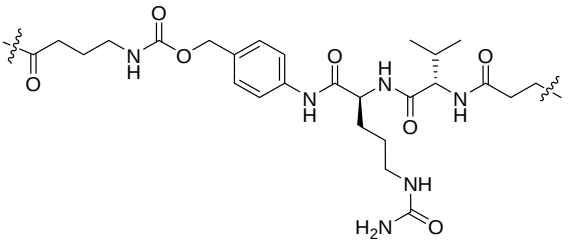
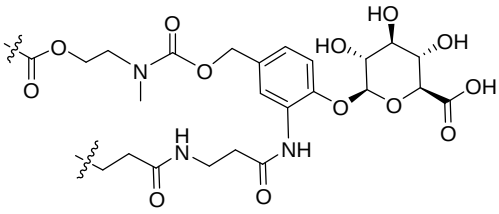
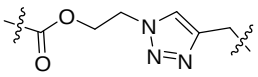
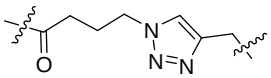
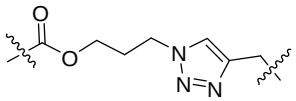
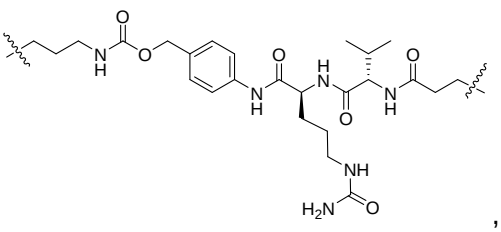
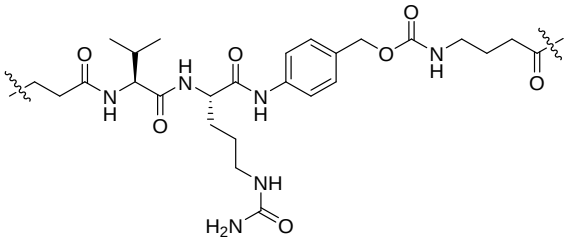
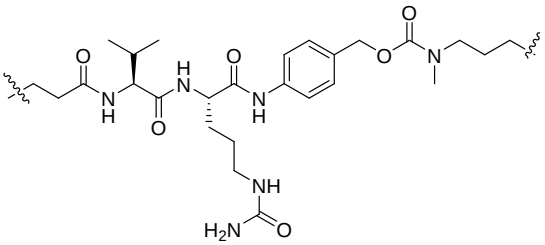
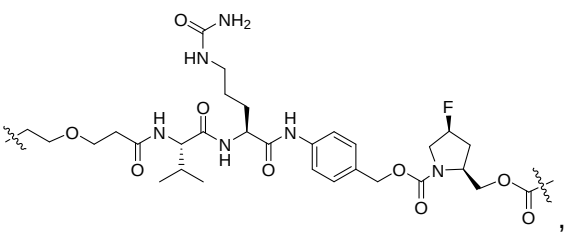
p es un número entero seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

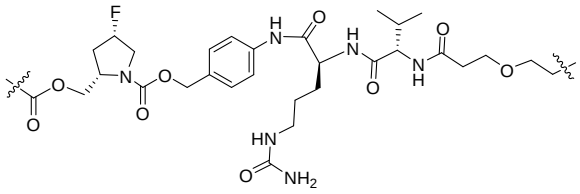
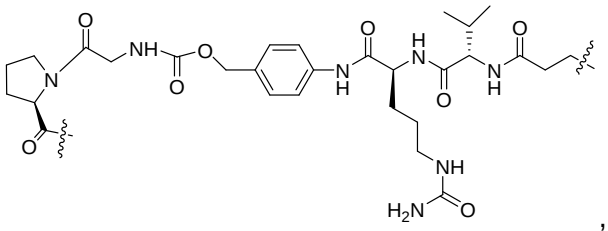
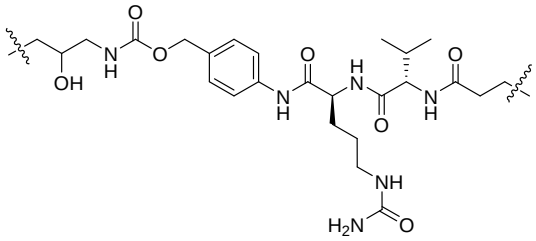
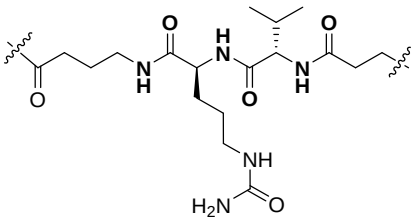
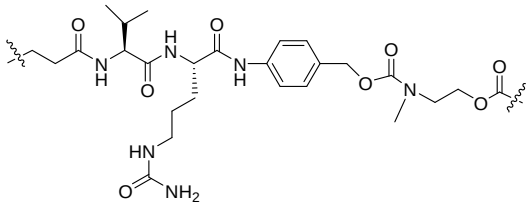
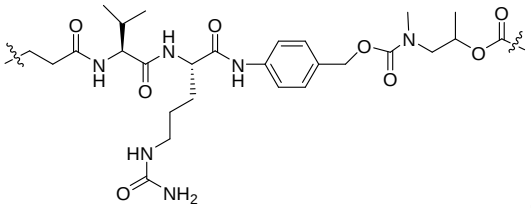
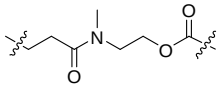
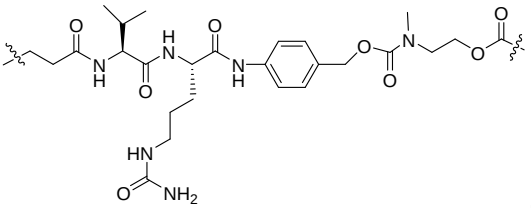
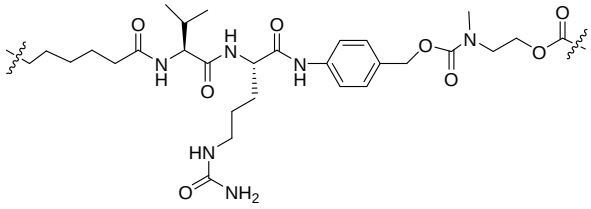
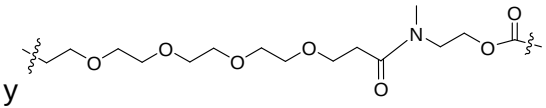
D es un inhibidor de Mcl-1 divulgado en la presente;

y cada elemento de escisión (C_E) se selecciona de manera independiente entre un espaciador autoescindible y un grupo que es susceptible a una escisión seleccionada entre escisión inducida por ácido, escisión inducida por peptidasas, escisión inducida por esterasas, escisión inducida por glicosidasas, escisión inducida por fosfodiesterasas, escisión inducida por fosfatasas, escisión inducida por proteasas, escisión inducida por lipasas o escisión de enlaces disulfuro.

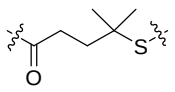
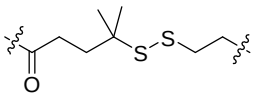
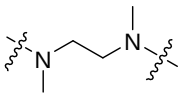
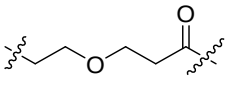
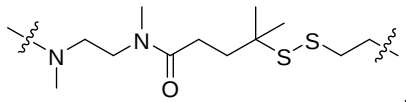
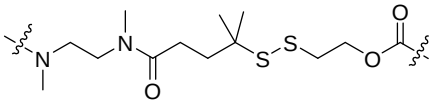
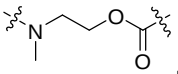
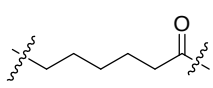
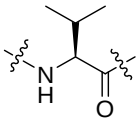
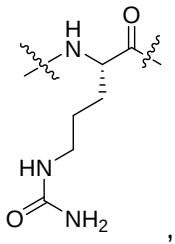
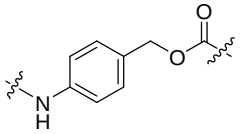
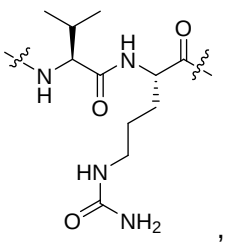
En algunas formas de realización, L tiene una estructura seleccionada entre las que siguen, o L comprende un componente estructural seleccionado entre los que siguen:

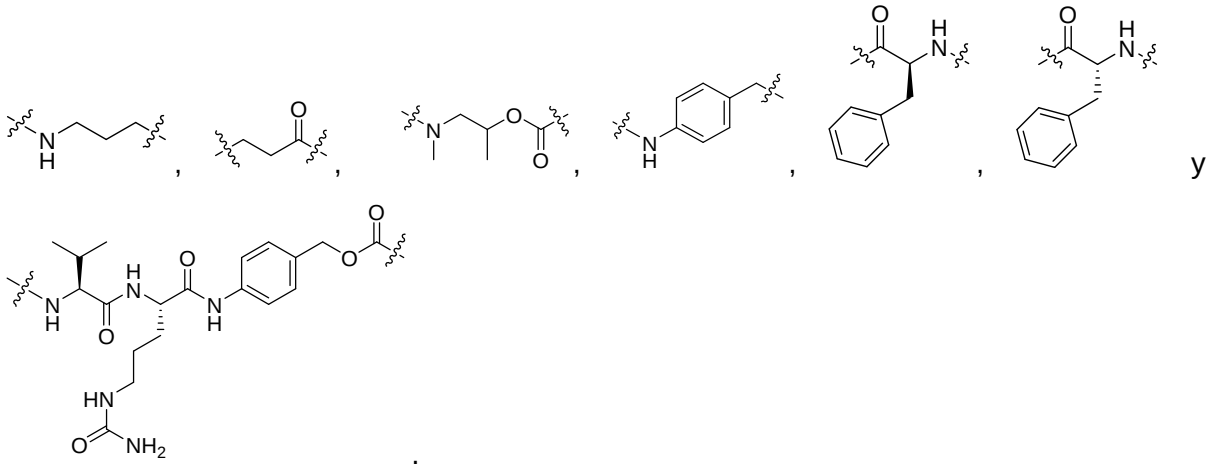

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

, y

.

En algunas formas de realización, Lc es un componente conector y cada Lc se selecciona de manera independiente entre:


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



En algunas formas de realización, el conector L comprende un componente conector que se selecciona entre:

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)OC(R^{12})$_2$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$C(=O)-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_4$C(=O)NR^{11}(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)X$_4$C(=O)NR^{11}(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$X$_6$C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$-

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$X$_6$C(=O)(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O(CH$_2$)$_m$X$_6$C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$X$_6$C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$X$_6$C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$X$_6$C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$C(=O)-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$X$_6$C(=O)X$_4$C(=O)NR^{11}(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)X$_4$C(=O)X$_6$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)(CH$_2$)$_m$X$_6$C(=O)X$_{1a}$X$_{2a}$C(=O)(CH$_2$)$_m$-; -

**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C (=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)

(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O))X$_5$C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_n$ (CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_n$ (CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$X$_3$ (CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$(CH$_2$)$_m$NR^{11}((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)(CH$_2$)$_m$NR^{11}((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)X$_5$(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}(CH$_2$)$_m$C(=O)X$_{2a}$X$_{1a}$C(=O)-;

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

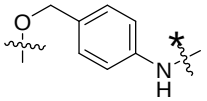
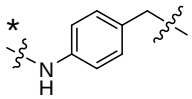
-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$X$_3$(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$X$_3$(CH$_2$)$_m$-;

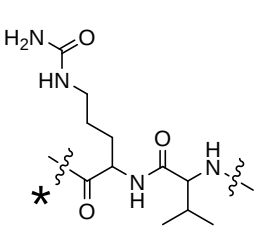
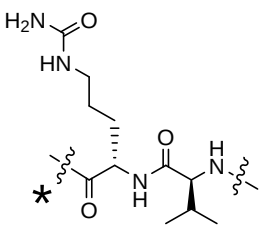
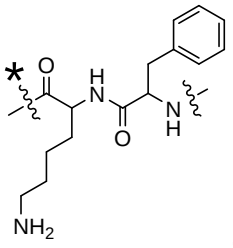
-**C(=O)O((CH$_2$)$_m$O)$_n$(CH$_2$)$_m$C(=O)NR^{11}(CH$_2$)$_m$-; -**C(=O)O(CH$_2$)$_m$C(R^{12})$_2$-;

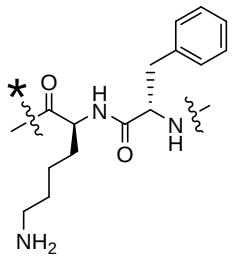
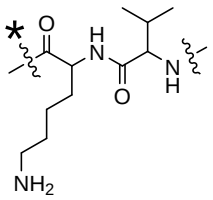
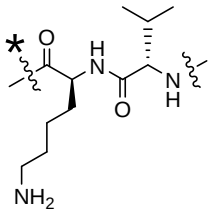
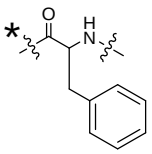
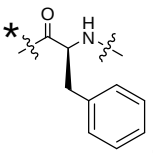
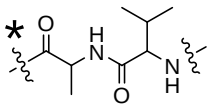
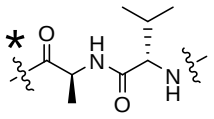
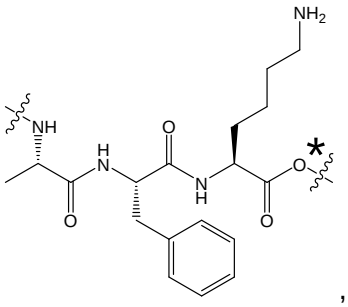
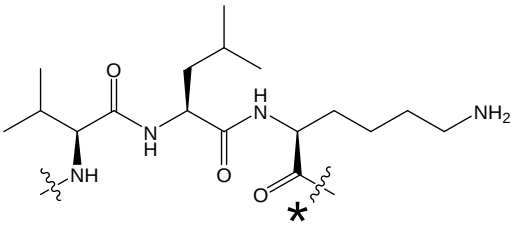
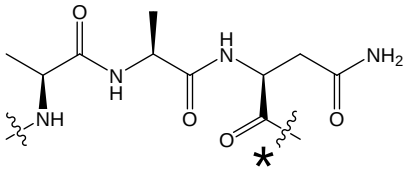
-**C(=O)OCH$_2$)$_m$C(R^{12})$_2$SS(CH$_2$)$_m$NR^{11}C(=O)(CH$_2$)$_m$-, y

-**C(=O)O(CH$_2$)$_m$C(=O)NR^{11}(CH$_2$)$_m$-, donde: ** indican un punto de unión a la unidad de fármaco (D) y el otro extremo se puede unir a R^{100}, es decir, el grupo de acoplamiento descrito en la presente;

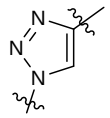
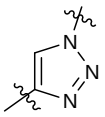
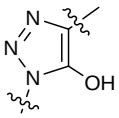
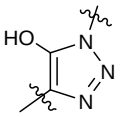
en donde:

X$_{1a}$ es  o  , donde * indica el punto de unión a X$_{2a}$;

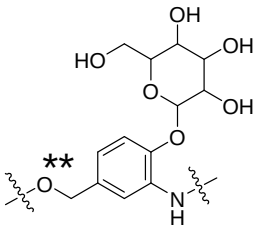
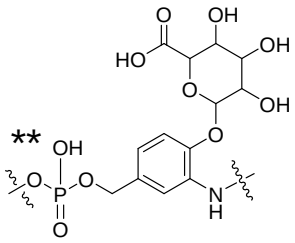
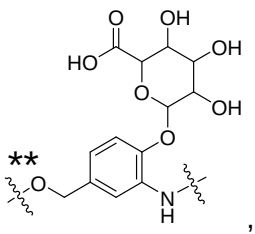
X$_{2a}$ se selecciona entre  ,  ,  ,


,

,

,

,

,

,

,

,


, y ;

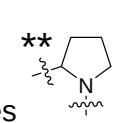
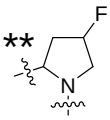
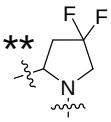
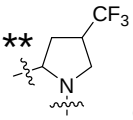
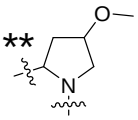
donde * indica el punto de unión a X_{1a};

X_3 es 
, 
, 
o 
;

X_4 es $-O(CH_2)_nSSC(R^{12})_2(CH_2)_n-$ o $-(CH_2)_nC(R^{12})_2SS(CH_2)_nO-$;

X_5 es 
, 
o 
,

donde ** indican la orientación hacia la unidad de fármaco;

X_6 es 
, 
, 
, 
o 
, donde ** indican la orientación hacia la unidad de fármaco;

cada R^{11} se selecciona de manera independiente entre H y C_1-C_6alquilo;

cada R^{12} se selecciona de manera independiente entre H y C_1-C_6alquilo;

cada m se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

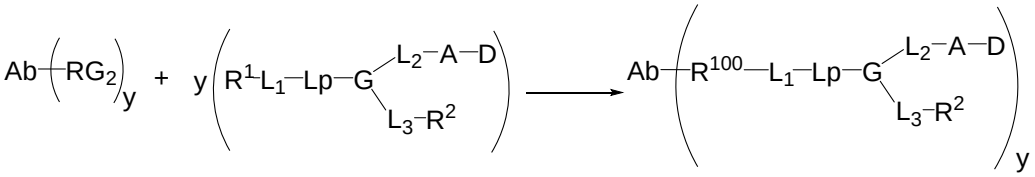
cada n se selecciona de manera independiente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,17 y 18.

Métodos de conjugación

La presente invención provee diversos métodos para conjugar los grupos de conector-fármaco de la invención con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo para producir conjugados de anticuerpo-fármaco que comprendan un conector que tiene una o más unidades hidrofílicas.

En el siguiente Esquema 2 se muestra un esquema de reacción general para la formación de los conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (E'):

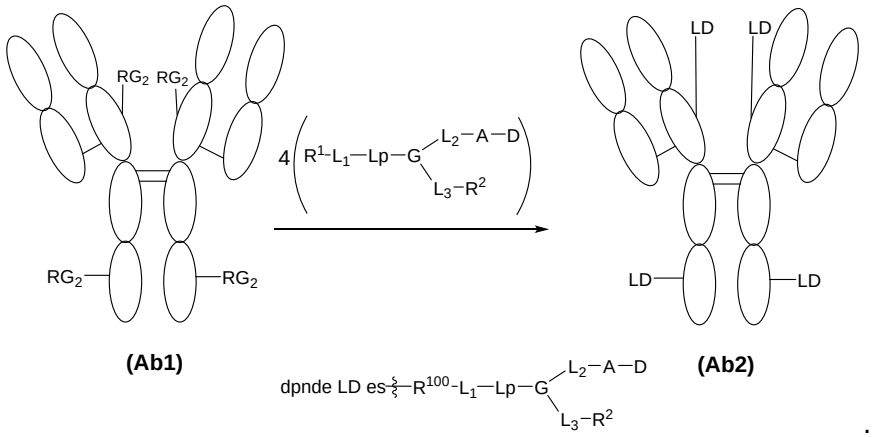
Esquema 2



donde: RG_2 es un grupo reactivo que reacciona con un grupo R^1 compatible para formar un grupo R^{100} correspondiente (dichos grupos se ilustran en la Tabla 2 y la Tabla 3). D, R^1, L_1, Lp, Ab, Y y R^{100} son como se definen en la presente.

El Esquema 3 también ilustra este abordaje general para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (E'), en donde el anticuerpo comprende grupos reactivos (RG_2) que reaccionan con un grupo R^1 (definido en la presente) para unir de manera covalente el grupo de conector-fármaco al el anticuerpo por medio de un grupo R^{100} (definido en la presente). A efectos ilustrativos solamente, en el Esquema 3 se muestra un anticuerpo que tiene cuatro grupos RG_2.

Esquema 3

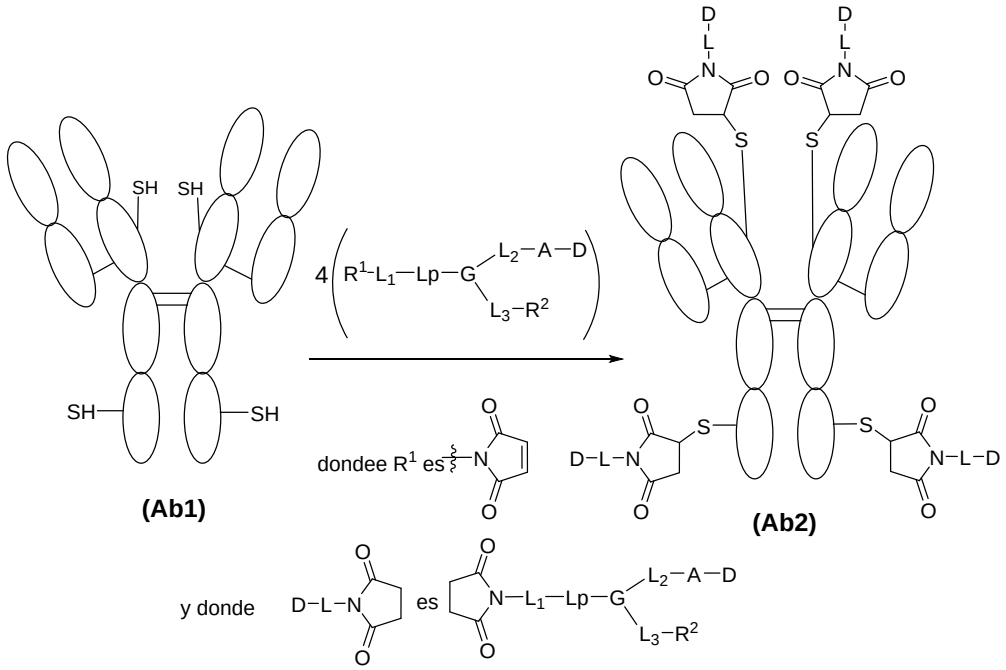


.

En un aspecto, los grupos de conector-fármaco se conjugan con el anticuerpos a través de residuos cisteína modificados en los anticuerpos (véase, por ejemplo, WO2014/124316). El Esquema 4 ilustra este abordaje para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (E') en donde un grupo tiol libre generado a partir de los residuos cisteína modificados en el anticuerpo reaccionan con un grupo R^1 (donde R^1 es una maleimida) para unir de manera covalente el grupo de conector-fármaco al anticuerpo mediante un grupo R^{100}

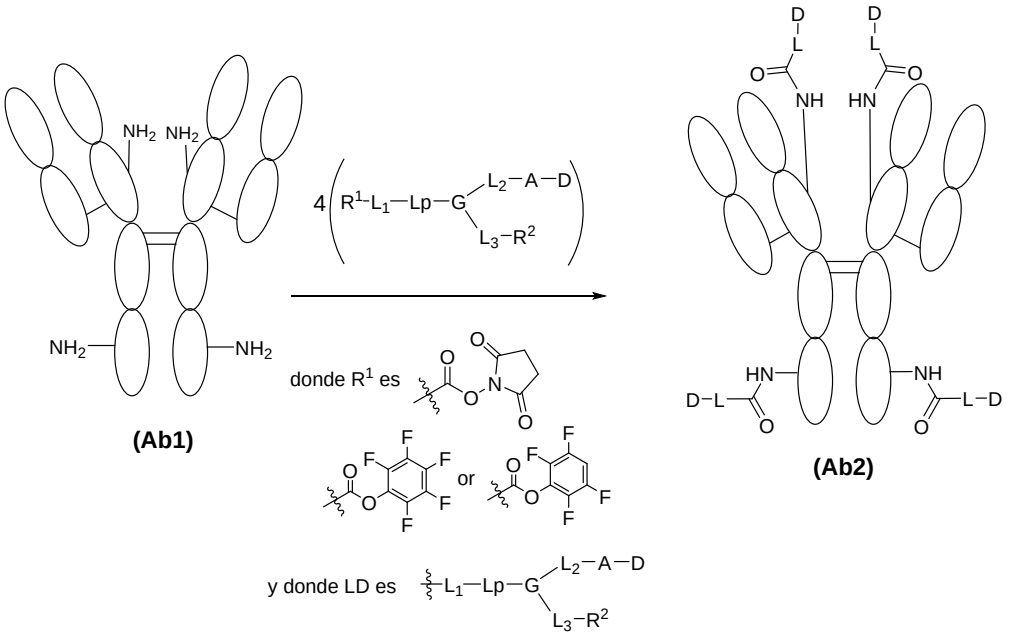
(donde R^{100} es un anillo succinimida). A efectos ilustrativos solamente, el Esquema 4 muestra un anticuerpo que tiene cuatro grupos tiol libres.

Esquema 4



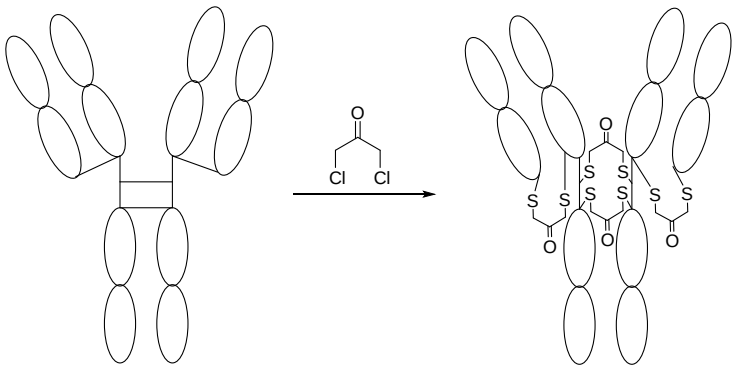
En otro aspecto, los grupos de conector-fármaco se conjugan con los anticuerpos a través de residuos lisina en los anticuerpos. El Esquema 5 ilustra este abordaje para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (E') en donde un grupo amina libre de los residuos lisina en el anticuerpo reaccionan con un grupo R^1 (donde R^1 es un éster NHS, un pentafluorofenilo o un tetrafluorofenilo) para unir de manera covalente el grupo de conector-fármaco al anticuerpo mediante un grupo R^{100} (donde R^{100} es una amida). A efectos ilustrativos solamente, el Esquema 5 muestra un anticuerpo que tiene cuatro grupos amina.

Esquema 5

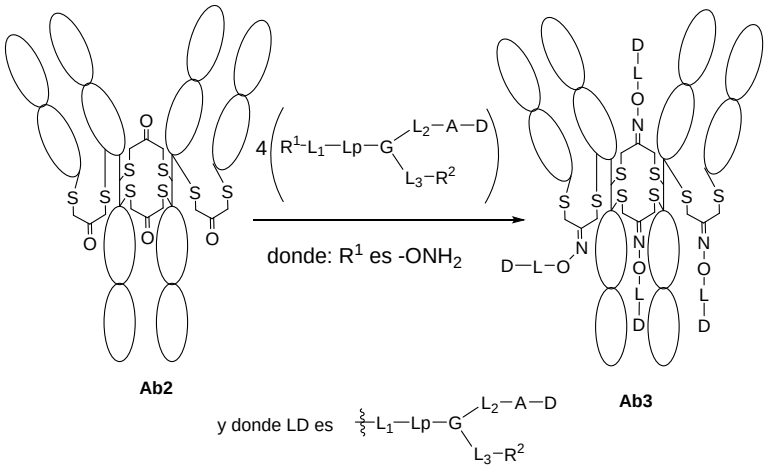


En otro aspecto, los grupos de conector-fármaco se conjugan con el anticuerpos mediante la formación de un punte oxima en los puentes disulfuro naturales de un anticuerpo. El puente de oxima se forma creando inicialmente un puente de cetona mediante reducción de un puente disulfuro intercatenario del anticuerpo y volver a formar puentes usando una 1,3-dihaloacetona (por ejemplo, 1,3-dicloroacetona). La reacción subsiguiente con un grupo de conector-fármaco que comprende una hidroxilamina forma así un enlace oxima (puente de oxima) que une el grupo de conector-fármaco al anticuerpo (véase, por ejemplo, WO2014/083505). El Esquema 6 ilustra este abordaje para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (E').

Esquema 6



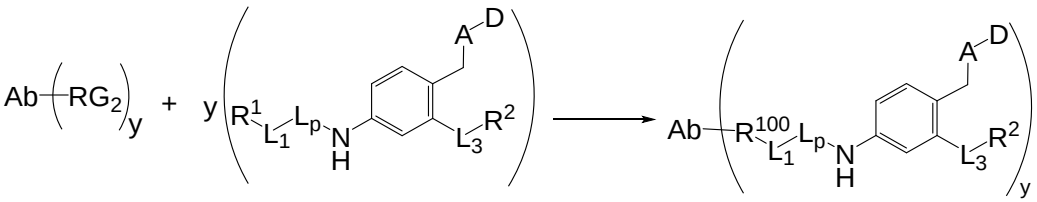
(Ab1) **(Ab2)**
(4 disulfuros intercatenarios modificados (Ab1))



.

En el siguiente Esquema 7 se muestra un esquema de reacción general para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (F'):

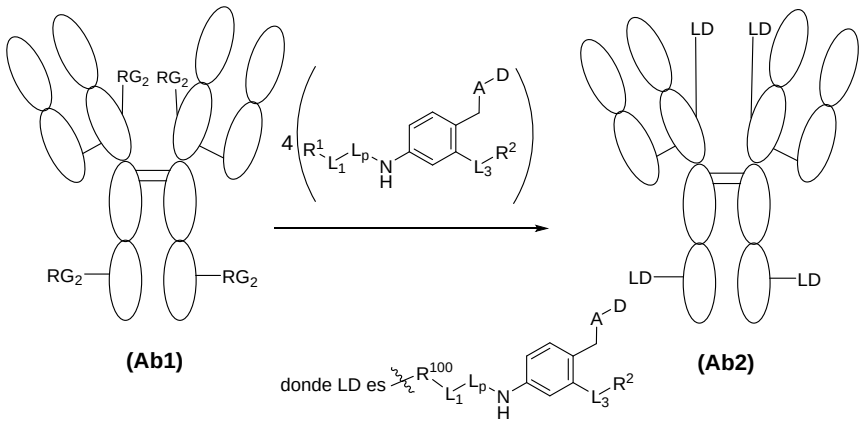
Esquema 7



donde: RG_2 es un grupo reactivo que reacciona con un grupo R^1 compatible para formar un grupo R^{100} correspondiente (dichos grupos se ilustran en la Tabla 2 y la Tabla 3). D, R^1, L_1, Lp, Ab, Y y R^{100} son como se definen en la presente.

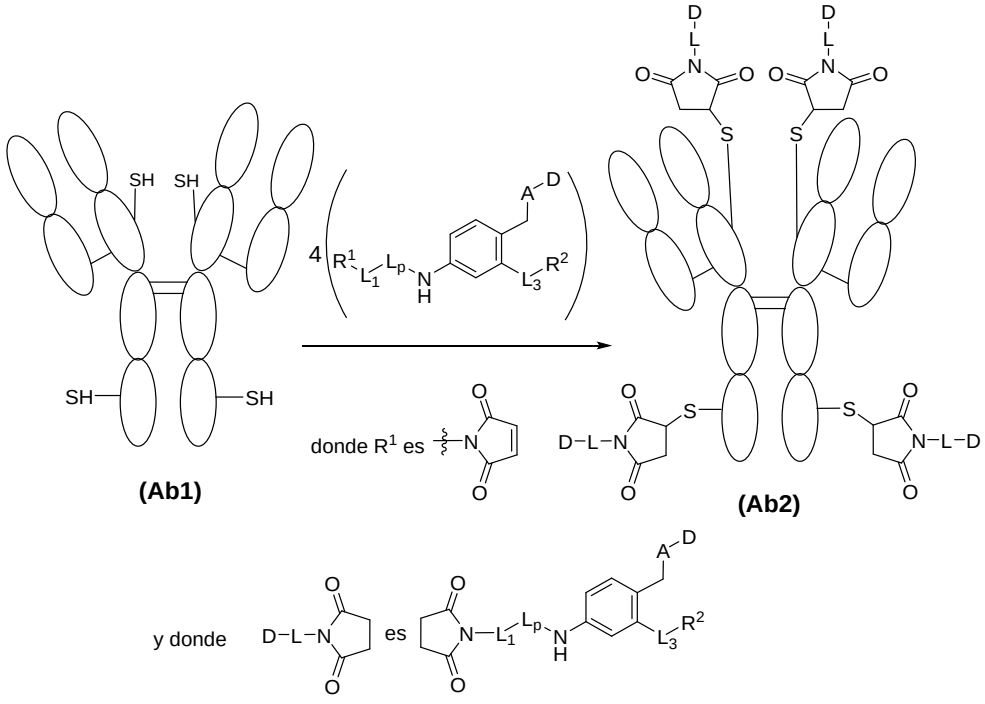
El Esquema 8 también ilustra este abordaje general para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (F'), en donde el anticuerpo comprende grupos reactivos (RG_2) que reaccionan con un grupo R^1 (definido en la presente) para unir de manera covalente el grupo de conector-fármaco al anticuerpo mediante un grupo R^{100} (definido en la presente). A efectos ilustrativos solamente, el Esquema 8 muestra un anticuerpo que tiene cuatro grupos RG_2.

Esquema 8



En un aspecto, los grupos de conector-fármaco se conjugan con el anticuerpos a través de residuos cisteína modificados en los anticuerpos (véase, por ejemplo, WO2014/124316). El Esquema 9 ilustra este abordaje para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (F') en donde un grupo tiol libre generado a partir de los residuos cisteína modificados en el anticuerpo reaccionan con un grupo R^1 (donde R^1 es una maleimida) para unir de manera covalente el grupo de conector-fármaco al anticuerpo mediante un grupo R^{100} (donde R^{100} es un anillo succinimida). A efectos ilustrativos solamente, el Esquema 9 muestra un anticuerpo que tiene cuatro grupos tiol libres.

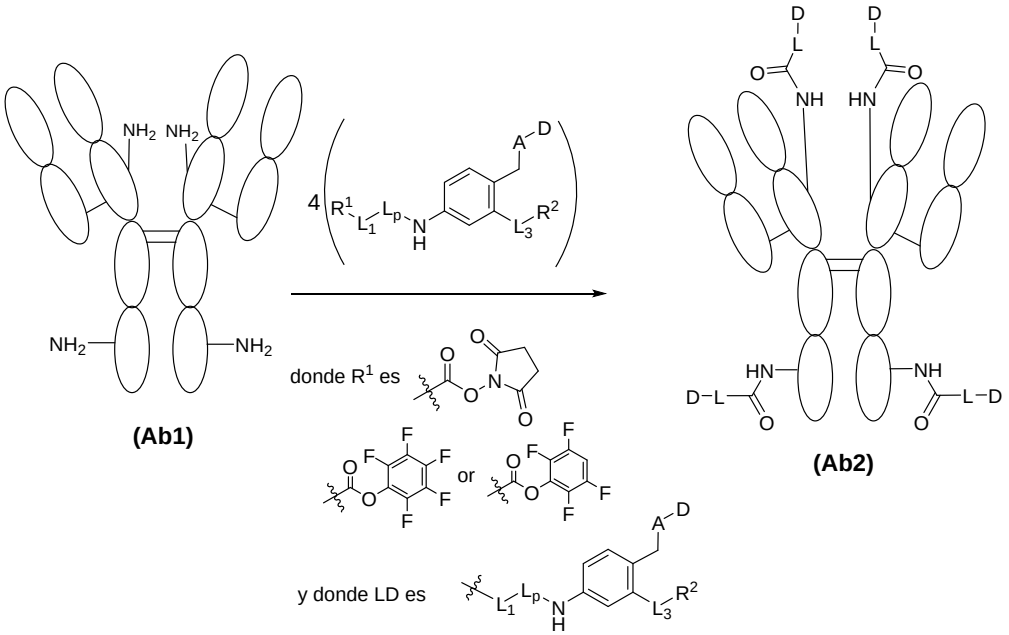
Esquema 9



En otro aspecto, los grupos de conector-fármaco se conjugan con el anticuerpos a través de residuos lisina en los anticuerpos. El Esquema 10 ilustra este abordaje para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (F') en donde un grupo amina libre de los residuos lisina en el anticuerpo reaccionan con un grupo R^1 (donde R^1 es un éster NHS, un pentafluorofenilo o un tetrafluorofenilo) para unir de manera covalente el grupo de conector-

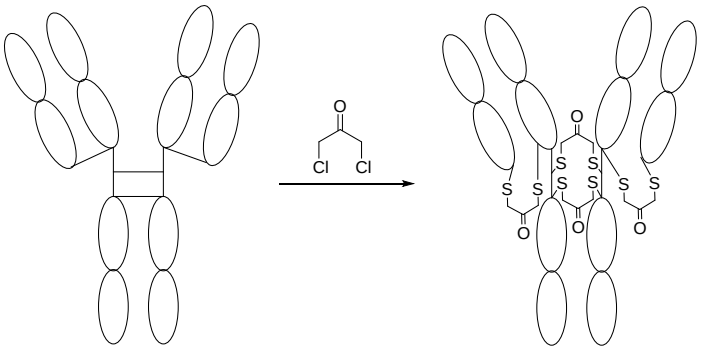
fármaco al anticuerpo mediante un grupo R^{100} (donde R^{100} es una amida). A efectos ilustrativos solamente, el Esquema 10 muestra un anticuerpo que tiene cuatro grupos amina.

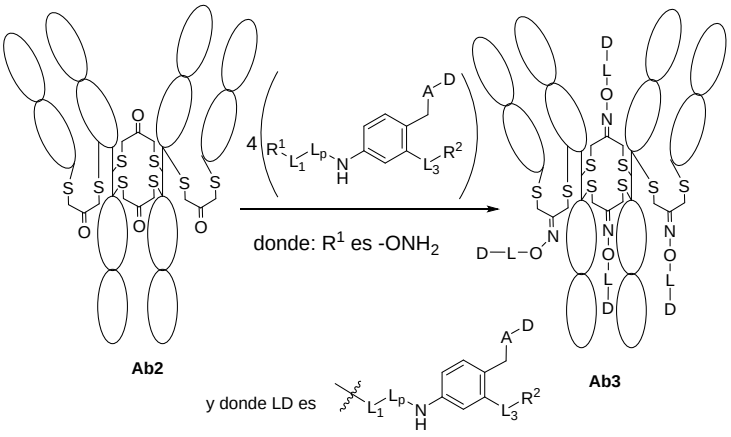
Esquema 10



En otro aspecto, los grupos de conector-fármaco se conjugan con el anticuerpos mediante formación de un punte oxima en los puentes disulfuro naturales de un anticuerpo. El puente de oxima se forma creando inicialmente un puente de cetona mediante reducción de un puente disulfuro intercatenario del anticuerpo y volver a formar puentes usando una 1,3-dihaloacetona (por ejemplo 1,3-dicloroacetona). La reacción subsiguiente con un grupo de conector-fármaco que comprende una hidroxilamina forma así un enlace oxima (puente de oxima) que une el grupo de conector-fármaco al anticuerpo (véase, por ejemplo, WO2014/083505). El Esquema 11 ilustra este abordaje para la formación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la Fórmula (F').

Esquema 11





.

También se proveen protocolos para algunos aspectos de la metodología analítica para evaluar los conjugados de anticuerpo de la invención. Dicha metodología y los resultados pueden demostrar que los conjugados tienen propiedades favorables, por ejemplo propiedades que facilitarían su elaboración, facilitarían su administración a pacientes, para que fueran más eficaces y/o potencialmente más seguros para los pacientes. Un ejemplo es la determinación del tamaño molecular mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), con la cual se puede determinar la cantidad de las especies de anticuerpo deseadas en una muestra con relación a la cantidad de contaminantes de alto peso molecular (por ejemplo, dímeros, multímeros o agregados de anticuerpos) o contaminantes de bajo peso molecular (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo, productos de degradación o cadenas de anticuerpo individuales) presentes en la muestra. En general, resulta deseable que haya mayores cantidades de monómeros y menores cantidades, por ejemplo, de anticuerpo agregado debido al impacto, por ejemplo, de los agregados sobre otras propiedades de la muestra de anticuerpo tales como, pero en un sentido no taxativo, velocidad de depuración, inmunogenicidad y toxicidad. Un ejemplo adicional es la determinación de la hidrofobicidad mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), en donde se evalúa la hidrofobicidad de una muestra con relación a un conjunto de anticuerpos estándar de propiedades conocidas. En general, resulta deseable tener una baja hidrofobicidad debido al impacto de la hidrofobicidad sobre otras propiedades de la muestra de anticuerpos tales como, pero en

un sentido no taxativo, agregación, agregación en el tiempo, adherencia a superficies, hepatotoxicidad, velocidades de depuración y exposición farmacocinética. Véase Damle, N.K., *Nat Biotechnol*. 2008; 26(8): 884-885; Singh, S.K., *Pharm Res*. 2015; 32(11): 3541-71. Cuando se mide con cromatografía de interacción hidrofóbica, los puntajes del índice de mayor hidrofobicidad (es decir, elución más rápida de la columna HIC) reflejan una menor hidrofobicidad de los conjugados. Según se muestra en los siguientes Ejemplos, la mayoría de los conjugados de anticuerpo evaluados muestran un índice de hidrofobicidad mayor que 0,8. En algunas formas de realización, se proveen conjugados de anticuerpo que tienen un índice de hidrofobicidad 0,8 o mayor, determinado mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.

EJEMPLOS

[376] Los siguientes ejemplos proveen Formas de realización ilustrativas de la divulgación. Un especialista en el arte comprenderá que se pueden efectuar numerosas modificaciones y variaciones sin alterar el espíritu o alcance de la divulgación. Dichas modificaciones y variaciones están incluidas en el alcance de la divulgación. Los ejemplos provistos no limitan la divulgación en modo alguno.

Ejemplo 1: **Síntesis y caracterización de conectores, conectores-cargas útiles y precursores de los mismos.**

[377] Los ejemplos de conectores, conectores-cargas útiles y precursores de los mismos se sintetizaron usando ejemplos de los métodos que se describen en este ejemplo.

Abreviaturas:

CuI	yoduro de cobre(I)
DCC	diciclohexil carbodiimida
DCM	diclorometano
DEA	N-etiletanamina
DIPEA:	N,N-diisopropiletilamina
DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EEDQ	2-etoxi-2H-quinolin-1-carboxilato de etilo
	Fmoc-Cit-OH ácido (2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoico
	HBTU: Hexafluorofosfato de (2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HOAt:	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
THF	tetrahidrofurano
$MgSO_4$	sulfato de magnesio
NH_4Cl	Cloruro de amonio

NMP	N-metilpirrolidona
$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	dicloro-tri(trifenilfosfin)paladio
PBr_3	tribromofosfano
Pt/C 10%	platino sobre carbón al 10%
$SOCl_2$	cloruro de tionilo
TBAI	tetrabutilamonio, yoduro
TFA	ácido trifluoroacético

Materiales, métodos y procedimientos generales:

[378] Todos los reactivos obtenidos de fuentes comerciales se usaron sin purificación adicional. Los solventes anhidros se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin secado adicional. La cromatografía flash se realizó utilizando CombiFlash Rf (Teledyne ISCO) con cartuchos de gel de sílice preempaquetados (Macherey-Nagel Chromabond Flash). La cromatografía en capa delgada se condujo con placas de 5 x 10 cm recubiertas sobre gel de sílice Tipo 60 F254 de Merck. El calentamiento con microondas se efectuó con un instrumento CEM Discover®.

[379] Las mediciones de ^{1}H-RMN se realizaron con un espectrómetro de 400 MHz Bruker Avance o 500 MHz Avance Neo, usando DMSO-d_6 o $CDCl_3$ como solvente. Los datos de $_1$H RMN están describen como valores de desplazamiento químico, expresados en parte por millón (ppm), usando el pico residual del solvente (2,50 ppm para DMSO-d_6 y 7,26 ppm para $CDCl_3$) como estándar interno. Los patrones de separación se designan como: s (singulete), d (doblete), t (triplete), q (cuarteto), quint (quinteto), m (multiplete), br s (singulete amplio), br t (triplete amplio) dd (doblete de dobletes), td (triplete de dobletes), dt (doblete de tripletes), ddd (doblete de doblete de dobletes). Las mediciones IR se condujeron con un equipo Bruker Tensor 27 equipado con el dispositivo ATR Golden Gate (SPECAC). Las mediciones de HRMS se realizaron con un espectrómetro de masa LTQ OrbiTrap Velos Pro (ThermoFisher Scientific). Las muestras se disolvieron en CH_3CN/H_2O (2/1: v/v) en un rango de concentración entre 0,01 y 0,05 mg/ml aproximadamente y se introdujeron en la fuente mediante una inyección de 2 µl en un flujo de 0,1 ml/min. Los parámetros de ionización ESI fueron: 3,5 kV y 350 °C de transferencia capilar de iones. Todos los espectros se adquirieron en modo de ion positivo con una potencia de resolución de 30.000 ó 60.000 usando masa de bloqueo.

[380] Las mediciones de **HRMS** se realizaron en un espectrómetro de masas LTQ OrbiTrap Velos Pro (ThermoFisher Scientific GmbH, Bremen, Alemania). Las muestras se disolvieron en CH_3CN/H_2O (2/1: v / v) en un rango de concentración de entre 0,01 y 0,05 mg/ml aproximadamente y se introdujeron en la fuente mediante una inyección de 2 µL en un flujo de 0,1 ml/min. Los parámetros de ionización de ESI fueron los siguientes: 3,5 kV y 350 ° C

de transferencia de iones capilares. Todos los espectros se adquirieron en modo de iones positivos con un poder de resolución de 30 000 o 60 000 utilizando una masa de bloqueo.

UPLC®-MS:

[381] Los datos de UPLC®-MS se adquirieron usando un instrumento con los siguientes parámetros (Tabla 4):

Tabla 4: Parámetros de UPLC®-MS

Instrumento(s)	Dispositivo de masa Waters Aquity clase A, con detector UV por arreglo de diodos “PDA” y “detector ZQ 2” y el software MassLinks.
Detector ZQ 2	Barrido MS entre 0,15 y 6 min y entre 100 y 2372 Da
PDA detector	entre 190 y 400 nm
Columnas	Aquity UPLC ®BEH, columna C18, 1,7 µm, 130 Å, 2,1 x 50 mm Columna usada a 40 °C con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min
Solvente A	agua + 0,02% de TFA
Solvente B	acetonitrilo + 0,02%
Gradiente de TFA	de 2% de B a 100% de B en 5 min, luego 0,3 min de lavado con 100% de B y 0,5 min de equilibrio a 2% de B para la inyección siguiente (gradiente total de 6 min).

HPLC preparativa:

[382] Los datos de HPLC preparativa (“Prep-HPLC”) se adquirieron usando un instrumento con los siguientes parámetros (Tabla 5):

Tabla 5: Parámetros de la Prep-HPLC

Instrumento(s)	Columnas Waters X-Bridge 5 o 10 µm con tamaños (caudal) de: 19x50 mm (12 ml/min), 19x100 mm (12 ml/min), 30x100 mm (30-50 ml/min), 30x250 mm (30- 50 ml/min), 50x250 mm (80-150 ml / min); Interchim Puriflash 4100 con un máximo de 100 bars y una velocidad de flujo máxima de 250 ml/min, o Interchim Puriflash 4250 con un máximo de 250 bars y una velocidad de flujo máxima de 250 ml/min; Bomba de solvente cuaternario con la posibilidad de usar 4 solventes al mismo tiempo en un gradiente
UV	2 longitudes de onda para la recolección entre 200 y 400 nm
Columnas	Waters Xbridge 10 µm
Collection	Tubos de 8 ml o 32 ml

[383] Se usaron tres métodos de Prep-HPLC:

a. Método TFA: solvente: A agua + 0,05% de TFA, B acetonitrilo + 0,05% de TFA, gradiente de 5 a 100% de B en 15 a 30 CV

b. Método de NH_4HCO_3: solvente: A agua + NH_4HCO_3 0,02 M, B acetonitrilo/agua 80/20

+ NH_4HCO_3 0,02 M, gradiente de 5 a 100% de B en 15 a 30 CV

c. Método neutro: solvente: A agua, B acetonitrilo, gradiente de 5 a 100% de B en 15 a 30 CV

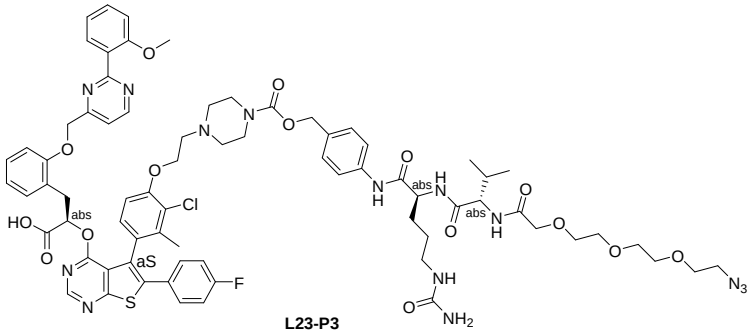
[384] Se combinaron todas las fracciones que contienen al compuesto puro y se secaron por congelamiento directamente para obtener el compuesto como un polvo amorfo.

Purificación por SFC preparativa:

[385] Se condujo una SFC quiral preparativa con un sistema Prep200 y una solución PIC. La muestra se disolvió en etanol a una concentración de 150 mg/ml. La fase móvil se mantuvo isocráticamente a 40% de etanol/CO_2. El instrumento se equipó con una columna Quiralpak IA y un bucle de 3 ml. El ABPR (regulador automático de la contrapresión) se definió en 100 bars.

Preparación de L23-P3:

Ácido (2R)-2-[(5*Sa*)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-(2-azidoetoxi)acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



Paso 1: (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida

[386] A una solución de ácido 2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acético (obtenido de Broadpharm, 1,4 g, 6 mmol) en THF (20 ml) se agregó 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (690 mg, 6 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (1,2 g, 6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado se separó por filtración y el filtrado se concentró para obtener (2,5-dioxopirrolidin-1-il)2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato (1,9 g, 6 mmol), que se usó inmediatamente sin purificación adicional.

[387] A una solución de (2,5-dioxopirrolidin-1-il)2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato (1,6 g; 4,85 mmol) en DMF (15 ml) se agregó (2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida (1,96 g; 5,17 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se concentró. El residuo se diluyó en agua (20 ml) y acetonitrilo (5 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se purificó

mediante cromatografía C18 de fase reversa usando el método neutro para obtener (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida (1,07 g, 1,8 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,95 (s, 1H), 8,3 (d, 1H), 7,55 (d, 2H), 7,46 (d, 1H), 7,22 (d, 2H), 5,98 (t, 1H), 5,4 (s, 1H), 5,08 (t, 1H), 4,43 (d, 2H), 4,4 (q, 1H), 4,33 (dd, 1H), 3,95 (s, 2H), 3,6 (m, 10H), 3,38 (t, 2H), 3 (m, 2H), 2 (m, 1H), 1,7/1,6 (2m, 2H), 1,5-1,3 (m, 2H), 0,89/0,82 (2d, 6H).

Paso 2: (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metilo

[388] A una solución de (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida (100 mg, 0,168 mmol) en DMF (30 ml) se agregó DIPEA (32 µl, 0,179 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (100 mg, 0,329 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano) para obtener (4-nitrofenil)carbonato de 4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metilo (65 mg, 0,088 mmol), $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,95 (s, 1H), 8,3 (d, 1H), 7,55 (d, 2H), 7,46 (d, 1H), 7,22 (d, 2H), 5,98 (t, 1H), 5,4 (s, 1H), 5,08 (t, 1H), 4,43 (d, 2H), 4,4 (q, 1H), 4,33 (dd, 1H), 3,95 (s, 2H), 3,6 (m, 10H), 3,38 (t, 2H), 3 (m, 2H), 3,02-2,95 (m, 2H), 2 (m, 1H), 1,7 (m, 1H), 1,6 (m, 1H), 0,89 (d, 3H), 0,82 (d, 3H).

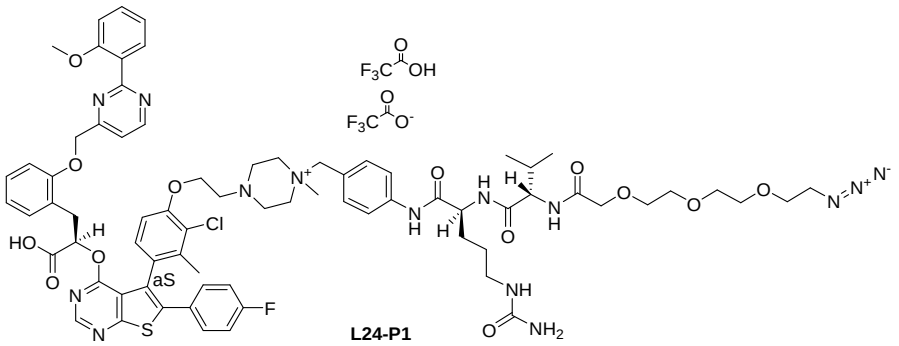
*Paso 3: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **L23-P3***

[389] A una solución de ácido ((2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **P3** (147 mg, 0,17 mmol) en DMF (16 ml) se agregó sin inconvenientes DIPEA (85 µl, 0,51 mmol), (4-nitrofenil)carbonato de 4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metilo (136 mg, 0,179 mmol), 2,6-lutidina (99 µl, 0,85 mmol) y HOAt (7 mg, 0,05 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el método con NH_4HCO_3 para obtener **L23-P3** (110 mg, 0,074 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,05 (s, 1H), 8,87 (d, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,32 (d, 1H), 7,67 (br s, 1H), 7,59 (d, 2H), 7,52 (dd, 1H), 7,45 (td, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,36 (dl, 1H), 7,29 (m, 2H), 7,27 (d, 2H), 7,2 (t, 2H), 7,19 (d, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,13 (t, 1H), 7,03 (t, 1H), 6,99

(d, 1H), 6,71 (t, 1H), 6,24 (dl, 1H), 5,99 (t, 1H), 5,48 (dd, 1H), 5,41 (br s, 1H), 5,23 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,39 (m, 1H), 4,32 (dd, 1H), 4,21 (m, 2H), 3,95 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,65-3,50 (m, 10H), 3,34 (m, 2H), 3,02/2,95 (m, 2H), 2,73 (t, 2H), 2,49/2,3 (m,2H), 2,45 (m, 4H), 2,3 (m, 4H), 2 (m, 1H), 1,82 (s, 3H), 1,7/1,59 (m, 2H), 1,44/1,37 (m, 2H), 0,87 (d, 3H), 0,82 (d, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 158,3, 152,9, 131,6, 131,6, 131,3, 131,3, 131, 129, 128,8, 121, 120,8, 119,5, 116,4, 116,1, 112,8, 112,4, 111,2, 74,5, 70,1, 69,3, 67,7, 66,4, 57, 56,7, 56,2, 53,7, 53,2, 50,4, 43,6, 39, 32,8, 31,6, 29,6, 27,3, 19,3, 17,7. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3500-2500, 2106, 1656. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1479,5422/1479,5405 (medida/teórica).

Preparación de L24-P1:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético



Paso 1: (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(bromometil)fenil]-5-ureido-pentanamida

[390] A una solución de (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida (330 mg, 0,55 mmol; obtenida de acuerdo con el Paso 1 de la síntesis de L23-P3) en THF (10 ml) se agregó por gotas a 0 °C una solución de tribromuro de fósforo 1 M en diclorometano (1 ml, 1 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y se agregó $NaHCO_3$ finamente molido (100 mg). Después de 10 min de agitación, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se filtró. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(bromometil)fenil]-5-ureido-pentanamida (283 mg, 0,43 mmol) se usó sin purificación adicional. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 595,3200/595,3198 (medida/teórica).

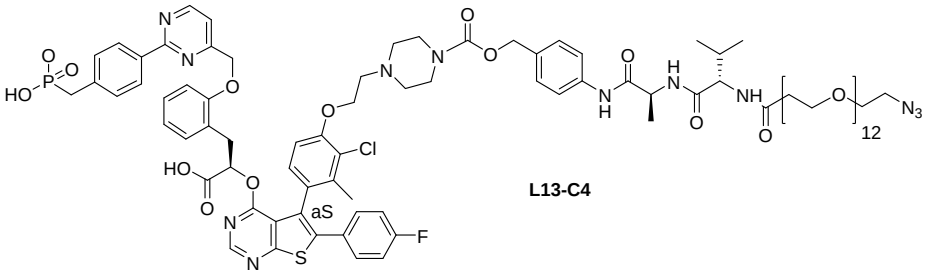
Paso 2: ácido ((2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-

fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético ***L24-P1***

[391] A una solución de diclorhidrato de (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (**P1**) (345 mg, 0,355 mmol) en DMF (1 ml) se agregó sin inconvenientes (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(bromometil)fenil]-5-ureido-pentanamida (233 mg, 0,355 mmol) y DIPEA (50 µl, 0,304 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó una solución de hidróxido de litio monohidratado (15 mg, 3,55 mmol) en agua (0,5 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener **L24-P1** (80 mg, 0,054 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 13,2 (m, 1H), 10,25 (m, 1H), 8,88 (d, 1H), 8,6 (s, 1H), 8,36 (d, 1H), 7,72 (d, 2H), 7,63 (d, 1H), 7,52 (dd, 1H), 7,46 (t, 1H), 7,44 (m, 1H), 7,43 (m, 2H), 7,37 (d, 1H), 7,3 (dd, 2H), 7,21 (t, 2H), 7,2 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,15 (t, 1H), 7,03 (t, 1H), 7 (t, 1H), 6,72 (t, 1H), 6,22 (d, 1H), 6 (t, 1H), 5,52 (m, 2H), 5,49 (dd, 1 H), 5,25 (dd, 2H), 4,5 (br s, 2H), 4,39 (m, 1H), 4,32 (m, 1H), 4,25 (m, 2H), 3,95 (br s, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,4/3,24 (m, 4H), 3,35 (m, 2H), 3,28/2,51 (m, 2H), 3,04/2,83 (m, 4H), 3,02/2,96 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,87 (s, 3H), 1,99 (m,1 H), 1,83 (s, 3H), 1,69/1,61 (m, 2H), 1,46/1,38 (m, 2H), 0,88/0,82 (m, 6H). ^{13}C RMN (125 MHz, dmso-d6): δ 134,2, 131,4, 131,3, 131,3, 131,2, 130,7, 128,7, 120,9, 120,5, 119,2, 116,3, 115,8, 112,7, 112,3, 111, 74, 70,2, 69,6, 67,8, 58,9, 56,9, 56,1, 55,4, 54, 50,5, 46,6, 44,9, 39, 32,7, 31,6, 29,8, 27,5, 19,7/18,4, 18. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3700-2200, 3000-2000, 2109, 1662, 1250-1050. HR-ESI+: m/z [M+Na]+ = 1473,5656/1473,5628 (medida/teórica).

Preparación de L13-C4:

Ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[4-(fosfonometil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



L13-C4

Paso 1: Síntesis de (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]-N-[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]-3-metil-butanamida

[392] A una solución de (2S)-2-amino-N-[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]-3-metil-butanamida (0,9 g, 3,07 mmol; obtenida de acuerdo con el Paso 3 de la síntesis de L18-C3) y ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] propanoico (obtenido de Broadpharm, 2 g, 3,07 mmol) en DMF (20 ml) se agregó sin inconvenientes DIPEA (1 ml, 6,13 mmol), cloruro de 3-(etiliminometilenamino)propil-dimetilamonio (EDC) (0,65 g, 3,37 mmol) y hexafluorofosfato de [dimetilamino(triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)metilen]-dimetilamonio (HATU) (1,28 g, 3,37 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el método de NH_4HCO_3 para obtener (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] etoxi]etoxi]propanoilamino]-N-[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]-3-metil-butanamida (1,64 g, 1,81 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,82 (m, 1H), 8,14 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,54 (d, 2H), 7,23 (d, 2H), 5,08 (t, 1H), 4,43 (d, 2H), 4,39 (m, 1H), 4,2 (m, 1H), 3,65-3,44 (m, 48H), 3,39 (t, 2H), 2,50-2,30 (m, 2H), 1,97 (m, 1H), 1,31 (d, 3H), 0,87/0,84 (m, 6 H). Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3600-3200, 3287, 2106, 1668, 1630, 1100. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 919,5265/919,5234 (medida/teórica).

Paso 2: (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] etoxi]etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metilo

[393] A una solución de (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]-N-[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]-3-metil-butanamida (210 mg, 0,228 mmol) en una mezcla de THF y diclorometano (respectivamente, 5 y 2,5 ml) se agregó sin inconvenientes piridina (30 µl, 0,479 mmol) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (97 mg, 0,479 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se agregaron otras porciones de cloroformiato de 4-nitrofenilo (40 mg, 0,197 mmol) y piridina (30 µl, 0,479 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 55 h y se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de MeOH en diclorometano) para obtener (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metilo (118 mg, 0,110 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,00 (s, 1H), 8,31 (d, 2H), 8,19 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,64 (d, 2H), 7,58 (d, 2H),

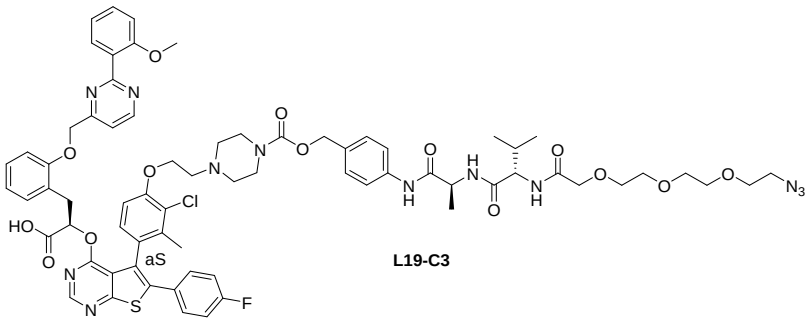
7,41 (d, 2H), 5,25 (s, 2H), 4,39 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 3,63-3,47 (m, 48H), 3,39 (t, 2H), 2,50-2,35 (m, 2H), 1,98 (m, 1H), 1,31 (d, 3H), 0,89/0,85 (m, 6H). Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3278, 2108, 1763, 1633, 1526, 1525, 1350, 1215, 1110.

*Paso 3: Ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[4-(fosfonometil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (**L13-C4**)*

[394] A una solución de (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metilo (52 mg, 47,6 µmol) en DMF (5 ml) se agregó sin inconvenientes ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[4-(fosfonometil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **C4** (36,7 mg, 39,7 µmol) y DIPEA (26 µl, 108 µmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el método de NH_4HCO_3 para obtener **L13-C4** (36 mg, 19 µmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,1 (br s, 1H), 8,81 (br s, 1 H), 8,55 (m, 1 H), 8,32 (br s, 1H), 8,19 (d, 2H), 8,02 (br s, 1H), 7,66 (m, 1H), 7,58 (d, 2H), 7,37 (d, 1H), 7,29 (dd, 2H), 7,28 (d, 2H), 7,25 (d, 2H), 7,19 (t, 2H), 7,17 (d, 1H), 7,08 (t, 1H), 6,96 (d, 1H), 6,68 (t, 1H), 6,21 (d, 1H), 5,5 (m, 1H), 5,22 (m, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,4 (m, 1H), 4,2 (dd, 1H), 4,18 (m, 2H), 3,62/3,41 (m, 24H), 3,5 (m, 4H), 3,38 (m, 2H), 3,28 (m, 4H), 2,87 (m, 2H), 2,7 (m, 2H), 2,48/2,36 (m, 2H), 2,41 (m, 4H), 1,99 (m, 1H), 1,79 (s, 3H), 1,3 (d, 3H), 0,87/0,83 (m, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 130,7, 130,7, 130,6, 130,3, 129, 128,4, 127,4, 121, 119,6, 116,3, 116,1, 112,1, 70,2/67,3, 69,5, 67,5, 66,4, 58,2, 56,4, 53,2, 50,3, 49,6, 43,8, 36,3, 31, 19, 18,5, 17,8. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ -112,4. ^{31}P RMN (200 MHz, dmso-d6): δ 17,8. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3290, 2102, 1698, 1651, 1237, 1094, 833, 756. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1867,7129/1867,7154 (medida/teórica).

Preparación de L19-C3:

Ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



Paso 1: (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metilo

[395] A una suspensión de N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (1 g, 1,66 mmol) en una mezcla de THF/diclorometano (respectivamente, 100 y 30 ml), se agregó sin inconvenientes piridina (269 µl, 3,32 mmol) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (670 mg, 3,30 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se agregó otra porción de cloroformiato de 4-nitrofenilo (335 mg, 1,66 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en heptano) para obtener (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metilo (658 mg, 0,97 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,07 (m, 1H), 8,31 (d, 2H), 8,19 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,74 (t, 2H), 7,64 (d, 2H), 7,57 (d, 2H), 7,41 (m, 2H), 7,41 (d, 2H), 7,4 (m, 1H), 7,32 (t, 2H), 5,24 (s, 2H), 4,43 (m, 1H), 4,36-4,19 (m, 3H), 3,92 (dd, 1H), 2 (m, 1H), 1,32 (d, 3H), 0,9/0,87 (m, 6 H). Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3350-3200, 1760, 1690, 1670, 1630, 1523, 1290.

Paso 2: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[396] A una solución de ácido (2R)-2-[**(5S$_a$)-**5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **C3** (100 mg, 0,116 mmol) en DMF (1 ml) se agregó sin inconvenientes (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metilo (87 mg, 0,128 mmol) y DIPEA (38 µl, 0,232 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se concentró. El residuo se tomó en agua, se filtró para dar ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-

3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (110 mg, 0,078 mmol) que se utilizó sin purificación adicional en el paso siguiente. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,05 (br s, 1 H), 8,88 (d, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,23 (d, 1H), 7,88 (d, 2H), 7,75 (m, 1H), 7,74 (2d, 2H), 7,58 (d, 2H), 7,53 (dd, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,41 (m, 1H), 7,4 (m, 2H), 7,31 (m, 2H), 7,29 (m, 2H), 7,26 (d, 2H), 7,2 (t, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,11 (t, 1H), 7,03 (t, 1H), 6,98 (d, 1H), 6,69 (t, 1H), 6,2 (d, 1H), 5,46 (d, 1H), 5,22 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,42 (t, 1H), 4,26 (m, 2H), 4,21 (m, 1H), 4,2 (m, 2H), 3,91 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,35/2,45 (m, 2H), 3,29 (m, 4H), 2,73 (t, 2H), 2,44 (m, 4H), 1,99 (m, 1H), 1,8 (s, 3H), 1,29 (d, 3H), 0,88/0,85 (m, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 158,3, 152,7, 131,6, 131,4, 131,3, 131,1, 131,1, 128,9, 128,5, 128, 127,6, 125,8, 120,9, 120,5, 120,5, 119,4, 116,4, 116, 112,7, 112,2, 111,1, 69,4, 67,8, 66,5, 66,1, 60,7, 56,8, 56,1, 53,2, 49,6, 47,1, 43,8, 33,3, 30,9, 19,7, 18,9, 18,1.

Paso 3: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

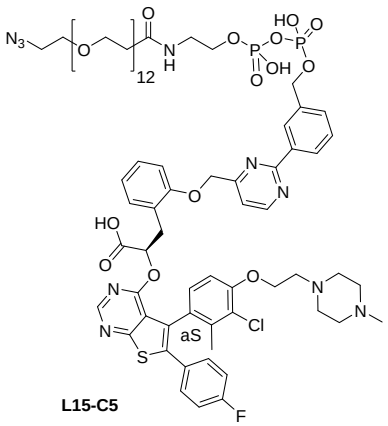
[397] A una solución de ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (176 mg, 0,125 mmol) en DMF (3 ml) se agregó piperidina (300 µl, 1,25 mmol) por gotas a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se concentró. El residuo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el método de NH_4HCO_3 para obtener ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (130 mg, 0,11 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,2 (s, 1H), 8,9 (d, 1H), 8,6 (dl, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,6 (d, 2H), 7,55 (dd, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,25 (d, 2H), 7,25 (m, 4H), 7,2 (m, 3H), 7,15 (d, 1H), 7,1 (t, 1H), 7,05 (t, 1H), 6,95 (d, 1H), 6,65 (t, 1H), 6,15 (d, 1H), 5,4 (dd, 1H), 5,2 (m, 2H), 4,95 (s, 2H), 4,45 (m, 1H), 4,2 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,4/2,35 (m, 2H), 3,3 (m, 5H), 2,6 (t, 2H), 2,4 (m, 4H), 2 (m, 3H), 1,8 (s, 3H), 1,3 (d, 3H), 0,9/0,85 (m, 6H). Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3600-2500, 1678.

Paso 4: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico ***L19-C3***

[398] A una solución de ácido 2R)-2-[($5S_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (50 mg, 0,042 mmol) en DMF (0,3 ml) se agregó sin inconvenientes DIPEA (14 µl, 0,085 mmol), tetrafluoroborato de [dimetilamino-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-metilen]-dimetilamonio (14 mg, 0,046 mmol) y una solución de ácido 2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acético (28 mg, 0,12 mmol) en DMF (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el método NH_4HCO_3 para obtener **L19-C3** (22 mg, 0,016 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,02 (s, 1H), 8,88 (d, 1H), 8,4 (d, 1H), 7,72 (br s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,58 (d, 2H), 7,53 (d, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,38 (d, 1H), 7,29 (dd, 2H), 7,27 (d, 2H), 7,2 (t, 2H), 7,18 (d, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,11 (t, 1H), 7,03 (t, 1H), 6,98 (d, 1H), 6,7 (t, 1H), 6,21 (d, 1H), 5,46 (dd, 1H), 5,23 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,4 (m, 1H), 4,29 (dd, 1H), 4,22 (m, 2H), 3,94 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,65-3,53 (m, 10H), 3,35 (m, 2H), 3,3 (m, 4H), 3,3/2,5 (m, 2H), 2,73 (t, 2H), 2,44 (m, 4H), 2 (m, 1H), 1,81 (s, 3H), 1,3 (d, 3H), 0,88/0,82 (m, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 158, 152,7, 131,4, 131,4, 131,3, 131,1, 131,1, 128,9, 128,6, 120,9, 120,7, 119,5, 116,2, 112,5, 112,1, 111,1, 70,4, 70,4, 69,7, 67,5, 66,2, 56,8, 56,7, 56,1, 53,3, 50,4, 49,5, 43,8, 31,7, 19,5, 0,82, 18,3, 18,2. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ -112,3. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3294, 2104, 1697, 1663, 1288, 1238, 1120, 1076, 1051, 1020, 833,755. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1395,5083/1395,5070 (medida/teórica).

Preparación de L15-C5:

Ácido (2R)-3-[2-[[2-[3-[[[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]etoxi-hidroxi-fosforil]oxi-hidroxi-fosforil]oximetil]fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-propanoico



L15-C5

Paso 1: Ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-

fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[3-(fosfonooximetil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; bis ácido 2,2,2-trifluoroacético

[399] A una solución de (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[3-(hidroximetil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (110 mg, 0,123 mmol; preparado de acuerdo con WO 2016/207216) en THF (0,5 ml) se agregó cloruro de difosforilo por gotas a -40 °C bajo argón (51 µl, 0,368 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -40 °C durante 30 min. Se agregó otra porción de cloruro de difosforilo (10 µl, 0,074 mmol) a -40 °C y la reacción se agitó a -40 °C durante 20 min, se detuvo mediante adición de una solución acuosa saturada de carbonato de potasio (0,1 ml) y se dejó calentar a temperatura ambiente. El pH se ajustó en 10 mediante adición de carbonato de potasio (polvo) y la reacción se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó en pH 2 mediante adición lenta de una solución acuosa 2 M de HCl a 0 °C, se extrajo con diclorometano (4 veces). Las capas orgánicas combinadas se concentraron, se diluyeron con dioxano (3 ml) y se agregó una solución de hidróxido de litio monohidratado (17 mg, 0,403 mmol) en agua (0,3 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 días, se neutralizó mediante una solución acuosa 4 M de HCl (0,4 ml, 0,4 mmol) y se evaporó. El residuo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[3-(fosfonooximetil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; ácido 2,2,2-trifluoroacético como la sal 2TFA (41 mg, 43 µmol). MS (ESI) m/z [M + 2H]/2+ = 487,5.

Paso 2: Fosfato diácido de 2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]etilo

[400] A una solución de ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (200 mg, 0,311 mmol) en diclorometano (2 ml) se agregaron 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (79 mg, 0,684 mmol), cloruro de 3-(etiliminometilenamino)propil-dimetilamonio (107 mg, 0,56 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se diluyó con diclorometano, se particionó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró hasta aproximadamente 1 ml. El residuo se diluyó con DMF (1 ml), se agregó fosfato diácido de 2-aminoetilo (30 mg, 0,214 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante la noche, se diluyó con diclorometano, se lavó con agua. La capa acuosa se separó y se secó por congelamiento para obtener fosfato diácido de 2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-

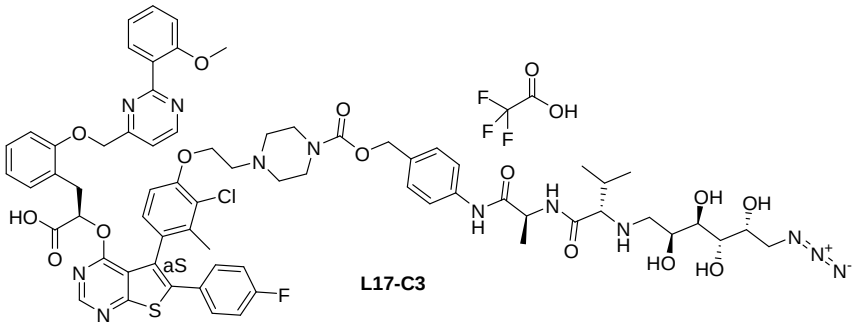
azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]etilo (165 mg, 0,2 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 3,45-3,65 (m, 53H), 3,26-3,39 (m, 2H), 3,12 (m, 2H), 2,27 (t, 2H). HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 767,3697/767,3686 (medida/teórica).

*Paso 3: Ácido (2R)-3-[2-[[2-[3-[[[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]etoxi-hidroxi-fosforil]oxi-hidroxi-fosforil]oximetil]fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-propanoico (**L15-C5**)*

[401] A una solución de fosfato diácido de 2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]etilo (49 mg, 0,064 mmol) en DMF (0,2 ml) se agregó sin inconvenientes di(imidazol-1-il)metanona (11 mg, 0,066 mmol), trietilamina (17µl, 0,066 mmol) y tamices moleculares de 4Å (50 mg). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El sólido se eliminó mediante filtración y el filtrado se trató con cloruro de zinc (23 mg, 0,172 mmol) y ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[3-(fosfonooximetil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; bis ácido 2,2,2-trifluoroacético (41 mg, 0,043 mmol). La mezcla se calentó a 50 °C durante la noche. La mezcla de reacción se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener **L15-C5** (11 mg, 6 µmol). HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1703,5962/1703,5959 (medida/teórica).

Preparación de L17-C3:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S,3R,4S,5R)-6-azido-2,3,4,5-tetrahidroxi-hexil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; ácido 2,2,2-trifluoroacético



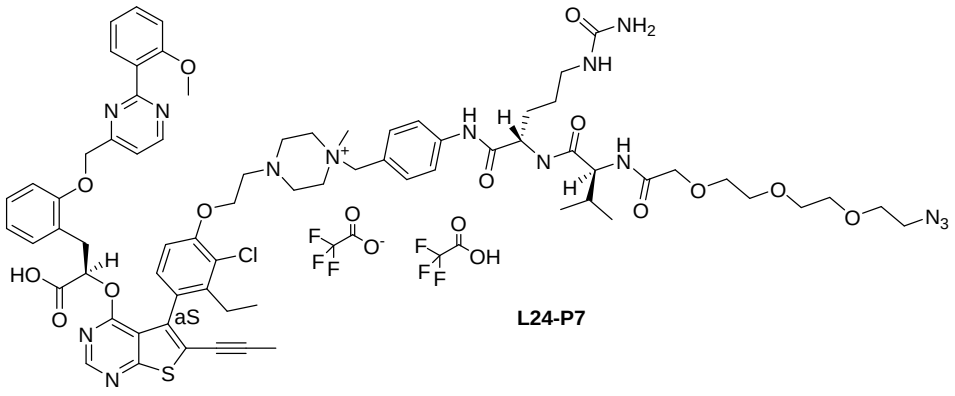
L17-C3

[402] A una solución de ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-

il]metoxi]fenil]propanoico (230 mg, 0,194 mmol; obtenida de acuerdo con el Paso 5 de la preparación de L19-C3) y 6-desoxi-6-azido-D-galactosa (120 mg, 0,584 mmol; obtenida de acuerdo con Ekholm et al., *Chem. Med. Chem* 2016, 11, 2501-2505) en una mezcla de DMSO/agua 80/20 que contiene 1% de DIPEA (20 ml) se agregó cianoborohidruro de sodio (24 mg, 0,389 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 65 °C durante 48 h. Luego se agregaron otra porción de cianoborohidruro de sodio (24 mg, 0,389 mmol) y 6-desoxi-6-azido-D-galactosa (120 mg, 0,584 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 65 °C por 48 h adicionales y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener **L17-C3** (38 mg, 28 µmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 13,2 (br s, 1H), 10,2 (s, 1H), 8,88 (d, 1H), 8,85 (d, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,53 (br s, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,59 (d, 2H), 7,52 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,42 (d, 1H), 7,33 (dd, 2H), 7,33 (d, 2H), 7,27 (d, 1H), 7,27 (d, 1H), 7,21 (t, 2H), 7,15 (t, 1H), 7,04 (t, 1H), 7,01 (d, 1H), 6,73 (t, 1H), 6,21 (d, 1H), 5,51 (d, 1H), 5,28/5,22 (m, 2H), 5,04 (br s, 2H), 4,52 (m, 1H), 4,49 (m, 2H), 4,12 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,78 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,63 (m, 6H), 3,42/3,21 (m, 2H), 3,38 (m, 1H), 3,37 (m, 1H), 3,28/2,52 (m, 2H), 3,22 (m, 4H), 2,96 (m, 2H), 2,21 (m, 1H), 1,86 (s, 3H), 1,36 (d, 3H), 1,03/0,94 (m, 6H). ^{13}C RMN (125 MHz, dmso-d6): δ 157,8, 152,5, 131,4, 131,3, 131,3, 130,6, 129,1, 129, 128,8, 120,8, 120,6, 119,4, 116,2, 116,1, 112,3, 111,3, 111,3, 74,2, 71,3, 70,4, 69,5, 69,2, 67,1, 65,6, 64,5, 64,5, 56,2, 54,8, 54,2, 51,9, 50,3, 49,9, 32,7, 29,4, 19,3, 18,9, 18. ^{19}F RMN (470 MHz, dmso-d6): δ -74,4, -112,1. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 2200-3500, 2104, 1669, 1181, 1132, 798, 758, 720. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1369,4918/1369,4913 (medida/teórica).

Preparación de L24-P7:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-etil-fenil]-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético

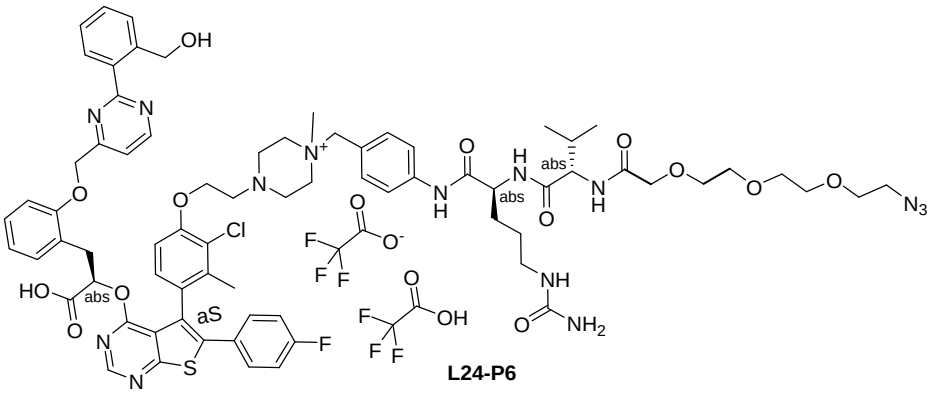


L24-P7

[403] A una solución de (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-(2-azidoetoxi)acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(bromometil)fenil]-5-ureido-pentanamida (72 mg, 0,109 mmol) en THF (5 ml) se agregó sin inconvenientes ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-etil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **P7** (30 mg, 0,036 mmol) y DIPEA (19 µl, 0,108 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener **L24-P7** (25 mg, 18 µmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,25 (s, 1H), 8,85 (d, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,35 (d, 1H), 7,72 (d, 2H), 7,6 (d, 1H), 7,5 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,43 (d, 2H), 7,4 (d, 1H), 7,22 (d, 1H), 7,17 (m, 1H), 7,15 (m, 1H), 7,13 (d, 1H), 7,02 (t, 1H), 7 (d, 1H), 6,78 (t, 1H), 6,3 (d, 1H), 5,98 (br s, 1H), 5,5 (dd, 1H), 5,4 (br s, 1H), 5,28/5,2 (m, 2H), 4,5 (br s, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,3 (dd, 1H), 4,25 (m, 2H), 3,94 (br s, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,70/3,50 (m, 10H), 3,50 (m, 8 H), 3,35 (t, 2H), 3,22/2,5 (m, 2 H), 3,0 (m, 2H), 2,95 (t, 2H), 2,9 (br s, 3H), 2,55/2,4 (m, 2H), 2,0 (s, 3H), 1,98 (m, 1H), 1,70/1,30 (m, 4H), 0,88/0,82 (m, 6H), 0,72 (t, 3H). Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3321, 2111, 1660, 1188, 1124, 798,756,719. HR-ESI+: m/z [M+H-CF3COOH]+ = 1409,59077/1409,5903 (medida/teórica).

Preparación de L24-P6:

Ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[2-(hidroximetil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético



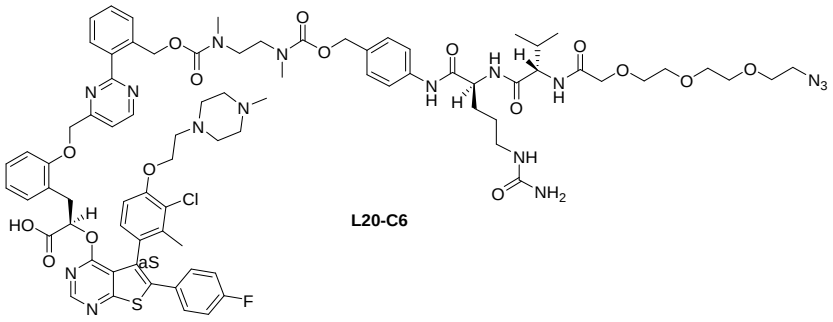
L24-P6

[404] A una solución de (2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(bromometil)fenil]-5-ureido-pentanamida (55,3 mg, 84 µmol) en DMF (1 ml) se agregó sin inconvenientes (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[2-(hidroximetil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (53,2 mg, 59 µmol; sintetizado de acuerdo con EP 2 886 545) y DIPEA (44 µl, 0,252 mmol). La mezcla de reacción se agitó

a temperatura ambiente durante 1 h y se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con dioxano (1 ml) y se agregó una solución de hidróxido de litio monohidratado (14 mg, 0,0334 mmol) en agua (0,3 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se neutralizó mediante adición de una solución acuosa 1 M de HCl (0,33 ml, 0,33 mmol), se concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener L24-P6 (47 mg, 32 µmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,27 (s, 1H), 8,94 (d, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,38 (d, 1H), 7,93 (d, 1H), 7,73 (d, 2H), 7,68 (t, 1H), 7,66 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,43 (d, 2H), 7,38 (d, 1H), 7,37 (m, 1H), 7,3 (dd, 2H), 7,21 (d, 1H), 7,2 (t, 2H), 7,16 (t, 1H), 7,02 (d, 1H), 6,72 (t, 1H), 6,21 (d, 1H), 6,01 (m, 1H), 5,5 (d, 1H), 5,4 (m, 1H), 5,3 (m, 2H), 4,8 (s, 2H), 4,39 (m, 1H), 4,32 (dd, 1H), 4,25 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,57 (m, 16H), 3,42/3,26 (m, 2 H), 3,36 (m, 2H), 3,29/2,51 (m, 2H), 3,11/2,92 (m, 8H), 2,98 (m, 2H), 2,97 (m, 2H), 1,99 (m, 1H), 1,83 (s, 3H), 1,68/1,62 (m, 2H), 1,45/1,39 (m, 2H), 0,88/0,82 (m, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 158,2, 152,1, 134,2, 131,4, 131,3, 130,9, 130,8, 130,2, 128,7, 128,1, 127, 120,8, 119,3, 116,3, 115,7, 112,2, 111, 74, 70,5, 70,1, 69,5, 67,7, 62,3, 58,8, 57,2, 55,5, 54,1, 50,5, 46,6, 38,9, 32,5, 31,5, 29,6, 27,6, 19,6, 18,6, 18,3. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ -74,6, -112,5. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3303, 2104, 1730, 1662, 1182, 1124, 833,796,761. HR-ESI+: m/z [M+2H]/2+ = 726,2957/726,2941 (medida/teórica).

Preparación de L20-C6:

Ácido (2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metoxicarbonil-metil-amino]etil-metil-carbamoil]oximetil]fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-propanoico



Paso 1: (2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-[ter-butoxicarbonil(metil)amino]etil-metil-carbamoil]oximetil]fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-propanoato de etilo

[405] A una solución de (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[2-

(hidroximetil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (50 mg, 55 µmol; sintetizado de acuerdo con EP 2 886 545) en diclorometano (0,5 ml) se agregó sin inconvenientes cloroformiato de 4-nitrofenilo (19 mg, 94 µmol) y DIPEA (69 µl, 0,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se agregó N-metil-N-[2-(metilamino)etil]carbamato de ter-butilo (54 mg, 0,287 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano) para obtener (2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-[ter-butoxicarbonil(metil)amino]etil-metil-carbamoil]oximetil]fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-propanoato de etilo (30 mg, 27 µmol). $_1$H RMN (500 MHz, dmso-d6): δ 9,00 (d, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,98 (m, 1H), 7,61 (d, 1H), 7,51 (t, 1H), 7,48 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,31 (dd, 2H), 7,31 (d, 1H), 7,22 (t, 2H), 7,18 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 7,02 (d, 1H), 6,76 (t, 1H), 6,32 (d, 1H), 5,52 (dd, 1H), 5,47 (br s, 2H), 5,26 (m, 2H), 4,2 (m, 2H), 4,07 (m, 2H), 3,24/3,17 (2m, 4H), 3,17/2,6 (2m, 2H), 2,77/2,64 (m, 6H), 2,7 (m, 2H), 2,49/2,28 (m, 8H), 2,12 (br s, 3H), 1,87 (s, 3H), 1,3 (3s, 9H), 1,07 (t, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, dmso-d6): δ 158,2, 152,4, 131, 130,1, 130,1, 129, 128,3, 128,2, 121,5, 121,4, 120,9, 116,3, 115,8, 112, 111,1, 74,1, 69,2, 68,1, 65,6, 61,2, 56,8, 55,2, 53,1, 46,5, 45,9, 34,5, 32,4, 28,3, 17,4, 14,9,^{19}F RMN (470 MHz, dmso-d6): δ -112,2. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 1750, 1693, 1221/1160/1120, 834/756.

Paso 2: Ácido 2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metoxicarbonil-metil-amino]etil-metil-carbamoil]oximetil]fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-propanoico ***L20-C6***

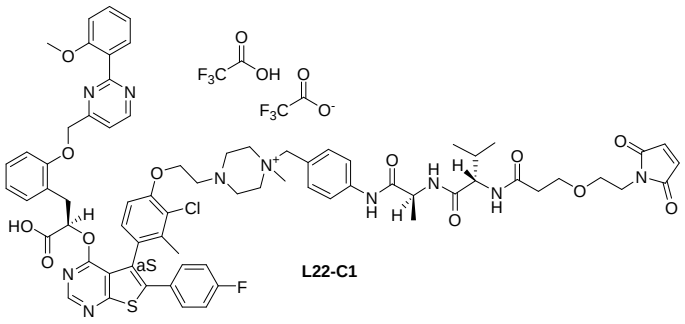
[406] A una solución de (2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-[ter-butoxicarbonil(metil)amino]etil-metil-carbamoil]oximetil]fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-propanoato de etilo (25 mg, 22 µmol) en diclorometano (0,5 ml) se agregó ácido trifluoroacético (35 µl, 447 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h y se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con DMF (0,5 ml) y se agregó sin inconvenientes [(4-nitrofenil)carbonato de 4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metilo (20 mg, 22 µmol; obtenido de acuerdo con el Paso 3 de la preparación de L23-P3) y DIPEA (78 µl, 0,447 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se concentró bajo presión reducida, se diluyó con dioxano (0,5 ml) y se agregó una solución de hidróxido de litio monohidratado (3,7 mg, 89 µmol) en agua (0,3 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se neutralizó a 0 °C mediante adición por gotas de una solución

acuosa 1 M de HCl hasta pH 7 y se concentró bajo presión reducida.

[407] El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener L20-C6 (13 mg, 8 µmol). $_1$H RMN (500 MHz, dmso-d6): δ 8,88 (m, 1H), 8,54 (s, 1 H), 7,97 (d, 1H), 7,77 (m, 1H), 7,6 (d, 2H), 7,5 (m, 1H), 7,47 (m, 1H), 7,46 (m, 1H), 7,41 (d, 1H), 7,29 (dd, 2H), 7,21 (t, 2H), 7,19 (d, 1H), 7,18 (m, 2H), 7,12 (t, 1H), 6,97 (d, 1H), 6,7 (t, 1H), 6,19 (d, 1H), 5,49 (d, 1H), 5,45 (m, 4H), 5,23 (m, 2H), 4,89 (m, 2H), 4,4 (m, 1H), 4,32 (dd, 1H), 4,22 (m, 2H), 3,94 (s, 2H), 3,56 (m, 10H), 3,39/2,44 (m, 2H), 3,34 (t, 2H), 3,28 (m, 4H), 2,99 (m, 2H), 2,75/2,7 (m, 6H), 2,73 (m, 2H), 2,5/2,37 (m, 8H), 2,18 (s, 3H), 2,04 (m, 1H), 1,81 (s, 3H), 1,74/1,62 (m, 2H), 1,46/1,38 (m, 2H), 0,86/0,8 (m, 6H). ^{13}C RMN (125 MHz, dmso-d6): δ 158,3, 152,9, 131,5, 131,4, 131,3, 131, 130, 128,3, 128,3, 128, 127,7, 120,8, 119,3, 116,2, 115,6, 112,1, 111,1, 75,3, 70,5, 70,2, 69,2, 67,6, 66,6, 65,4, 57,2, 56,7, 55,1/52,9, 54, 50,5, 46,5, 45,1, 39,1, 34,4, 31,5, 29,6, 27,4, 19,9, 18,2, 18. ^{19}F RMN (470 MHz, dmso-d6): δ -112,5. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3323, 2106, 1691, 1660, 1220, 1120, 1051, 759. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1609,6517/1609,6500 (medida/teórica).

Preparación de L22-C1:

Ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético



Paso 1: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; bis-ácido 2,2,2-trifluoroacético

[408] A una solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (200 mg, 0,388 mmol) en DMF (20 ml) se agregó sin inconvenientes trifenilfosfina (152 mg, 0,581 mmol) y N-bromosuccinimida (103 mg, 0,581 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se agregaron ácido (2R)-2-[**(5S$_a$)-**5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-

metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **C1** (302 mg, 345 mmol) y DIPEA (120 µl, 0,691 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se agregó dietilamina (49 µl, 486 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; bis-ácido 2,2,2-trifluoroacético (253 mg, 0,220 mmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,4 (s, 1H), 8,89 (d, 1H), 8,75 (d, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,08 (amplio, 3H), 7,72 (d, 2H), 7,63 (d, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,46 (t, 1H), 7,45 (d, 2H), 7,39 (d, 1H), 7,31 (dd, 2H), 7,21 (d, 1H), 7,21 (t, 2H), 7,15 (d, 1H), 7,15 (t, 1H), 7,04 (t, 1H), 7,01 (d, 1H), 6,72 (t, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,5 (dd, 1H), 5,25 (m, 2H), 4,53 (m, 2H), 4,52 (m, 1H), 4,28 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,62 (m, 1H), 3,43/3,29 (m, 4H), 3,28/2,5 (m, 2H), 3,13/2,94 (m, 4H), 3,01 (m, 2H), 2,9 (br s, 3H), 2,07 (m, 1H), 1,84 (d, 3H), 1,36 (d, 3H), 0,95 (d, 6H). ^{13}C RMN (125 MHz, dmso-d6): δ 253, 158,2, 134,3, 131,5, 131,4, 131,4, 131,3, 131, 128,9, 121,1, 120,6, 119,5, 116,3, 115,9, 113, 112,3, 111,1, 74,1, 69,8, 67,5, 58,7, 57,9, 56,5, 55,4, 49,8, 46,5, 45,2, 32,9, 30,4, 18,6, 18,4, 18,3. ^{19}F RMN (470 MHz, dmso-d6): δ -74, -112,6.

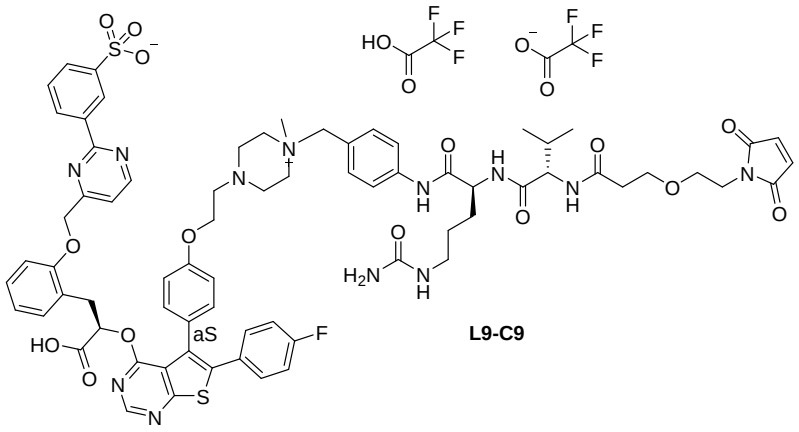
Paso 2: Ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; bis-ácido 2,2,2-trifluoroacético ***L22-C1***

[409] A una solución de ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; bis-ácido 2,2,2-trifluoroacético (150 mg, 0,130 mmol) en DMF (0,4 ml) se agregó 3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (60 mg, 194 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener L22-C1 (67 mg, 37 µmol). $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,14 (s, 1H), 8,88 (d, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,22 (d, 1H), 7,84 (d, 1H), 7,73 (d, 2H), 7,63 (d, 1H), 7,52 (dd, 1H), 7,45 (td, 1H), 7,44 (d, 2H), 7,38 (d, 1H), 7,31 (dd, 2H), 7,21 (d, 1H), 7,21 (t, 2H), 7,15 (t, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,02 (t, 1H), 7,01 (d, 1H), 7 (s, 2H), 6,71 (t, 1H), 6,21 (d, 1H), 5,5 (dd, 1H), 5,25 (m, 2H), 4,53 (br s, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,25 (m, 2H), 4,19 (dd,

1H), 3,76 (s, 3H), 3,58 (m, 2H), 3,54 (t, 2H), 3,48 (m, 2H), 3,43/3,3 (m, 4H), 3,28/2,51 (m, 2H), 3,16/2,98 (m, 4H), 3,04 (m, 2H), 2,91 (br s, 3H), 2,43/2,33 (m, 2H), 1,93 (m, 1H), 1,84 (s, 3H), 1,31 (d, 3H), 0,87/0,82 (m, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 158, 152,8, 135,2, 134, 131,4, 131,3, 131,3, 131,2, 131, 128,9, 120,8, 120,6, 119,3, 116,3, 115,8, 112,4, 112,3, 111,1, 74,2, 69,6, 67,4, 67,4, 67,1, 67, 58,4, 57,9, 56,2, 55,2, 49,7, 46,5, 45,1, 37,1, 36,3, 32,7, 30,9, 19,6, 18,5, 18,2, 18,2. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ -74,6, -112,2. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 2000-3500, 1760/1705, 1733, 1668, 1180/1128, 829/798/758/720/696. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1345,4944/1345,4954 (medida/teórica)

Preparación de L9-C9:

3-[4-[[2-[(2R)-2-carboxi-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-etil]fenoxi]metil]pirimidin-2-il]bencensulfonato; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético



Paso 1: (2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida

[410] A una solución de ácido 3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoico (855 mg, 4,01 mmol) en THF (42 ml) se agregaron N,N'-diciclohexilmetandiimina (1,05 g, 5,08 mmol) y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (510 mg, 4,43 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. El precipitado se eliminó mediante filtración y el filtrado se agregó a una solución de (2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida (1,27 g, 3,35 mmol) en DMF (42 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h, se diluyó con éter dietílico (250 ml). El sólido se recuperó mediante filtración para obtener (2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida (1,81 g; 3,15 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,87 (s, 1H), 8,05 (d, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,53 (d, 2H), 7,21 (d, 2H), 7,00 (s, 2H), 5,95 (t, 1H), 5,39 (s, 2H), 5,07 (t, 1H), 4,41 (d, 2H), 4,34-4,40 (m, 1H), 4,18-4,22 (m, 1H), 3,42-3,65 (m,

4H), 2,88-3,02 (m, 2H), 2,73 (s, 2H), 2,28-2,45 (m, 2H), 1,91-1,99 (m, 1H), 1,53-1,75 (m, 2H), 1,30-1,147 (m, 2H), 0,85 (d, 3H), 0,81 (d, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, dmso-d6): δ 171,05, 170,83, 170,32, 170,09, 158,82, 137,49, 137,37, 134,50, 126,88, 118,81, 66,66, 66,53, 62,57, 57,49, 53,06, 36,74, 35,76, 30,51, 29,31, 26,79, 25,20, 19,16, 18,07. MS (ESI) m/z [M + H]+ = 575,2.

Paso 2: (2S)-N-[4-(bromometil)fenil]-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanamida

[411] A una solución de (2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-ureido-pentanamida (37,2 mg, 65 µmol) en THF (1 ml) se agregó tribromuro de fósforo (45 µl, 97 mmol) por gotas a 0 °C bajo argón. La reacción se agitó a 0 °C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 2 h. El progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS: se trató una alícuota con un gran exceso de morfolina en acetonitrilo, después de la formación del correspondiente aducto de morfolina. La reacción se diluyó con THF (3 ml), se detuvo mediante adición de 2 gotas de una solución saturada de $NaHCO_3$, se agitó durante 5 min a temperatura ambiente, se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró. El residuo, que contiene a la (2S)-N-[4-(bromometil)fenil]-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanamida cruda (45 mg, 65 µmoles teóricos), se usó inmediatamente en el paso siguiente. MS (ESI) m/z [M + H]+ = 662,62 (aducto de morfolina)

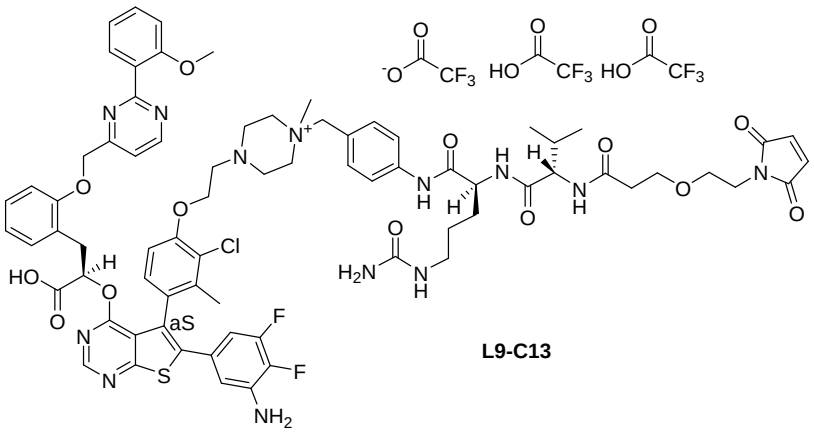
Paso 3: 3-[4-[[2-[(2R)-2-carboxi-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-etil]fenoxi]metil]pirimidin-2-il]bencensulfonato ***L9-C9***

[412] A una solución de ácido (2R)-2-{[(5S$_a$)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(3-sulfofenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico **C9** (15 mg, 16 mmol) en DMF (0,8 ml) se agregó una solución de (2S)-N-[4-(bromometil)fenil]-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanamida (45 mg crudo, 65 µmoles teóricos del paso 2) en THF (1 ml) y DIPEA (14 µl, 81 µmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente, se calentó a 50 °C durante 2 h. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener **L9-C9** (5,2 mg, 3,5 µmol). HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1481,4917/1481,4896 (medida/teórica).

Preparación de L9-C13:

Ácido (2R)-2-[6-(3-amino-4,5-difluoro-fenil)-(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]tieno[2,3-

d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético

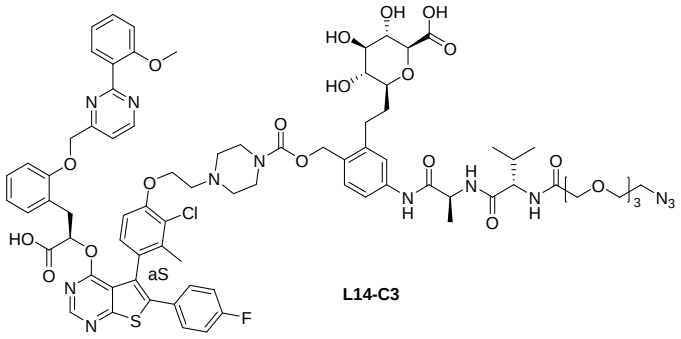


L9-C13

[413] El procedimiento es igual al proceso de síntesis de **L9-C9**, pero reemplazando el **C9** usado en el Paso 3 por el ácido (2R)-2-{[(*5S*$_a$)-6-(3-amino-4,5-difluorofenil)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico **C13** y usando el Método TFA para la purificación. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,2 (s), 8,9 (d, 1H), 8,6 (s, 1H), 8,12 (d), 7,8 (d), 7,7 (d, 2H), 7,6 (d, 1H), 7,5 (d, 1H), 7,45 (d, 2H), 7,42 (m, 1H), 7,32 (d, 1H), 7,2 (d, 1H), 7,18 (m, 1H), 7,18 (m, 1H), 7,02 (d, 1H), 7 (s, 2H), 7 (m, 1H), 6,75 (t, 1H), 6,65 (d, 1H), 6,25 (d, 1H), 6,15 (dd, 1H), 5,98 (m, 1H), 5,48 (dd, 1H), 5,4 (br s, 1H), 5,24 (dd, 2H), 4,51 (br s, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,28 (m, 2H), 4,22 (m, 1H), 3,80-3,40 (m, 8H), 3,75 (s, 3H), 3,26 (m, 4H), 3,1 (m, 2H), 2,98 (m, 4H), 2,9 (br s, 3H), 2,9/2,5 (2m, 2H), 2,43/2,3 (2m, 2H), 1,92 (m, 1H), 1,88 (s, 3H), 1,70-1,30 (m, 4H), 0,82 (2d, 6H). ^{19}F RMN (470 MHz, dmso-d6): δ -74,3, -139,3, -160,4. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1464,5482/1464,5449 (medida/teórica).

Preparación de L14-C3:

Ácido (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[(5S$_a$)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-(2-azidoetoxi)acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]piperazin-1-carbonil]oximetil]fenil]etil]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico



L14-C3

Paso 1: Ácido 2-iodo-4-nitro-benzoico

[414] A una solución de ácido 2-amino-4-nitro-benzoico (10,0 g, 54,90 mmol) en acetonitrilo (280 ml) se agregó ácido p-toluensulfónico monohidratado (32,0 g, 168,2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min, luego se agregaron una solución de nitrito de sodio (8,00 g, 115,9 mmol) y ioduro de potasio (24,0 g, 144,6 mmol) en solución en agua (140 ml) por gotas sobre un período de 15 min. La mezcla de reacción se agitó durante 19 h. Una vez completada la reacción, la mezcla se neutralizó con tiosulfato de sodio (13,02 g, 82,36 mmol) y se acidificó con una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 3 M (25 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 250 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1 M (100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El residuo resultante se tomó en diclorometano (1 l) y se lavó con una solución acuosa de HCl 1 M (100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta sequedad para obtener ácido 2-iodo-4-nitro-benzoico (15,0 g, 51,2 mmol) como un polvo anaranjado. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 13,8 (br s, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,27 (d, 1H), 7,86 (d, 1H).

Paso 2: (2-iodo-4-nitro-fenil)metanol

[415] A una solución de ácido 2-iodo-4-nitro-benzoico (5,0 g, 17,06 mmol) en THF (70 ml) se agregó una solución de borano 1 M en THF (85 ml, 85,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante 4 h. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se detuvo con la adición de metanol (200 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, luego se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (2-iodo-4-nitro-fenil)metanol (3,38 g, 12,11 mmol) como un sólido amarillo. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 8,54 (d, 1H), 8,29 (dd, 1H), 7,70 (d, 1H), 5,82 (t, 1H), 4,47 (d, 2H).

Paso 3: (4-amino-2-iodo-fenil)metanol

[416] A una solución de (2-iodo-4-nitro-fenil)metanol (3,70 g, 13,26 mmol) en etanol (100 ml) y agua (25 ml) se agregó sin inconvenientes hierro (3,70 g, 66,25 mmol) y cloruro de amonio (800 mg, 14,96 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a 80 °C. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite®, se lavó con etanol y se concentró hasta sequedad. El residuo resultante se tomó en acetato de etilo (100 ml) y se lavó con una solución saturada de carbonato ácido de sodio (100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta sequedad para obtener (4-amino-2-iodo-fenil)metanol (2,48 g, 9,95 mmol) como un aceite amarillo. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 7,02-7,10 (m, 2H), 6,57 (d, 1H), 5,16 (s, 2H), 4,97 (t, 1H), 4,28 (d, 2H).

Paso 4: 4-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-anilina

[417] A una solución de (4-amino-2-iodo-fenil)metanol (3,51 g, 13,37 mmol) en

diclorometano (150 ml) se agregó imidazol (0,95 g, 13,95 mmol). La mezcla se enfrió a 0 °C, luego se agregó por gotas una solución de ter-butil-cloro-dimetil-silano (2,40 ml, 13,85 mmol) en diclorometano (150 ml) sobre un período de 15 minutos. Se retiró el baño de hielo, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se neutralizó con metanol (20 ml) y se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener 4-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-anilina (3,64 g; 10,03 mmol; 75%) como un aceite amarillo. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 7,05 (s, 1H), 7,03 (d, 1H), 6,55 (d, 1H), 5,24 (s, 2H), 4,46 (s, 2H), 0,88 (s, 9H), 0,06 (s, 6H).

Paso 5: Ácido (2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoico

[418] A una solución de ácido (2S)-2-aminopropanoico (3,22 g, 36,09 mmol) en agua (90 ml) se agregó sin inconvenientes carbonato de sodio (7,29 g, 68,74 mmol) y una solución de (2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (15,0 g, 34,37 mmol) en dimetoxietano (90 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la mezcla se acidificó hasta pH = 1 con una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1 M, luego se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (3 x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad para obtener la mezcla cruda que se trituró con éter dietílico (50 ml) para obtener ácido (2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoico (11,25 g, 27,41 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ 12,48 (s, 1H), 8,21 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,72-7,79 (m, 2H), 7,28-7,46 (m, 5H), 4,15-4,32 (m, 4H), 3,90 (t, 1H), 1,90-2,02 (m, 1H), 1,28 (d, 3H), 0,86-0,90 (m, 6H).

Paso 6: N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[419] A una solución de ácido (2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoico (1,50 g, 3,65 mmol) en diclorometano (18 ml) y metanol (18 ml) se agregó sin inconvenientes 4-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-anilina (1,33 g, 3,65 mmol) y 2-etoxi-2H-quinolin-1-carboxilato de etilo (1,36 g, 5,48 mmol). La suspensión incolora se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Después de concentrar hasta sequedad, el producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) y luego mediante cromatografía C18 (gradiente de metanol en agua) para obtener N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (1,18 g, 1,56 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,05 (s, 1H). 8,16-8,24 (m, 2H), 7,88 (d, 2H), 7,71-7,77 (m, 2H), 7,55 (d, 1H), 7,37-7,48 (m, 3H), 7,27-7,37 (m, 3H), 4,56 (s, 2H), 4,38 (t,

1H), 4,18-4,33 (m, 3H), 3,91 (t, 1H), 2,08-2,20 (m, 1H), 1,30 (d, 3H), 0,83-0,95 (m, 15H), 0,06 (s, 6H).

Paso 7: (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)tetrahidropiran-2-ona

[420] Se agitó una suspensión de (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)tetrahidropiran-2-ol (30,0 g, 55,49 mmol) en DMSO (120 ml) durante 30 min a temperatura ambiente (hasta solubilización completa) luego se agregó anhídrido acético (90 ml) por gotas a temperatura ambiente sobre un período de 15 min. La solución beige se agitó durante 16 h luego se enfrió a 0 °C y se agregó lentamente una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1 M (100 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a temperatura ambiente, luego se evaporó el ácido acético. El residuo resultante se diluyó con agua (200 ml) y acetato de etilo (200 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 500 ml), con una solución saturada de carbonato ácido de sodio (2 x 500 ml), luego se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad para obtener la mezcla cruda. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)tetrahidropiran-2-ona (25,05 g, 46,51 mmol) como un aceite incoloro. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 7,19-7,39 (m, 20H), 4,85 (d, 1H), 4,57-4,72 (m, 5H), 4,46-4,56 (m, 3H), 4,36 (d, 1H), 3,98-4,05 (m, 1H), 3,84-3,92 (m, 1H), 3,65-3,76 (m, 2H).

Paso 8: (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)-2-(2-trimetilsililetinil)tetrahidropiran-2-ol

[421] A una solución de trimetilsililacetileno (24 ml, 168,6 mmol) en THF (325 ml) se agregó sobre un período de 20 min a -78 °C una solución de butillitio 2,5 M en hexano (59,41 ml, 148,5 mmol). La solución incolora se agitó durante 45 min a -78 °C y luego por 45 min a 0 °C. La mezcla de reacción se enfrió a -78 °C y se agregó por gotas una solución de (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)tetrahidropiran-2-ona (25,0 g, 46,41 mmol) en THF (325 ml) sobre un período de 45 min. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a esta temperatura, luego se detuvo con agua (200 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad para obtener (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)-2-(2-trimetilsililetinil)tetrahidropiran-2-ol (29,56 g, 46,41 mmol) como un aceite beige que contiene a los dos diastereoisómeros a una relación de 4/6. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 7,13-7,43 (m, 20H), 4,87-4,99 (m, 1H), 4,65-4,83 (m, 4H), 3,43-3,57 (m, 3H), 3,70-3,85 (m, 2H), 3,55-3,68 (m, 3H), 3,43-3,53 (m, 2H), 0,11-0,22 (m, 9H).

Paso 9: Trimetil-[2-[(2S,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)tetrahidropiran-2-il]etinil]silano

[422] A una solución de (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)-2-(2-trimetilsililetinil)tetrahidropiran-2-ol (29,56 g, 46,42 mmol) en acetonitrilo (83 ml) y diclorometano (193 ml) se agregaron sobre un período de 20 min a -15 °C una solución de trietilsilano (44,98 ml, 278,5 mmol) en una mezcla de acetonitrilo/diclorometano (37 ml/18 ml) seguido por una solución de complejo de trifluoruro de boro-éter dietílico (23,53 ml, 185,7 mmol) en acetonitrilo (37 ml) sobre un período de 30 min a -15 °C. La solución incolora se agitó durante 5 h a la misma temperatura, luego se diluyó con agua (500 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad para obtener trimetil-[2-[(2S,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)tetrahidropiran-2-il]etinil]silano (28,82 g, 46,41 mmol) como un aceite marrón. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 7,10-7,44 (m, 20H), 4,93 (d, 1H), 4,67-4,86 (m, 4H), 4,43-4,57 (m, 3H), 4,16-4,28 (m, 1H), 3,42-3,68 (m, 6H), 0,15 (s, 9H).

Paso 10: (2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-tribenciloxi-2-(benciloximetil)-6-etinil-tetrahidropirano

[423] A una solución de trimetil-[2-[(2S,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tribenciloxi-6-(benciloximetil)tetrahidropiran-2-il]etinil]silano (28,80 g, 46,39 mmol) en metanol (1,12 l) y diclorometano (240 ml) se agregó una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M (80 ml). La solución beige se agitó durante 1 h a temperatura ambiente luego se acidificó hasta pH = 1 con una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1 M y se diluyó con agua (500 ml). El metanol se evaporó y luego se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (2 x 1 l). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-tribenciloxi-2-(benciloximetil)-6-etinil-tetrahidropirano (20,00 g, 36,45 mmol) como un aceite incoloro. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 3,42-3,67 (m, 7H), 4,17 (d, 1H), 4,44-4,56 (m, 3H), 4,67-4,86 (m, 4H), 4,90 (d, 1H), 7,15-7,40 (m, 20H).

Paso 11: (2S,3R,4R,5S,6R)-2-etinil-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-3,4,5-triol

[424] A una solución de (2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-tribenciloxi-2-(benciloximetil)-6-etinil-tetrahidropirano (20,00 g, 36,45 mmol) en etantiol (400 ml) se agregó por gotas a temperatura ambiente sobre un período de 5 min, un complejo de trifluoruro de boro-éter dietílico (147,8 ml, 1166 mmol). La solución beige se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, luego se enfrió a 0 °C y se equipó con una trampa de gas que contiene una solución acuosa saturada de hipoclorito de sodio. Se agregó por gotas una solución acuosa saturada de carbonato ácido de sodio (500 ml) a 0 °C sobre un período de 1 h (formación de dióxido de carbono). Después de concentrar hasta sequedad, el producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano) para obtener (2S,3R,4R,5S,6R)-2-

etinil-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-3,4,5-triol (4,05 g, 21,52 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 5,28 (d, 1H), 4,99 (d, 1H), 4,91 (d, 1H), 4,52 (t, 1H), 3,77 (d, 1H), 3,60-3,69 (m, 1H), 3,35-3,43 (m, 1H), 3,32 (s, 1H), 2,97-3,13 (m, 4H).

Paso 12: (2S,3S,4R,5R,6S)-6-etinil-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[425] A una solución de (2S,3R,4R,5S,6R)-2-etinil-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-3,4,5-triol (4,05 g, 21,52 mmol) en una solución acuosa saturada de carbonato ácido de sodio (81 ml) y THF (81 ml) se agregó (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo (168 mg, 1,08 mmol). La suspensión amarilla se enfrió a 0 °C y se agregó 1,3-dibromo-5,5-dimetil-imidazolidin-2,4-diona (12,31 g, 43,04 mmol) por porciones sobre un período de 30 min. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a 0 °C, luego se detuvo con la adición de metanol (40 ml). Después de 30 min de agitación a esta temperatura, se agregaron una solución acuosa saturada de carbonato de potasio (10 ml) y diclorometano (100 ml). La capa orgánica se extrajo con agua (2 x 200 ml) luego se acidificaron las capas acuosas combinadas hasta pH = 1 con una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 3 M y se concentraron hasta sequedad. El residuo resultante se tomó en metanol (100 ml) y en una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 3 M (20 ml). La mezcla se concentró hasta sequedad y se coevaporó varias veces con metanol (4 x 100 ml). El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en desarrollador de diclorometano cerio) para obtener (2S,3S,4R,5R,6S)-6-etinil-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (3,00 g, 13,88 mmol) como un sólido beige. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 5,46 (d, 1H), 5,32 (d, 1H), 5,18 (d, 1H), 3,93-4,00 (m, 1H), 3,75 (dd, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,40-3,44 (m, 1H), 3,31 (s, 1H), 3,09-3,19 (m, 2H).

Paso 13: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-etinil-tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[426] A una solución de (2S,3S,4R,5R,6S)-6-etinil-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (3,00 g, 13,88 mmol) en DMF (37,5 ml) y piridina (12,5 ml) se agregó N,N-dimetilpiridin-4-amina (84,8 mg, 0,693 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, luego se agregó anhídrido acético (20,0 ml, 213 mmol) por gotas durante 5 min. La solución incolora se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, luego se diluyó con una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1 M (200 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1 M (2 x 200 ml), seguido por una solución acuosa saturada de carbonato de potasio (200 ml), luego se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad para obtener la mezcla cruda. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en revelador de ciclohexano-cerio) para obtener (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-etinil-tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (4,60 g, 13,44 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 5,33 (t, 1H), 4,93-5,01 (m, 2H), 4,70 (d, 1H), 4,44 (d, 1H), 3,67 (s, 1H), 3,64 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,94-2,01 (m, 6H).

Paso 14: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-[[(2S)-2-

[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[427] A una solución de (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-etinil-tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (496 mg, 1,45 mmol) en DMF (7,3 ml) se agregó sin inconvenientes N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (730 mg, 0,966 mmol), DIPEA (738 µl, 4,47 mmol), ioduro de cobre (18,4 mg, 96,6 mmol) y dicloro-bis-(trifenilfosfina)paladio(II) (67,8 mg, 96,6 mmol). La solución amarilla se lavó con argón, luego se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Después de diluir con agua (100 ml), la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 200 ml) y con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (2 x 200 ml), luego se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (782 mg, 0,806 mmol) como un sólido amarillo. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,09 (s, 1H). 8,20 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,70-7,78 (m, 3H), 7,55 (d, 1H), 7,32-7,46 (m, 4H), 7,27-7,32 (m, 2H), 5,41 (t, 1H), 4,96-5,14 (m, 3H), 4,67 (s, 2H), 4,51 (d, 1H), 4,36-4,44 (m, 1H), 4,16-4,32 (m, 3H), 3,88-3,95 (m, 1H), 3,64 (s, 3H), 1,94-2,07 (m, 10H), 1,30 (d, 3H), 0,84-0,93 (m, 15H), 0,08 (s, 6H).

Paso 15: (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil] etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[428] Se lavó una solución de (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (750 mg, 0,773 mmol) en THF (15 ml) con argón. Se agregó 5% de platino seco sobre carbón (75 mg, 50% $^{p}/_{p}$). La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con argón, con H_2 y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de H_2 (P atm). La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite®, se lavó con THF, luego se concentró hasta sequedad. La secuencia completa, (adición de 5% de platino seco sobre carbón (75 mg, 50% $^{p/p}$), agitación durante 16 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de H_2 (1 bar) y filtración a través de un lecho de Celite®), se repitió 4 veces más. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-

fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]etil] tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (470 mg, 0,483 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,90 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,70-7,78 (m, 2H), 7,37-7,49 (m, 4H), 7,27-7,32 (m, 3H), 7,23 (d, 1H), 5,29 (t, 1H), 4,95 (t, 1H), 4,78 (t, 1H), 4,60 (s, 2H), 4,34-4,44 (m, 2H), 4,16-4,32 (m, 3H), 3,88-3,95 (m, 1H), 3,72-3,79 (m, 1H), 3,64 (s, 3H), 2,69-2,78 (m, 1H), 2,50-2,60 (m, 1H), 1,92-2,03 (m, 10H), 1,55-1,75 (m, 2H), 1,30 (d, 3H), 0,84-0,93 (m, 15H), 0,05 (s, 6H).

Paso 16: (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[429] A una solución de (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (470 mg, 0,483 mmol) en THF (540 µl) y agua (540 µl) se agregó ácido acético (1,6 ml, 28,28 mmol). La solución incolora se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, luego se diluyó con agua (100 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 200 ml), y con una solución acuosa saturada de carbonato ácido de sodio (200 ml), luego se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (354 mg, 0,412 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,87 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,70-7,78 (m, 2H), 7,37-7,50 (m, 4H), 7,27-7,37 (m, 3H), 7,25 (d, 1H), 5,29 (t, 1H), 4,91-4,98 (m, 2H), 4,78 (t, 1H), 4,34-4,44 (m, 4H), 4,16-4,32 (m, 3H), 3,88-3,95 (m, 1H), 3,72-3,79 (m, 1H), 3,64 (s, 3H), 2,64-2,73 (m, 1H), 2,50-2,60 (m, 1H), 1,92-2,03 (m, 10H), 1,69-1,79 (m, 1H), 1,52-1,65 (m, 1H), 1,30 (d, 3H), 0,84-0,93 (m, 6H).

Paso 17: (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[430] A una solución de (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (310 mg, 0,361 mmol) en THF (7,75 ml) se agregó sin inconvenientes piridina (146 µl, 1,80 mmol) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (182 mg, 0,901 mmol). La suspensión blanca se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, luego se concentró hasta sequedad para obtener la mezcla cruda. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en

diclorometano) para obtener (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (257 mg, 0,251 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,04 (s, 1H), 8,31 (d, 2H), 8,20 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,66-7,78 (m, 2H), 7,56 (d, 2H), 7,28-7,52 (m, 8H), 5,31 (t, 1H), 5,25 (s, 2H), 4,96 (t, 1H), 4,79 (t, 1H), 4,40 (d, 2H), 4,16-4,32 (m, 3H), 3,88-3,95 (m, 1H), 3,74-3,83 (m, 1H), 3,61 (s, 3H), 2,74-2,84 (m, 1H), 2,60-2,71 (m, 1H), 1,90-2,03 (m, 10H), 1,72-1,83 (m, 1H), 1,58-1,71 (m, 1H), 1,30 (d, 3H), 0,82-0,94 (m, 6H). LC-MS: MS (ESI) m/z [M+Na]+ = 1047,6.

Paso 18: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[2-[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-triacetoxi-6-metoxicarbonil-tetrahidropiran-2-il]etil]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[431] A una solución de ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **(C3)** (118 mg, 0,121 mmol) en dimetilformamida (3,0 ml) se agregó sin inconvenientes una solución de (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (130 mg, 0,127 mmol) en dimetillformamida (3,0 ml) y DIPEA (60 µl, 0,363 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se obtuvo ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[2-[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-triacetoxi-6-metoxicarbonil-tetrahidropiran-2-il]etil]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico como una solución en dimetilformamida y se usó como tal en el paso siguiente. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1745,6+1747,6.

Paso 19: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[2-[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-triacetoxi-6-metoxicarbonil-tetrahidropiran-2-il]etil]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[432] A la solución de ácido 2SR,3SR,4RS,5RS,6SR)-6-[2-[(5S$_a$)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]piperazin-1-carbonil]oximetil]fenil]etil]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-

carboxílico (0,121 mmol) en DMF (3,0 ml) del paso 18 se agregó sin inconvenientes metanol (2 ml) e hidróxido de litio monohidratado (64,0 mg, 1,52 mmol) en solución en agua (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[2-[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-triacetoxi-6-metoxicarbonil-tetrahidropiran-2-il]etil]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (124 mg, 0,0895 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1384,3+1386,3.

Paso 20: (2,3,4,5,6-pentafluorofenil)2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato de ácido 2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acético

[433] A una solución de ácido 2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acético (75 mg, 0,342 mmol) en solución en THF (500 µl) se agregaron una solución de 2,3,4,5,6-pentafluorofenol (75,5 mg, 0,410 mmol) en THF (500 µl) y una solución de N,N'-diciclohexilmetandiimina (84,7 mg, 0,410 mmol) en THF (500 µl). La mezcla de reacción se agitó durante 15 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El (2,3,4,5,6-pentafluorofenil)2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato se obtuvo como una solución de THF mediante filtración simple de la suspensión con una pequeña frita descartable. Esta solución se usó sin purificación adicional en el paso siguiente. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M-N2+H]+ = 372,3.

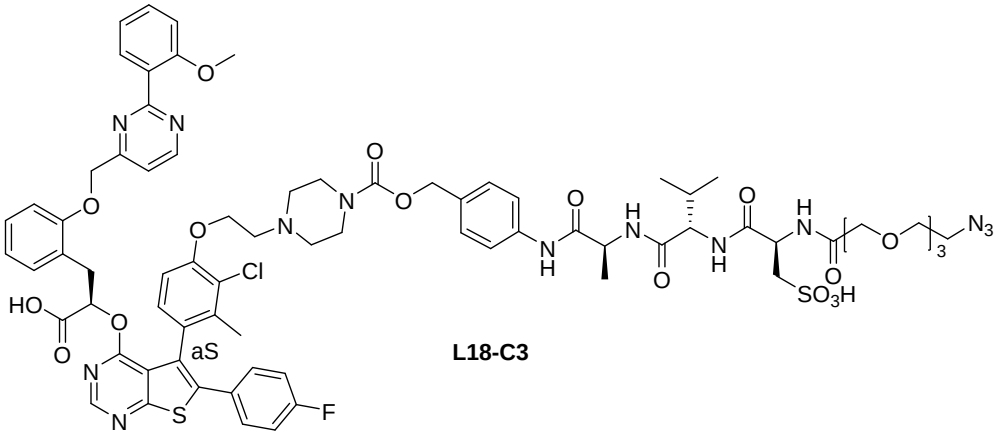
Paso 21: Ácido (2SR,3SR,4RS,5RS,6SR)-6-[2-[($5S_a$)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]piperazin-1-carbonil]oximetil]fenil]etil]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico ***L14-C3***

[434] A la solución de ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[2-[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-triacetoxi-6-metoxicarbonil-tetrahidropiran-2-il]etil]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (118 mg, 0,085 mmol) en DMF (500 µl) se agregó sin inconvenientes la solución de (2,3,4,5,6-pentafluorofenil)2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato (0,342 mmol) en THF del paso 20 y DIPEA (42,2 µl, 0,256 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de

reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener **L14-C3** como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1599,0+1601,2. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3263, 2105, 1652, 1600, 1284/1240/1089, 756. $_1$H RMN(400 MHz, dmso-d6): δ 9,98 (s), 8,85 (d, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,38 (d, 1H), 7,93 (d, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,49 (d, 1H), 7,47 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,3 (dd, 2H), 7,22 (d, 1H), 7,2 (t, 2H), 7,19 (t, 1H), 7,13 (d, 1H), 7,08 (t, 1H), 7,02 (t, 1H), 6,95 (d, 1H), 6,65 (t, 1H), 6,11 (d, 1H), 5,43 (d, 1H), 5,27/5,2 (m, 2H), 4,93 (br s, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,35/4,2 (2m, 2H), 4,3 (m, 1H), 3,94 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,58 (m, 10H), 3,57 (m, 1H), 3,51/2,29 (2dd, 2H), 3,35 (m, 2H), 3,25 (m, 4H), 3,2 (m, 1H), 3,2 (m, 1H), 3,06 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,75 (m, 2H), 2,72/2,5 (m, 2H), 2,41 (m, 4 H), 2 (m, 1H), 1,99/1,6 (m, 2H), 1,8 (s, 3H), 1,3 (d, 3H), 0,88/0,82 (2d, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 158,2, 152,7, 131,9, 131,4, 131,4, 131,3, 131,1, 131, 127,8, 120,6, 120,5, 120,1, 116,8, 116,3, 116, 112,6, 112, 111,6, 79,6, 79,6, 78,5, 76,8, 74,2, 73,1, 70,3, 70,3, 69,3, 66,3, 65,1, 56,8, 56,3, 56,1, 52,6, 50,3, 49,4, 43,8, 34,2, 33,5, 31,7, 28, 19,6/18,4, 18,2, 18**.** ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ -112,5**.** HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1599,5724 (1599,5704) (medida/teórica)

Preparación de L18-C3:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2R)-2-[[2-(2-azidoetoxi)acetil]amino]-3-sulfo-propanoil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



L18-C3

Paso 1: N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[435] A una solución de ácido (2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoico (6,0 g, 14,6 mmol; obtenida de acuerdo con el Paso 5 de la preparación de L14-C3) en diclorometano (70 ml) y metanol (30 ml) se agregó sin inconvenientes (4-aminofenil)metanol (2,16 g, 17,5 mmol) y 2-etoxi-2H-quinolin-1-carboxilato de etilo (5,42 g, 21,93 mmol). La solución roja se agitó a temperatura ambiente durante 16 h

(con precipitación después de unos pocos minutos). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (70 ml). El precipitado resultante se separó por filtración y se secó para obtener N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (5,16 g, 10,01 mmol) como un sólido beige. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,91 (s, 1H), 8,15 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,70-7,78 (m, 2H), 7,53 (d, 2H), 7,38-7,46 (m, 3H), 7,29-7,35 (m, 2H), 7,23 (d, 2H), 5,08 (t, 1H), 4,37-4,50 (m, 3H), 4,16-4,34 (m, 3H), 3,91 (t, 1H), 1,92-2,02 (m, 1H), 1,30 (d, 3H), 0,83-0,91 (m, 6H).

Paso 2: (2S)-2-amino-N-[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]-3-metil-butanamida

[436] A una solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (5,16 g, 10,01 mmol) en DMF (120 ml) se agregó piperidina (52 ml, 525 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, luego la piperidina se evaporó y la solución resultante se diluyó con agua (500 ml). El sólido resultante se separó por filtración y el filtrado se lavó dos veces con éter dietílico (2 x 500 ml). La capa acuosa se concentró hasta sequedad para obtener la mezcla de reacción cruda. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol (que contiene amoníaco 7 M) en diclorometano) para obtener (2S)-2-amino-N-[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]-3-metil-butanamida (2,02 g, 6,89 mmol) como un sólido beige. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,0 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,53 (d, 2H), 7,23 (d, 2H), 5,12 (t, 1H), 4,39-4,52 (m, 3H), 2,96-3,02 (m, 1H), 1,86-1,97 (m, 1H), 1,70 (br s, 2H), 1,29 (d, 3H), 0,88 (d, 3H), 0,78 (d, 3H).

Paso 3: [(2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-oxo-3-sodio-oxi-propil]sulfoniloxisodio

[437] A una solución de [(2R)-2-amino-3-oxo-3-sodio-oxi-propil]sulfoniloxi-sodio monohidratado (3,00 g, 12,98 mmol) en agua (127 ml) se agregó carbonato de sodio (4,13 g, 38,94 mmol). Se agregó por gotas una solución de cloroformiato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (3,69 g, 14,28 mmol) en dioxano (127 ml) sobre un período de 15 min a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 4 h. Una vez completada la reacción, la mezcla se neutralizó a pH = 7 con una solución acuosa de HCl 1 M, se diluyó con una solución acuosa saturada de carbonato ácido de sodio (50 ml) y se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía C18 de fase reversa usando el método neutro para obtener [(2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-oxo-3-sodiooxi-propil]sulfoniloxisodio (4,4 g, 10,11 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 7,88 (d, 2H). 7,70 (d, 2H), 7,39-7,44 (m, 2H), 7,29-7,36 (m, 2H), 6,71 (s, 1H), 3,84-4,25 (m, 4H), 2,73-2,91 (m, 2H).

Paso 4: [(2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-[[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-

(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]amino]-3-oxo-propil]sulfoniloxisodio

[438] A una solución de (2S)-2-amino-N-[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]-3-metil-butanamida (1,19 g, 4,04 mmol) en DMF (395 ml) se agregó sin inconvenientes [(2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-oxo-3-sodiooxi-propil]sulfoniloxisodio (4,40 g, 10,11 mmol), DIPEA (6,01 ml, 36,38 mmol) y HBTU (3,83 g, 10,11 mmol). La suspensión blanca se agitó durante 22 h a temperatura ambiente y luego se enfrió a 0 °C. La dilución con agua (1,5 l), con una solución saturada de carbonato de sodio (20 ml) y con cloruro de sodio sólido, dio una emulsión blanca que se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad para obtener la mezcla cruda. El producto crudo se purificó mediante cromatografía C18 de fase reversa (gradiente de metanol en agua) para obtener [(2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-[[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]amino]-3-oxo-propil]sulfoniloxisodio (936 mg, 1,36 mmol) como un sólido beige. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,39 (s, 1H). 8,25-8,31 (m, 1H), 8,11-8,17 (m, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,70 (d, 2H), 7,64 (d, 2H), 7,50-7,55 (m, 1H), 7,38-7,46 (m, 2H), 7,29-7,35 (m, 2H), 7,20 (d, 2H), 5,07 (s, 1H), 4,51 (s, 1H), 4,42 (s, 2H), 4,19-4,33 (m, 4H), 4,01 (s, 1H), 2,90-3,10 (m, 2H), 2,08-2,20 (m, 1H), 1,31 (d, 3H), 0,8-0,93 (m, 6H).

Paso 5: (2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-[[(1S)-2-metil-1-[[(1S)-1-metil-2-[4-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]anilino]-2-oxo-etil]carbamoil]propil]amino]-3-oxo-propan-1-sulfonato

[439] A una suspensión de [(2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-[[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(hidroximetil)anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]amino]-3-oxo-propil]sulfoniloxisodio (600 mg, 0,87 mmol) en THF (24 ml) se agregaron DIPEA (432 µl, 2,61 mmol), seguido por cloroformiato de 4-nitrofenilo (439 mg, 2,17 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se agregó cloroformiato de 4-nitrofenilo (439 mg, 2,17 mmol) adicional y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h más. Se agregó cloroformiato de 4-nitrofenilo (439 mg, 2,17 mmol) adicional. Después de 5 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se concentró hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) y luego mediante cromatografía C18 de fase reversa usando el método neutro para obtener (2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-[[(1S)-2-metil-1-[[(1S)-1-metil-2-[4-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]anilino]-2-oxo-etil]carbamoil]propil]amino]-3-oxo-propan-1-sulfonato (303 mg, 0,32 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,52 (s, 1H), 8,25-8,37 (m, 3H), 8,06-8,24 (m, 4H), 7,89 (d, 2H), 7,76 (d, 2H), 7,70 (d, 2H), 7,49-7,61 (m, 3H), 7,35-7,45 (m, 4H), 7,26-7,35 (m, 2H), 5,23 (s, 2H), 4,48 (s, 1H), 4,20-4,33 (m, 4H), 4,01 (s, 1H), 3,57-3,66 (m, 2H), 3,10-3,18 (m, 2H), 2,90-3,10 (m, 2H), 2,08-2,20 (m, 1H), 1,33 (d, 3H), 1,21-1,26 (m, 15H), 0,86-0,92 (m, 6H). UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M-H]-: 830,5.

Paso 6: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)butanoil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[440] A una solución de ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; ácido 2,2,2-trifluoroacético (**C3**) (128 mg, 0,149 mmol) en DMF (1,5 ml) se agregó sin inconvenientes una solución de (2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-[[(1S)-2-metil-1-[[(1S)-1-metil-2-[4-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]anilino]-2-oxo-etil]carbamoil]propil]amino]-3-oxo-propan-1-sulfonato (150 mg, 0,156 mmol) en DMF (1,5 ml) y DIPEA (77 µl, 0,468 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. Se obtuvo ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)butanoil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico como una solución en dimetilformamida que se usó como tal en el paso siguiente. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1553,2+1555,3.

Paso 7: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-aminobutanoil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

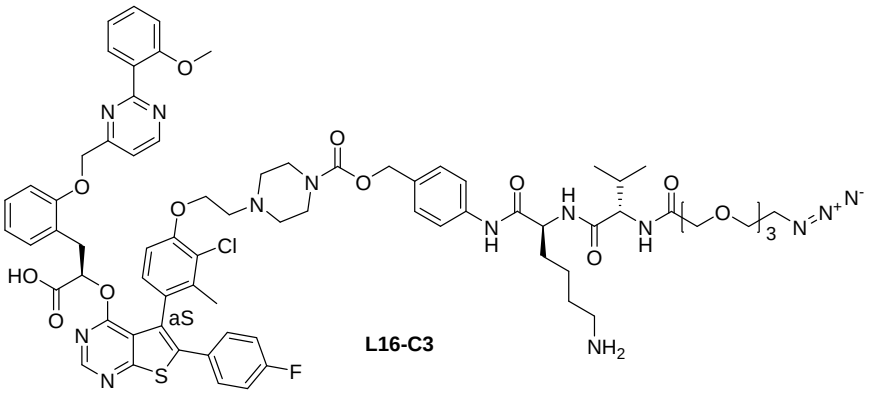
[441] A la solución de ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)butanoil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (0,156 mmol) en dimetilformamida (3 ml) obtenida en el paso anterior se agregó piperidina (30,6 µl, 0,312 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-aminobutanoil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (148 mg = 0,111 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1331,4+1333,5.

Paso 8: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]butanoil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; ácido 2,2,2-trifluoroacético ***L18-C3***

[442] A la solución de ácido **(**2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-aminobutanoil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (148 mg, 0,111 mmol) en DMF (1,5 ml) se agregó sin inconvenientes la solución de (2,3,4,5,6-pentafluorofenil)2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato (0,596 mmol; obtenida de acuerdo con el Paso 20 de la preparación de L14-C3) en THF (1 ml) y DIPEA (74 µl, 0,447 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener L18-C3 (60 mg, 0,0389 mmol) como un polvo blanco. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3288, 2101, 1659, 1237,1039, 833,755. $_1$H RMN(400 MHz, dmso-d6): δ (m, 10H), 9,42 (s, 1H), 8,88 (d, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,32 (d, 1H), 8,18 (d, 1H), 8,12 (d, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,7 (d, 2H), 7,54 (dd, 1H), 7,46 (td, 1H), 7,39 (d, 1H), 7,29 (dd, 2H), 7,25 (d, 2H), 7,21 (t, 2H), 7,18 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,13 (t, 1H), 7,04 (t, 1H), 6,99 (d, 1H), 6,71 (t, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,47 (m, 1H), 5,23 (AB, 2H), 4,98 (s, 2H), 4,71 (q, 1H), 4,3 (m, 1H), 4,24/4,19 (2m, 2H), 3,97 (dd, 1H), 3,92 (m, 2H), 3,76 (s, 3 H), 3,37 (t, 2H), 3,31 (m, 4H), 3,12/2,97 (2dd, 2H), 2,74 (t, 2H), 2,45 (m, 4H), 2,15 (m, 1H), 1,81 (s, 3H), 1,33 (d, 3H), 0,91 (2d, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 157,9, 152,3, 131,3, 131,2, 131,1, 131, 130,7, 128,9, 128,6, 120,7, 120,4, 119,6, 116,4, 112,7, 112, 111,3, 70,6, 70,3, 69,4, 67,5, 66,3, 59,7, 56,7, 56,1, 53,4, 52,5, 50,8, 50,4, 49,9, 44, 29,9, 19,6, 17,8, 17,6. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ ppm 112,3. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1546,503 (1546,5009) (medida/teórica).

Preparación de L16-C3:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-6-amino-2-[[(2S)-2-[[2-(2-azidoetoxi)acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



L16-C3

Paso 1: Ácido (2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoico

[443] A una solución de ácido (2S)-2-amino-6-(ter-butoxicarbonilamino)hexanoico (2,96 g, 12 mmol) y carbonato ácido de sodio (1,01 g, 12 mmol) en agua (30 ml) se agregó una solución de (2,5-dioxopirrolidin-1-il)2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoato (5,0 g, 11,5 mmol) en dimetoxietano (30 ml), se agregó THF (15 ml) para mejorar la solubilidad. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se agregó una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M (15 ml) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad para obtener el compuesto crudo. La trituración en diclorometano/pentano con sonicación permitió obtener ácido (2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoico (4,9 g, 8,63 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 12,48 (s, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,74 (t, 2H), 7,28-7,44 (m, 6H), 6,73 (s, 1H), 4,10-4,33 (m, 5H), 3,9 (t, 1H), 2,82-2,90 (m, 2H), 1,52-1,73 (m, 2H), 1,34 (s, 9H), 1,22-1,31 (m, 4H), 0,83-0,91 (m, 6H).

Paso 2: N-[1-[[(1S)-5-(ter-butoxicarbonilamino)-1-[[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]pentil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[444] A una solución de ácido (2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoico (1,5 g, 2,64 mmol) en diclorometano (19 ml) y metanol (9,5 ml) se agregó (4-aminofenil)metanol (651,0 mg, 5,28 mmol) en metanol (1,5 ml). Luego se agregó 2-etoxi-2H-quinolin-1-carboxilato de etilo (1,31 g, 5,28 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, luego se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano) para obtener N-[1-[[(1S)-5-(ter-butoxicarbonilamino)-1-[[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]pentil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (544 mg, 0,80 mmol) como un sólido rojo pálido. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,93

(s, 1H). 8,01 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,74 (t, 2H), 7,52 (d, 2H), 7,37-7,45 (m, 3H), 7,32 (t, 2H), 7,22 (d, 2H), 6,71 (s, 1H), 5,08 (br s, 1H), 4,43 (d, 2H), 4,21-4,40 (m, 4H), 3,92 (t, 1H), 2,83-2,91 (m, 2H), 1,94-2,01 (m, 1H), 1,55-1,74 (m, 2H), 1,21-1,42 (m, 4H), 1,33 (s, 9H), 0,87 (t, 6H).

Paso 3: (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoil]amino]fenil]metilo

[445] A una solución de N-[1-[[(1S)-5-(ter-butoxicarbonilamino)-1-[[4-(hidroximetil)fenil]carbamoil]pentil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (600,0 mg, 0,892 mmol) en THF (19 ml), se agregaron piridina (361 µl, 4,46 mmol), luego cloroformiato de 4-nitrofenilo (448 mg, 2,22 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, luego se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (4-nitrofenil)carbonato de [4-[[(2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoil]amino]fenil]metilo (524 mg; 0,62 mmol; 70%) como un sólido rosa pálido. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,13 (s, 1H), 8,31 (d, 2H), 8,1 (d, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,74 (t, 2H), 7,63 (d, 2H), 7,57 (d, 2H), 7,28-7,45 (m, 7H), 6,72 (s, 1H), 5,24 (s, 2H), 4,35-4,42 (m, 1H), 4,27-4,33 (m, 1H), 4,22 (s, 2H), 3,92 (t, 1H), 2,83-2,91 (m, 2H), 1,96-2,00 (m, 1H), 1,58-1,73 (m, 2H), 1,20-1,30 (m, 4H), 1,33 (s, 9H), 0,86 (t, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 171,22, 170,67, 156,1, 155,5, 155,27, 151,92, 145,15, 143,87, 143,75, 140,68, 139,34, 129,43, 129,31, 127,6, 127,03, 125,38, 125,32, 122,58, 120,07, 119,11, 77,28, 70,23, 65,67, 60,11, 54,89, 53,43, 46,67, 31,69, 30,39, 29,22, 28,23, 22,74, 19,19, 18,26. LC-MS: MS (ESI) m/z [M+Na]+ = 837,4.

Paso 4: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[446] A una solución de ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **C3** (166,3 mg, 0,170 mmol) en DMF (1,5 ml) se agregó sin inconvenientes una solución (4-nitrofenil)carbonato de de [4-[[(2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoil]amino]fenil]metilo (150 mg, 0,179 mmol) en DMF (1,5 ml) y DIPEA (85 µl, 0,510 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-

[[4-[[(2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (134 mg, 0,0859 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1559,1+1561,3, [M+Na]+: 1581,0+1583,2. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3309, 1698, 1238, 1162, 757, 744. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,05 (s, 1H), 8,87 (d, 1H), 8,6 (m, 1H), 8,06 (d, 1H), 7,88 (d, 2H), 7,74 (2d, 2H), 7,64 (m, 1H), 7,57 (d, 2H), 7,52 (dd, 1H), 7,44 (t, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,4 (t, 2H), 7,35 (d, 1H), 7,3 (t, 2H), 7,3 (dd, 2H), 7,26 (d, 2H), 7,2 (t, 2H), 7,18 (d, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,12 (t, 1H), 7,03 (t, 1H), 6,99 (d, 1H), 6,72 (t, 1H), 6,71 (m, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,49 (dd, 1H), 5,23 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,29/4,23 (m, 2H), 4,22 (m, 1H), 4,2 (m, 2H), 3,92 (dd, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,29 (m, 4H), 3,29/2,5 (2dd, 2H), 2,87 (m, 2H), 2,74 (t, 2H), 2,45 (m, 4H), 1,99 (m, 1H), 1,82 (s, 3 H), 1,68/1,6 (2m, 2H), 1,36/1,28 (2m, 4H), 1,32 (s, 9H), 0,86 (2d, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 158, 131,4, 131,2, 131,2, 131, 130,8, 128,9, 128,5, 127,9, 127,5, 125,6, 120,8, 120,5, 120,4, 119,3, 116, 115,9, 112,4, 112,2, 111,2, 74,1, 69,2, 67,9, 66,7, 66,2, 60,6, 56,6, 56,2, 53,8, 53, 47,1, 43,7, 40, 32,6, 32,2, 30,6, 29,8/23,2, 28,5, 18,8, 18,1. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ -112.

Paso 5: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-6-(ter-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[447] A la solución de ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-6-(ter-butoxicarbonilamino)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (134 mg, 0,0859 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se agregó piperidina (17 µl, 0,172 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-6-(ter-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (88 mg, 0,0658 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1337,4+1339,4, [M+Na]+ = 1359,4+1361,4. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3307, 1683, 1290, 1238, 1162, 835, 754. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ ppm 10,23 (s, 1H), 8,88 (d, 1H), 8,53 (m, 1H), 8,47 (br, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,58 (d, 2H), 7,54 (d, 1H), 7,48 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,27 (dd, 2H), 7,25 (d, 2H), 7,19 (t, 2H), 7,18 (d, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,08 (t, 1H), 7,03

(t, 1H), 6,96 (t, 1H), 6,72 (t, 1H), 6,67 (t, 1H), 6,14 (d, 1H), 5,42 (d, 1H), 5,21 (m, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,4 (m, 1H), 4,21 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,42/2,35 (m, 2H), 3,29 (m, 4H), 3,24 (m, 1H), 2,87 (q, 2H), 2,72 (t, 2H), 2,43 (m, 4H), 1,99 (m, 1H), 1,78 (s, 3H), 1,7/1,61 (2m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,34 (s, 9H), 1,26 (m, 2H), 0,89/0,82 (2d, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ ppm 158,4, 131,3, 131,2, 131,1, 131, 128,4, 128, 120,8, 120,6, 120,4, 119,7, 116,1, 115,9, 112,7, 111,7, 111,2, 76,2, 69,2, 67,4, 66,3, 59,2, 56,6, 56,3, 53,6, 53,1, 43,8, 40,1, 33,2, 32,4, 31,3, 29,3, 28,8, 22,9, 19,7/17,5, 17,9. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ ppm -112,4.

Paso 6: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-6-(ter-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[448] A una solución de ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-6-(ter-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (82 mg, 0,0613 mmol) en DMF (500 µl) se agregó sin inconvenientes la solución de (2,3,4,5,6-pentafluorofenil)2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato (0,245 mmol; obtenida de acuerdo con el Paso 20 de la preparación de **L14-C3**) en THF y DIPEA (30,4 µl, 0,184 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-6-(ter-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (60 mg, 0,0386 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1552,2+1554,2, [M+Na]+ = 1574,1+1576,3.

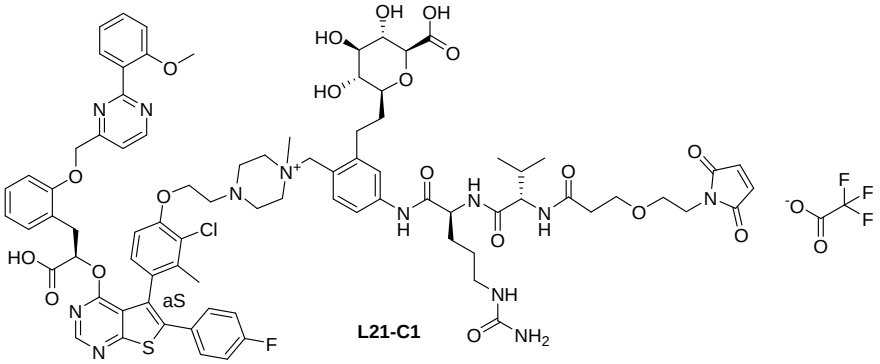
Paso 7: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-6-amino-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico ***L16-C3***

[449] A una solución de ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]-6-(ter-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-

il]metoxi]fenil]propanoico (23 mg, 0,0148 mmol) en diclorometano (3 ml) se agregó ácido 2,2,2-trifluoroacético (400 µl, 4,57 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener L16-C3 (5 mg, 0,00344 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1552,4+1554,5, [M+Na]+ = 1574,4+1576,4. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3250, 2250-3500, 2102, 1660, 1288, 1238, 1121, 833, 755. $_1$H RMN(400 MHz, dmso-d6): δ ppm 10,24 (s, 1H), 8,85 (d, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,49 (d, 1H), 7,98 (d, 1H), 7,6 (d, 2H), 7,55 (d, 1H), 7,51 (d, 1H), 7,5 (d, 1H), 7,46 (t, 1H), 7,26 (d, 2H), 7,25 (dd, 2H), 7,18 (t, 2H), 7,17 (d, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,05 (t, 1H), 7,02 (t, 1H), 6,89 (d, 1H), 6,6 (t, 1H), 6,05 (d, 1H), 5,32 (d, 1H), 5,21/5,15 (m, 2H), 5,02/4,96 (m, 2H), 4,36 (q, 1H), 4,31 (dd, 1H), 4,2 (m, 2H), 3,94 (s, 2H), 3,77 (s, 3 H), 3,58 (m, 10 H), 3,46/2,28 (d+t, 2H), 3,34 (t, 2H), 3,29 (m, 4 H), 2,8 (m, 2H), 2,67 (t, 2H), 2,43 (m, 4 H), 2,01 (m, 1H), 1,75 (s, 3 H), 1,69/1,6 (2m, 2H), 1,51 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 0,86/0,8 (2d, 6 H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ ppm 157,9, 153,7, 131,4, 131,4, 131,3, 131,1, 130,9, 129,3, 127,6, 120,9, 120,4, 119,8, 116,2, 116,1, 112,6, 111,8, 111,8, 78,1, 70,5, 70,4, 69,3, 66,6, 66,6, 56,9, 56,5, 56,3, 54, 52,3, 50,4, 44, 39, 33,8, 32,2, 31,8, 28,2, 23,1, 19,7/18,1, 18,3. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6): δ ppm -112,6. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1452,5661 (1452,5648) (medida/teórica).

Preparación de L21-C1:

Ácido (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]etil]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico; 2,2,2-trifluoroacetato



Paso 1: ter-butil-[(2-iodo-4-nitro-fenil)metoxi]-dimetil-silano

[450] A una solución de (2-iodo-4-nitro-fenil)metanol (172 g, 61,64 mmol; obtenida de acuerdo con el Paso 2 de la preparación de L14-C3) en diclorometano (300 ml) se agregó

imidazol (5,04 g, 73,97 mmol). La mezcla se enfrió a 0 °C, luego se agregó por gotas una solución de ter-butil-cloro-dimetil-silano (11,15 g, 73,97 mmol) en diclorometano (300 ml) sobre un período de 15 min. Se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se detuvo con metanol (20 ml) y se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener ter-butil-[(2-iodo-4-nitro-fenil)metoxi]-dimetil-silano (19,65 g, 49,96 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 8,57 (s, 1H), 8,31 (d, 1H), 7,66 (d, 1H), 4,67 (s, 2H), 0,92 (s, 9H), 0,14 (s, 6H).

Paso 2: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-nitro-fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[451] A una solución del compuesto ter-butil-[(2-iodo-4-nitro-fenil)metoxi]-dimetil-silano (3,0 g, 7,63 mmol) en DMF (55 ml) se agregó sin inconvenientes (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-etinil-tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (3,39 g, 9,92 mmol; obtenido de acuerdo con el Paso 13 de la preparación de L14-C3), DIPEA (5,80 ml, 35,09 mmol), ioduro de cobre (145 mg, 0,763 mmol) y dicloro-bis-(trifenilfosfina)paladio(II) (535 mg, 0,763 mmol). La solución amarilla se lavó con argón y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Después de dilución con agua (300 ml), la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 300 ml), luego se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener metilo (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-nitro-fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (4,01 g, 6,60 mmol) como un sólido beige. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 8,32 (dd, 1H), 8,19 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 5,45 (t, 1H), 5,16 (t, 1H), 5,02-5,07 (m, 2H), 4,82 (s, 2H), 4,55 (d, 1H), 3,65 (s, 3H), 1,98-2,07 (m, 9H), 0,92 (m,9H), 0,14 (s, 6H).

Paso 3: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-(hidroximetil)-5-nitro-fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[452] A una solución de (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-[[ter-butil(dimetil)silil]oximetil]-5-nitro-fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (4,01 g, 6,60 mmol) en THF (48 ml) y agua (48 ml) se agregó ácido acético (193 ml, 3,36 mol). La solución incolora se agitó durante 2 días a temperatura ambiente, luego se diluyó con agua (300 ml). La capa acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 300 ml), y con una solución acuosa saturada de carbonato ácido de sodio (400 ml), luego se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-

triacetoxi-6-[2-[2-(hidroximetil)-5-nitro-fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (2,67 g, 5,41 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 8,29 (dd, 1H), 8,15 (d, 1H), 7,79 (d, 1H), 5,68 (t, 1H), 5,45 (t, 1H), 5,16 (t, 1H), 5,02-5,07 (m, 2H), 4,62 (d, 2H), 4,55 (d, 1H), 3,65 (s, 3H), 1,98-2,07 (m, 9H).

Paso 4: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-amino-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[453] Se lavó una solución de (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-(hidroximetil)-5-nitro-fenil]etinil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (2,67 g, 5,41 mmol) en THF (59 ml) con argón. Se agregó 5% de platino sobre carbón seco (1,34 g, 50% p/p). La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con argón, con H_2 y se agitó durante 2 días a temperatura ambiente bajo atmósfera de H_2 (P atm). La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite®, se lavó con una solución de acetato de etilo/metanol 9/1 (500 ml), luego se concentró hasta sequedad. Toda la secuencia, (adición de 5% de platino sobre carbón seco (1,34 g, 50% p/p), agitación durante 16 h a temperatura ambiente bajo H_2 (P atm) y filtración a través de un lecho de Celite®), se repitió para permitir una conversión completa. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en ciclohexano) para obtener (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-amino-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (1,12 g, 2,40 mmol) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 6,93 (d, 1H). 6,67-6,33 (m, 2H), 5,30 (t, 1H), 4,96 (t, 1H), 4,88 (s, 2H), 4,81 (t, 1H), 4,61 (t, 1H), 4,39 (d, 1H), 4,29-4,24 (m, 2H), 3,78-3,72 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,65-2,54 (m, 2H), 2,07-1,98 (m, 9H), 1,79-1,68 (m, 1H), 1,63-1,52 (m, 1H).

Paso 5: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[454] A una solución de (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-amino-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (1,00 g, 2,14 mmol) en DMF (21 ml) se agregó sin inconvenientes ácido (2S)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoico (589 mg, 2,14 mmol), DIPEA (707 µl, 4,28 mmol) y HBTU (1,22 g, 3,21 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 72 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la mezcla se diluyó con agua (100 ml) y se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano) para obtener (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (1,05 g, 1,45 mmol) como un sólido beige. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,82 (s, 1H), 7,35-7,42 (m, 2H), 7,24 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 5,94 (t, 1H), 5,37 (s, 2H), 5,30 (t, 1H), 4,91-4,99 (m, 2H), 4,79 (t, 1H), 4,36-4,42 (m, 3H), 4,01-4,08 (m, 1H), 3,76 (t, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,95-3,04 (m, 2H), 2,54-2,65 (m, 2H), 1,98-2,07 (m, 9H), 1,68-1,79 (m, 1H), 1,49-1,63 (m, 3H), 1,30-1,42

(m, 11H).

Paso 6: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[455] A una solución del compuesto (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-(ter-butoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (950 mg, 1,31 mmol) en diclorometano (7,5 ml) se agregó, a 0 °C, ácido trifluoroacético (1,9 ml, 25,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y se coevaporó con tolueno (2 x 50 ml) para obtener el compuesto crudo.

[456] A este compuesto crudo en solución en DMF (13 ml) se agregó sin inconvenientes ácido (2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoico (467 mg, 1,38 mmol), DIPEA (867 µl, 5,24 mmol) y HBTU (845 mg, 2,23 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, se agregó una solución acuosa saturada de carbonato ácido (20 ml), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se diluyó con agua (100 ml) y se concentró hasta sequedad. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano) y luego mediante cromatografía C18 de fase reversa usando el método neutro para obtener (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (680 mg, 0,720 mmol) como un sólido blanco. LC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 946,3. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 9,90 (s, 1H). 8,07 (d, 2H), 7,89 (d, 2H), 7,74 (t, 2H), 7,44-7,38 (m, 3H), 7,36-7,28 (m, 3H), 7,24 (d, 1H), 5,94 (t, 1H), 5,37 (s, 2H), 5,30 (t, 1H), 4,99-4,92 (m, 2H), 4,79 (t, 1H), 4,42-4,36 (m, 4H), 4,32-4,19 (m, 3H), 3,94-3,90 (m, 1H), 3,76 (t, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,99-2,94 (m, 2H), 2,65-2,54 (m, 2H), 2,07-1,98 (m, 10H), 1,70-1,55 (m, 4H), 1,46-1,36 (m, 2H), 0,89-0,84 (m, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ 171,19, 170,33, 169,58, 169,45, 169,27, 167,77, 158,81, 156,12, 143,89, 143,76, 140,69, 139,48, 137,54, 134,88, 128,44, 127,62, 127,06, 125,35, 120,08, 119,42, 116,65, 75,78, 74,61, 72,65, 71,20, 69,49, 65,68, 60,49, 60,10, 53,14, 52,40, 46,68, 32,32, 30,43, 29,54, 27,19, 26,77, 20,39, 20,34, 20,24, 19,22, 18,25.

Paso 7: (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-(bromometil)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo

[457] A una solución del compuesto (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (154 mg,

0,163 mmol) en THF (8,2 ml) se agregó sucesivamente trifenilfosfina (85,4 mg, 0,326 mmol) y 1-bromopirrolidin-2,5-diona (58,0 mg, 0,326 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS: se trató una alícuota con un gran exceso de MeOH, después de la formación del correspondiente éter metílico. El derivado bromuro esperado era estable en las condiciones de UPLC-MS. Después de 5 h se agregaron trifenilfosfina (85,4 mg, 0,326 mmol) y 1-bromopirrolidin-2,5-diona (58,0 mg, 0,326 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 h a temperatura ambiente. El (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-(bromometil)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo crudo obtenido se usó como tal en el paso siguiente. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+OMe-Br+H]+ = 960,7.

Paso 8: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[2-[(2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-metoxicarbonil-tetrahidropiran-2-il]etil]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[458] A la solución de (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[2-(bromometil)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]etil]tetrahidropiran-2-carboxilato de metilo (0,167 mmol) en DMF del paso anterior (paso 7) se agregó sucesivamente ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (C1) (143 mg, 0,163 mmol) y DIPEA (114 µl, 0,652 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS (se trató una alícuota con un gran exceso de MeOH). El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[2-[(2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-metoxicarbonil-tetrahidropiran-2-il]etil]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (21,3 mg, 0,0111 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1802,9+1804,9. Longitud de onda IR (cm^{-1}): 1755, 1672, 1226,1201,1130. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ ppm 13,3 (br s, 1H), 10,2 (s, 1H), 8,88 (d, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,14 (d, 1H), 7,88 (d, 2H), 7,73 (dd, 2H), 7,65 (d, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,62 (m, 1H), 7,54 (br s, 1H), 7,51 (dd, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,4 (t, 2H), 7,38 (m, 1H), 7,32 (t, 2H), 7,3 (dd, 2H), 7,2 (d, 1H), 7,2 (t, 2H), 7,15 (t, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,03 (t, 1H), 7,01 (dd, 1H), 6,72 (t, 1H), 6,22 (d, 1H), 6 (br s, 1H), 5,51 (dd, 1H), 5,34 (t, 1H), 5,3 (br s, 2H), 5,27/5,21 (m, 2H),

4,98 (t, 1H), 4,85 (t, 1H), 4,57/4,49 (m, 2H), 4,39 (m, 1H), 4,35 (d, 1H), 4,27 (m, 2H), 4,26 (m, 2H), 4,23 (m, 1H), 3,93 (t, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,71 (m, 1H), 3,64 (s, 3H), 3,4 (m, 4H), 3,29/2,51 (2dd, 2H), 3,13/2,94 (2m, 4H), 3 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,93 (br s, 3 H), 2,81 (m, 2H), 1,99/1,95 (3s, 9H), 1,98 (m, 1H), 1,84 (s, 3H), 1,77/1,59 (2m, 2H), 1,64 (2m, 2H), 1,41 (2m, 2H), 0,88/0,85 (2d, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, dmso-d6): δ ppm 158,1, 152,9, 135,6, 131,5, 131,4, 131,3, 131,2, 131, 128,9, 128,1, 127,5, 125,7, 120,9, 120,6, 120,4, 120,3, 117, 116, 116, 112,8, 112,2, 111,2, 75,6, 74,9, 73,8, 72,9, 71,4, 69,6, 69,4, 67,5, 66,1, 60,4, 58,3, 56, 55,4, 53,9, 52,8, 47,2, 46,2, 44,3, 39, 32,8, 32,8, 31, 29,6, 27,4, 27,2, 21,1, 19,5/18,7, 18,1. ^{19}F RMN (376 MHz, dmso-d6) δ ppm -74, -112.

Paso 9: Ácido (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[(5S$_a$)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]fenil]etil]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico

[459] A una solución de ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[2-[(2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-metoxicarbonil-tetrahidropiran-2-il]etil]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (21,3 mg, 0,0111 mmol) en metanol (6,0 ml) se agregó una solución de hidróxido de litio monohidratado (4,66 mg µl, 0,111 mmol) en agua (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 60 h y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener ácido (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[(5S$_a$)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]fenil]etil]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico (47,8 mg, 0,029 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1440,6+1442,6.

Paso 10: Ácido (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]etil]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico; 2,2,2-trifluoroacetato ***L21-C1***

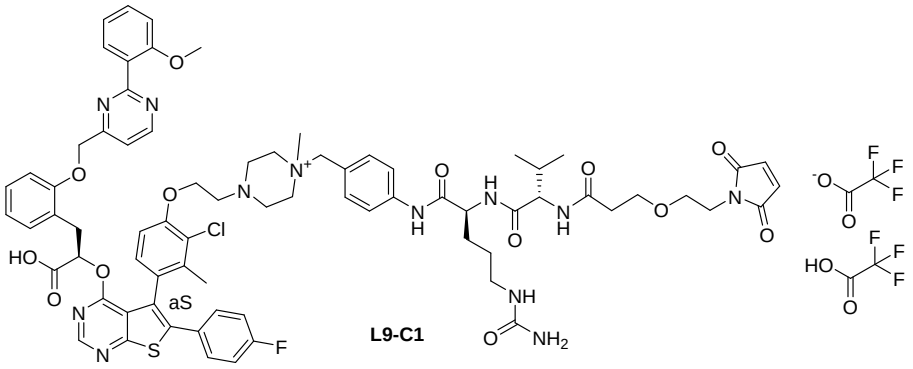
[460] A una solución de ácido (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[(5S$_a$)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-

metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]fenil]etil]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico (47,1 mg, 0,0282 mmol) en DMF (1,5 ml) se agregó sin inconvenientes la solución de 3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (adquirido de Broadpharm, 13,1 mg, 0,0423 mmol) en DMF (500 µl) y DIPEA (17,2 µl, 0,0988 mmol).

[461] La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener **L21-C1** (65 mg, 0,0310 mmol) como un polvo blanco. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1635,6093 (1635,6068) (medida/teórica).

Preparación de L9-C1:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético



Paso 1: N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(bromometil)fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[462] Se enfrió una solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(bromometil)fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (150 mg, 0,249 mmol) en THF (3,8 ml) a 0 °C. Se agregó por gotas, 0 °C, tribromofosfano (1 M en diclorometano) (374 µl, 0,249 mmol). La reacción se agitó durante 5 min a 0 °C y 1 h a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS (se trató una alícuota con un gran exceso de MeOH). La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (3 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de carbonato ácido de sodio (1x 6 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró. Se agregó DMF (10 ml) y se evaporó el acetato de etilo y el THF. La solución obtenida de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(bromometil)fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo se usa como tal en el paso siguiente. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+Na]+ = 686,5+688,6.

Paso 2: Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-

ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[463] A la solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(bromometil)fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (0,249 mmol) en DMF del paso anterior (paso 1) se agregó sucesivamente DMF (10 ml), ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (C1) (218 mg, 0,249 mmol) y DIPEA (130 µl, 0,748 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS (se trató una alícuota con un gran exceso de MeOH). La solución obtenida de ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico en DMF se usó como tal en el paso siguiente. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+Na]+ = 1458,7+1460,7.

Paso 3: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; bis ácido 2,2,2-trifluoroacético

[464] A la solución de ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (0,249 mmol) en dimetilformamida (3 ml) obtenida en el paso anterior (paso 2) se agregó piperidina (49,3 µl, 0,499 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; bis ácido 2,2,2-trifluoroacético (31,2 mg = 0,0213 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+Na]+ = 1236,7+1238,7.

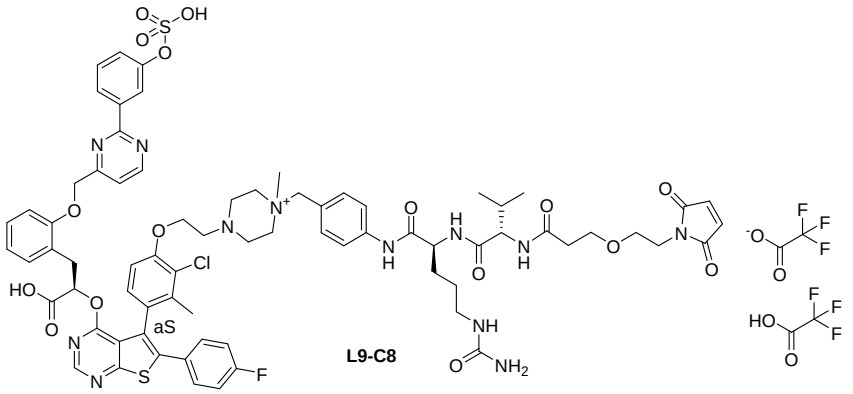
Paso 4: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-

metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético L9-C1

[465] A una solución de ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (31,2 mg, 0,0213 mmol) en DMF (1,5 ml) se agregó sin inconvenientes la solución de 3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (23,8 mg, 0,0768 mmol) en DMF (500 µl) y DIPEA (31,2 µl, 0,179 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener **L9-C1** (6 mg, 0,00303 mmol) como un polvo blanco. HR-ESI+: m/z [M]+ = 1431,5437 (1431,5433) (medida/teórica).

Preparación de L9-C8:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-sulfooxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético



Paso 1: Ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-sulfooxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[466] A la solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(bromometil)fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (0,0230 mmol; obtenida de acuerdo con el Paso 1 de la preparación de **L9-C1**) en DMF (3 ml) se agregó sucesivamente DMF (5 ml), amonio; sulfato de [3-[4-[[2-[(2R)-2-carboxi-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-

etil]fenoxi]metil]pirimidin-2-il]fenilo] **(C8)** (22 mg, 0,0230 mmol) y DIPEA (12 µl, 0,069 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS (se trató una alícuota con un gran exceso de MeOH). La solución obtenida de ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico en DMF se usó en el paso siguiente. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M-SO_3H]+ = 1444,8+1446,7.

Paso 2: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-sulfooxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; bis ácido 2,2,2-trifluoroacético

[467] A la solución de ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-sulfooxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (0,0230 mmol) en dimetilformamida (3 ml) obtenida en el paso anterior (paso 1) se agregó piperidina (9 µl, 0,0920 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener sulfato; de [3-[4-[[2-[(2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-2-carboxi-etil]fenoxi]metil]pirimidin-2-il]fenil]; bis ácido 2,2,2-trifluoroacético (10,0 mg = 0,00633 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M-SO_3]+ = 1224,12.

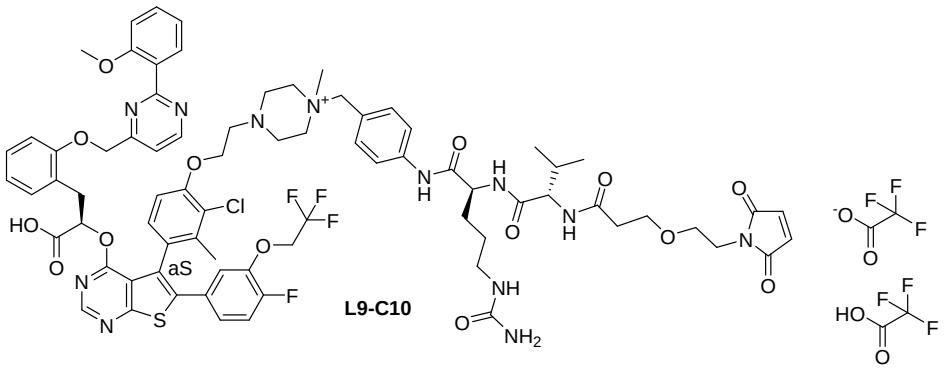
Paso 3: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-sulfooxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético

[468] A una solución de ácido (2R)-2-[(5S_a).5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-sulfooxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (10 mg, 0,00653 mmol) en DMF (1 ml) se agregó sin inconvenientes la solución de 3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (3,1 mg,

0,00980 mmol) en DMF (500 µl) y DIPEA (4 µl, 0,0229 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó por UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método TFA para obtener **L9-C8** (6 mg, 0,00401 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+Na]+ = 1519,5+1521,2, [M+H-SO3]+ 1417,7+1419,6. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1497,486 (1497,4845) (medida/teórica).

Preparación de L9-C10:

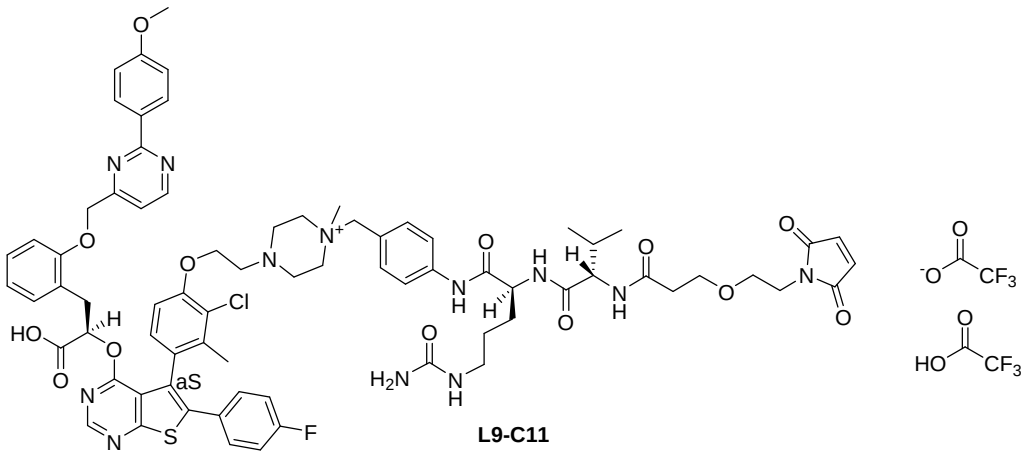
Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-[4-fluoro-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil]tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético



[469] El procedimiento es igual al proceso de síntesis de L9-C9, pero reemplazando el C9 usado en el Paso 3 por ácido (2R)-2-[((5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-[4-fluoro-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil]tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi]-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico C10 y usando el Método TFA para la purificación. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1529,543/1529,5413 (medida/teórica).

Preparación de L9-C11:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(4-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético.

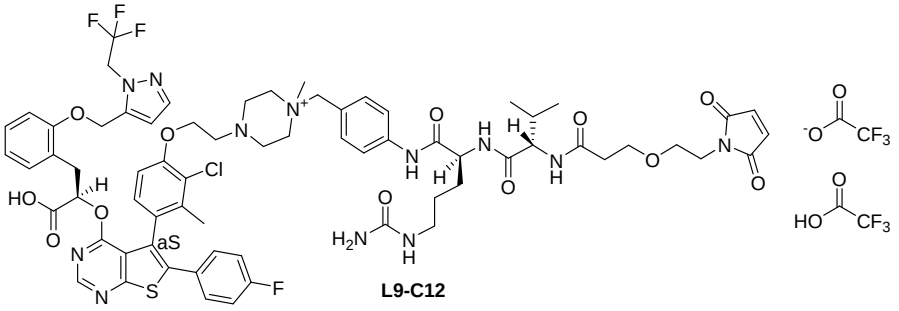


L9-C11

[470] El procedimiento es igual al proceso de síntesis de **L9-C9**, pero reemplazando el **C9** usado en el Paso 3 por el ácido (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(4-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico **C11** y usando el Método TFA para la purificación. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1431,5442/14,31,5433 (medida/teórica).

Preparación de L9-C12:

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2,2,2-trifluoroetil)pirazol-3-il]metoxi]fenil]propanoico; 2,2,2-trifluoroacetato; ácido 2,2,2-trifluoroacético



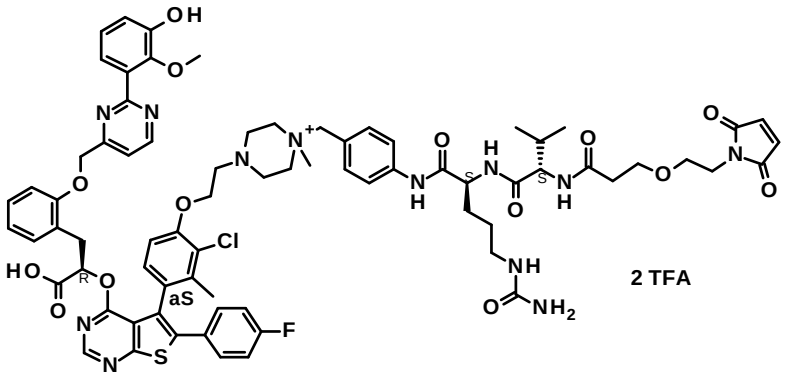
L9-C12

[471] El procedimiento es igual al proceso de síntesis de **L9-C9**, pero reemplazando el **C9** usado en el Paso 3 por el ácido (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-5-il]metoxi}fenil)propanoico **C12** usando el Método TFA para la purificación. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1395,5048/1395;5045 (medida/teórica).

Preparación de L9-C14:

Ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-

il]oxi-3-[2-[[2-(3-hidroxi-2-metoxi-fenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato



Paso 1: ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxi-3-sulfooxi-fenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[472] Se disolvieron 500 mg de (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,60 mmol, **WO2016/207216 Preparación 1**) y 202 mg de ácido (3-hidroxi-2-metoxi-fenil)borónico (1,20 mmol) en 9 mL de 1,4-dioxano, luego se agregaron 42 mg de $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (0,06 mmol), 588 mg de Cs_2CO_3 (1,80 mmol) y 9 mL de agua y la mezcla se agitó bajo atmósfera de N_2 a 70°C hasta completarse la conversión. Luego se diluyó con agua, se neutralizó con solución acuosa de HCl 2 M, y se extrajo con DCM. La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y el material filtrado se concentró bajo presión reducida. El éster crudo se purificó por cromatografía flash usando heptano, EtOAc y solución de NH_3 en MeOH 0,7 M como eluyentes para obtener una mezcla de diasteroisómeros. Luego se disolvió en 23,6 mL de piridina, se agregó 0,97 mL de SO_3×pirimidina (5,98 mmol) y la mezcla se agitó a 70°C hasta completarse la conversión. Luego se concentró bajo presión reducida, y se disolvió en 2 mL de dioxano, luego se agregaron 200 mg de KOH (3,57 mmol) y 1 mL de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta completarse la hidrólisis. Luego se neutralizó con solución acuosa de HCl 2 M, y se inyectó directamente en RP-HPLC preparativa, usando solución acuosa de NH_4HCO_3 25 mM y MeCN como eluyentes. El último diasteroisómero en eluir se recogió como producto del título. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 8,92 (d, 1H), 8,63 (s, 1H), 7,68 (dd, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,30 (dd, 2H), 7,29 (d, 1H), 7,20 (t, 2H), 7,16 (t, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,10 (t, 1H), 7,02 (d, 1H), 6,73 (t, 1H), 6,38 (d, 1H), 5,50 (dd, 1H), 5,29/5,23 (d+d, 2H), 4,21/4,16 (m+m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,25/2,55 (dd+dd, 2H), 3,18-2,75 (m, 10H), 2,65 (brs, 3H), 1,82 (s, 3H).HRMS calculado para $C_{47}H_{44}N_6O_{10}S_2ClF$: 970,2233; found 971,2297 (M+H).

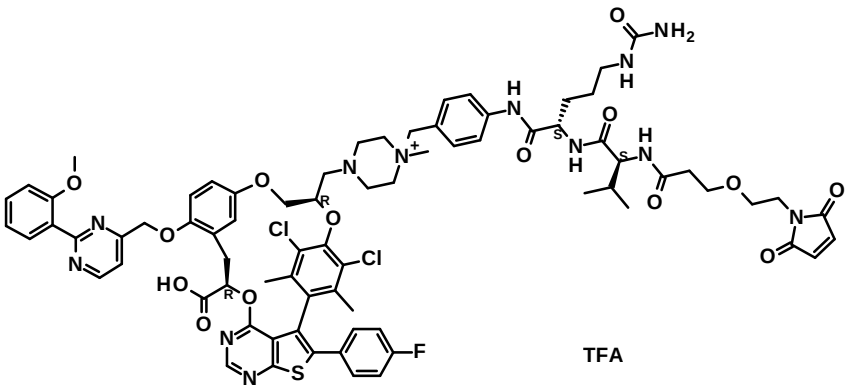
Paso 2: ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-

piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-hidroxi-2-metoxi-fenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato **L9-C14**

[473] A una solución de ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxi-3-sulfooxi-fenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (20,0 mg; 0,0206 mmol) en DMF (309 µL), se agregó en forma sucesiva (2S)-N-[4-(clorometil)fenil]-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanamida (17,5 mgL; 0,0206 mmol), DIPEA (10,8 µL; 0,0618 mmol) y TBAI (1 mg; 0,0027 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 70°C durante 18 horas. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa C_{18} en fase reversa depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge y usando el método TFA para dar **L9-C14** (10,5 mg; 0,00725 mmol) como un polvo blanco. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1448,5437 / 1448,5466 [medido/teórico].

Preparación de L9-P15:

Ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-20-[[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]metil]-3-(4-fluorofenil)-14-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]-24,25-dimetil-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28]octacosa-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-decaen-11-carboxílico;2,2,2-trifluoroacetato

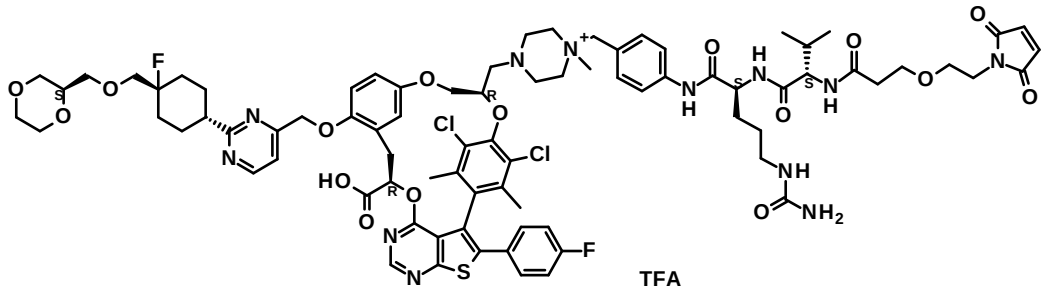


[474] A una solución de ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-3-(4-fluorofenil)-14-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]-24,25-dimetil-20-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28]octacosa-1(25),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22(26),23-decaen-11-carboxílico **P15** (obtenido de acuerdo con WO 2019/035914; 10,0 mg; 0,0105 mmol) en DMF (630 µL), se agregó en forma sucesiva (2S)-N-[4-(bromometil)fenil]-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanamida (10,0 mg; 0,0158 mmol), DIPEA (5,5 µL; 0,0315 mmol) y TBAI (0,5mg, 0,0010mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 hora. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa C_{18} en fase

reversa depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge y usando el método TFA para dar **L9-P15** (11,9 mg, 0,00733 mmol) como un polvo blanco. HR-ESI+: m/z [M-CF_3CO_2]+ = 1507,5183 / 1507,5155

Preparación de L9-P16:

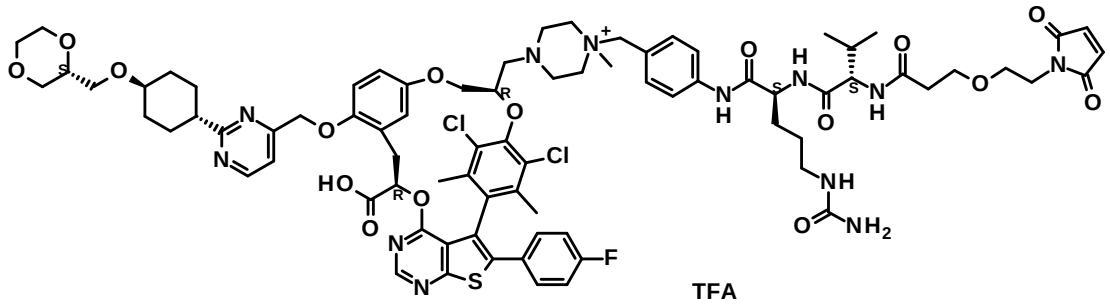
Ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-14-[[2-[4-[[(2S)-1,4-dioxan-2-il]metoximetil]-4-fluoro-ciclohexil]pirimidin-4-il]metoxi]-20-[[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]metil]-3-(4-fluorofenil)-24,25-dimetil-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28]octacosa-1(25),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22(26),23-decaen-11-carboxílico;2,2,2-trifluoroacetato



[475] A una solución de ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-14-[[2-[4-[[(2S)-1,4-dioxan-2-il]metoximetil]-4-fluoro-ciclohexil]pirimidin-4-il]metoxi]-3-(4-fluorofenil)-24,25-dimetil-20-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28]octacosa-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-decaen-11-carboxílico **P16** (obtenido de acuerdo con WO 2019/035911; 14,7 mg; 0,0137 mmol) en DMF (1 mL), se agregó en forma sucesiva (2S)-N-[4-(bromometil)fenil]-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanamida (13,1 mg; 0,0205 mmol) y DIPEA (7,1 µL; 0,0410 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge usando el método TFA para dar **L9-P16** (7,9 mg; 0,00420 mmol) como un polvo blanco. IR (cm^{-1}): 3327, 1768/1706, 1666, 1199/1118, 831/798. HR-ESI+: m/z [M-CF_3CO_2]+ = 1631,6071/1631,6054 [medido/teórico]

Preparación de L9-P17:

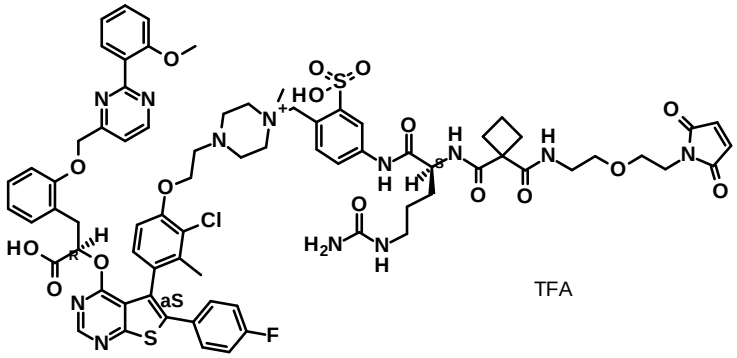
Ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-14-[[2-[4-[[(2S)-1,4-dioxan-2-il]metoxi]ciclohexil]pirimidin-4-il]metoxi]-20-[[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]metil]-3-(4-fluorofenil)-24,25-dimetil-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28]octacosa-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-decaen-11-carboxílico;2,2,2-trifluoroacetato



[476] A una solución de ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-14-[[2-[4-[[(2S)-1,4-dioxan-2-il]metoxi]ciclohexil]pirimidin-4-il]metoxi]-3-(4-fluorofenil)-24,25-dimetil-20-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28]octacosa-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-decaen-11-carboxílico **P17** (obtenido de acuerdo con WO 2019/035911; 14,5 mg; 0,0139 mmol) en DMF (1 mL), se agregó en forma sucesiva (2S)-N-[4-(bromometil)fenil]-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanamida (13,3 mg; 0,0208 mmol) y DIPEA (7,3 µL; 0,0417 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. El producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge y usando el método TFA para dar **L9-P17** (7,0 mg, 0,00437 mmol) como un polvo blanco. IR (cm^{-1}): 3700-2400, 1771/1738/1705, 1665, 1194/1128. HR-ESI+: m/z $[M\text{-}CF_3CO_2]+$ = 1599,6013 / 1599,5992. HR-ESI+: m/z $[M\text{-}CF_3CO_2+H]2+$ = 800,3049 / 800,3035 [medido/teórico]

Preparación de L25-P1:

2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]-5-[[(2S)-2-[[1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]ciclobutancarbonil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfonato;ácido 2,2,2-trifluoroacético



Paso 1: 1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]ciclobutancarboxilato de tert-butilo

[477] A una solución de ácido 1-tert-butoxicarbonilciclobutancarboxílico (58,6 mg; 0,293 mmol) en DCM (5,85 ml), se agregó en forma sucesiva 1-[2-(2-aminoetoxi)etil]pirrol-2,5-diona

(53,9 mg; 0,293 mmol), EDC (84,2 mg; 0,439 mmol), HOBt (59,3 mg; 0,439 mmol), y DIPEA (204 µL; 1,17 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. La mezcla de reacción se concentró hasta secar, se disolvió en DMF (1 ml) y la solución se purificó mediante columna X-Bridge C_{18} depositando directamente la mezcla de reacción en la columna y usando el método TFA para dar el compuesto del título (57,3 mg; 0,156 mmol). IR (cm^{-1}): 3390, 1697/1666. ^{1}H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ ppm 7,5 (t, 1H), 7,02 (s, 2H), 3,55/3,5 (2t, 4H), 3,38 (t, 2H), 3,17 (q, 2H), 2,33 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 1,38 (s, 9H). UPLC-MS: MS(ESI): m/z [M+Na]+ = 389,26 [M+H-tBu]+ = 311,22

Paso 2: ácido 1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil] ciclobutancarboxílico

[478] A una solución de 1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]ciclobutancarboxilato de tert-butilo (7 mg; 0,0191 mmol) en DCM (0,175 mL), se agregó TFA (51,2 µL; 0,668 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas, luego se concentró hasta secar para obtener el compuesto del título (5,8 mg; 0,0187 mmol) como un aceite incoloro. El producto crudo se usó en el siguiente paso. UPLC-MS: MS(ESI): m/z [M+H]+ = 311,35, [M+Na]+ = 333,37

Paso 3: 1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]ciclobutancarboxilato de (2,3,4,5,6-pentafluorofenilo)

[479] A una solución de ácido 1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]ciclobutancarboxílico (18,2 mg; 0,0587 mmol) en THF (3 mL), se agregó en forma sucesiva 2,3,4,5,6-pentafluorofenol (13,0 mg; 0,0704 mmol) y DCC (14,5 mg; 0,0704 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. La mezcla de reacción resultó una suspensión, el precipitado se retiró por filtración y se lavó con THF (1 ml) para dar una solución de 1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]ciclobutancarboxilato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) en THF. La solución de producto crudo se usó en el paso 9. UPLC-MS: MS(ESI): m/z [M+H]+ = 477,28, [M+Na]+ = 499,23

Paso 4: (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de metilo

[480] A una solución de ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **P1** (5,0 g; 5,712 mmol) en DCM (25 mL) y metanol (25 mL), se agregó por goteo una solución de diazometil(trimetil)silano (2 M en Et_2O) (5,712 mL; 11,42 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y el progreso

de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. Una vez completa la reacción, se detuvo mediante la adición lenta de ácido acético hasta que el color amarillo se tornó rojo y se concentró hasta secar para dar la mezcla cruda. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de metanol en DCM) para dar el compuesto del título (4,52 g; 5,082 mmol). UPLC-MS: MS(ESI): m/z [M+H]+ = 889,27+891,6, [M+Na]+ = 911,31, [M+2H]2+= 445,59. IR (cm^{-1}): 1753, 1238/1053. ^{1}H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ ppm 8,6 (s, 1H), 8,45 (d, 1H), 7,6 (d, 1H), 7,52 (dd, 1H), 7,45 (td, 1H), 7,3 (m, 3H), 7,25-7,1 (m, 5H), 7,02 (t+d, 2H), 6,78 (t, 1H), 6,31 (dd, 1H), 5,52 (dd, 1H), 5,25 (AB, 2H), 4,2 (m, 2H), 3,78/3,65 (2s, 6H), 3,2/2,58 (2dd, 2H), 2,71 (t, 2H), 2,5/2,3 (2ml, 8H), 2,12 (s, 3H), 1,88 (s, 3H).

Paso 5: ácido 5-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfónico

[481] A una solución de Fmoc-Cit-OH (2,224 g; 5,596 mmol) en DCM (22,2 mL) y metanol (22,2 mL), se agregó en forma sucesiva 5-amino-2-(hidroximetil)bencensulfonato de sodio (1,89 mg; 8,395 mmol) y EEDQ (2,768 g; 11,19 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 25 horas, luego se concentró hasta secar. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de metanol en DCM) para dar el compuesto del título (2,81 g; 4,823 mmol) como un polvo blanco. IR (cm^{-1}): 3700-3000, 1660(large), 1180. ^{1}H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ ppm 10,02 (s, 1H), 7,88 (m, 3H), 7,76 (2t, 2H), 7,7 (dd, 1H), 7,61 (d, 1H), 5,99 (t, 1H), 5,38 (m, 2H), 5,03 (t, 1H), 4,72 (d, 2H), 4,3-4,2 (m, 3H), 4,15 (m, 1H), 3,06-2,90 (m, 2H), 1,75-1,30 (m, 4H). UPLC-MS: MS(ESI): m/z [M+H]+ = 583,42, [M+Na]+ = 565,31.

Paso 6: ácido 2-(clorometil)-5-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfónico

[482] A una solución de ácido 5-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfónico (543,6 mg; 0,933 mmol) en NMP (5 mL) se agregó a temperatura ambiente una solución de $SOCl_2$ (68,1 µL; 0,933 mmol) en NMP (200 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. Para lograr una conversión compelta, la adición de $SOCl_2$ (68 µL) debió realizarse 7 veces más. El exceso de $SOCl_2$ se evaporó bajo vacío, y el residuo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en una columna Oasis usando el método TFA para dar el compuesto del título (362 mg; 0,512 mmol) como un sólido blanco. UPLC-MS: MS(ESI): m/z [M+H]+ = 601,19+603,23 [M+Na]+ = 622,93

Paso 7: 2-[[4-[2-[2-cloro-4-[6-(4-fluorofenil)-4-[(1R)-2-metoxi-1-[[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]metil]-2-oxo-etoxi]tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]-5-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfonato

[483] A una solución de ácido 2-(clorometil)-5-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfónico (195,6 mg; 0,277 mmol) del paso 6 en solución en NMP (10 mL), se agregó en forma sucesiva (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de metilo (123 mg; 0,138 mmol) del paso 4, DIPEA (385 µL, 2,213 mmol) y TBAI (10 mg, 0,027 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 70°C durante 12 horas y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. El producto crudo en solución en NMP se usó directamente en el siguiente paso. UPLC-MS: MS(ESI): m/z [M+H]+ = 1231,12+1233,45, [M+2H]2+ = 616,34+617,37

Paso 8: 5-[[(2S)-2-amino-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]bencensulfonato ;ácido 2,2,2-trifluoroacético

[484] A la solución precedente de 2-[[4-[2-[2-cloro-4-[6-(4-fluorofenil)-4-[(1R)-2-metoxi-1-[[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]metil]-2-oxo-etoxi]tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]-5-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfonato en NMP, se agregó una solución de hidróxido de litio monohidrato (82,2 mg; 1,106 mmol) en agua (4 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. La solución de producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en una columna X-Bridge usando el método TFA para dar el compuesto del título (45,6 mg; 0,0374 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS(ESI): m/z [M+H]+ = 1217,46, [M+Na]+ = 1241,16, [M+2H]2+ = 609,61

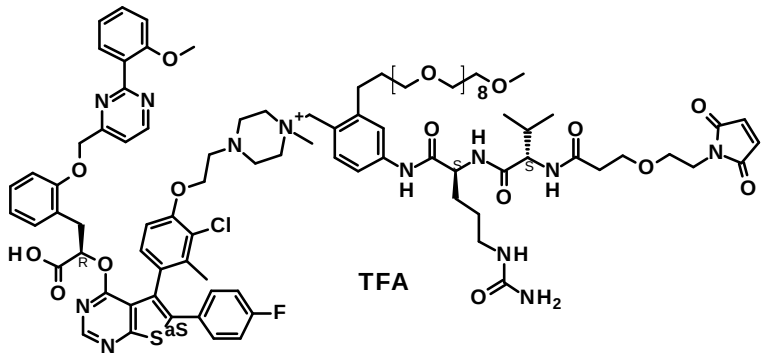
Paso 9: 2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]-5-[[(2S)-2-[[1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]ciclobutancarbonil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfonato **L25-P1**

[485] A una solución de 5-[[(2S)-2-amino-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-carboxi-2-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]etoxi]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-2-cloro-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]bencensulfonato (22,6 mg; 0,0186 mmol) en DMF (1,4 mL), se agregó en forma sucesiva una solución en THF de 1-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]ciclobutancarboxilato de (2,3,4,5,6-pentafluorofenilo) (del paso 3) (26,8 mg; 0,0562 mmol) y DIPEA (12,9 µL; 0,0742 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en una columna X-Bridge y usando el método TFA para dar **L25-P1** (7,5 mg; 0,0050 mmol) como un polvo blanco. IR (cm^{-1}): 3321, 1705/1624, 1666, 1581, 1180/1124, 833/798/756/719/696. ^{1}H RMN (400/500

MHz, dmso-d6) δ ppm 10,4 (s), 8,88 (d, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,13 (df, 1H), 7,92 (dd, 1H), 7,78 (d), 7,74 (t), 7,63 (d, 1H), 7,52 (dd, 1H), 7,47 (d, 1H), 7,46 (t, 1H), 7,38 (d, 1H), 7,3 (dd, 2H), 7,23 (d, 1H), 7,21 (t, 2H), 7,16 (t, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,03 (t, 1H), 7,01 (d, 1H), 7 (s, 2H), 6,73 (t, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,99 (m), 5,55 (sl), 5,5 (dd, 1H), 5,25 (AB, 2H), 5,1 (sl, 2H), 4,37 (m, 1H), 4,33 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,7 (m, 10H), 3,55 (m, 2H), 3,5 (m, 2H), 3,42 (m, 2H), 3,28/2,52 (2dd, 2H), 3,21 (m, 2H), 3,04 (sl, 3H), 2,97 (m, 2H), 2,4 (m, 4H), 1,85 (w, 3H), 1,74/1,62 (2m, 2H), 1,73 (m, 2H), 1,43/1,35 (2m, 2H). ^{13}C RMN (400/500 MHz, dmso-d6) δ ppm 157,5, 152,8, 135,4, 134,9, 131,5, 131,4, 131,4, 131,2, 131,1, 128,7, 121, 120,6, 119,2, 119,2, 116,3, 116, 112,8, 112,2, 111, 74, 69,5, 68,9, 67,4, 66,6, 56,2, 55,3/46,5, 54,1, 45,7, 39,4, 39,2, 37,2, 32,9, 29,7, 29,7, 27,3, 18, 16. ^{19}F RMN (400/500 MHz, dmso-d6) δ ppm -74,6, -112,2. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1509,4867 / 1509,4851 [medido/teórico]

Preparación de L26-P1:

(2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propil]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato;2,2,2-trifluoroacetato



Paso 1: 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]prop-1-ino

[486] A una solución de 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etanol (1,95 g; 6,50 mmol) en THF (25,0 mL), se agregó a 0°C hidruro de sodio (260,0 mg; 6,57 mmol). Luego de 5 minutos, se agregó una solución de 3-bromoprop-1-ino en tolueno (1,42 mL; 13,14 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 hora y 2 días a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. Luego, la mezcla de reacción se filtró y el material filtrado se concentró hasta secar, y se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente DCM en metanol) para dar el compuesto del título (1,74 g; 4,12 mmol) como un aceite

incoloro. ^{1}H RMN ($CDCl_3$): 2,43 (*t*, 1H, *J* = 2,4 Hz), 3,37 (*s*, 3H), 3,53-3,55 (*m*, 2H), 3,64-3,70 (*m*, 30H), 4,20 (*d*, 2H, *J* = 2,4 Hz).

Paso 2: N-[(1S)-1-[[4-[[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[487] A una solución de [[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-anilina (10,0 g; 27,52 mmol) en metanol (70 mL) y DCM (140 mL), se agregó en forma sucesiva Fmoc-Cit-OH (12,0 g; 30,28 mmol) y EEDQ (8,17 g; 33,03 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 14 horas a temperatura ambiente. Una vez completa la reacción, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando DCM / metanol (100/0 to 88/12) como eluyente para dar el compuesto del título (17,09 g; 21,97 mmol) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (DMSO): δ 0,09 (*s*, 6H), 0,91 (*s*, 9H), 1,38-1,48 (*m*, 2H), 1,59-1,68 (*m*, 2H), 2,93-3,05 (*m*, 2H), 4,06-4,15 (*m*, 2H), 4,20-4,29 (*m*, 3H), 4,56 (*s*, 2H), 5,41 (*s*, 2H), 5,98 (*t*, 1H, *J* = 5,5 Hz), 7,30-7,43 (*m*, 5H), 7,55 (*dd*, 1H, *J* = 8,8, 2,1 Hz), 7,69 (*d*, 1H, *J* = 7,8 Hz), 7,74 (*dd*, 1H, *J* = 7,2, 3,4 Hz), 7,89 (*d*, 1H, *J* = 7,5 Hz), 8,25 (*d*, 1H, *J* = 1,5 Hz), 10,12 (*s*, 1H).

Paso 3: (2S)-2-amino-N-[4-[[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-fenil]-5-ureido-pentanamida

[488] A una solución de N-[(1S)-1-[[4-[[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (17,08 g; 23,00 mmol) en THF (120 mL), se agregó dimetilamina 2M en THF (44,5 mL; 89,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente. Después de concentrar hasta secar, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna en C_{18} usando agua / acetonitrilo (98/02 a 0/100) como eluyente para dar compuesto el compuesto del título (5,47 g; 10,50 mmol) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (DMSO): δ 0,0 (*s*, 6H), 0,81 (*s*, 9H), 1,27-1,38 (*m*, 3H), 1,47-1,53 (*m*, 1H), 2,83-2,89 (*m*, 2H), 3,16-3,19 (*m*, 1H), 4,46 (*s*, 2H), 5,26 (*s*, 2H), 5,82 (*t*, 1H, *J* = 5,6 Hz), 7,24 (*d*, 1H, *J* = 8,5 Hz), 7,50 (*dd*, 1H, *J* = 8,3, 2,0 Hz), 8,17 (*d*, 1H, *J* = 2,0 Hz).

Paso 4: N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-[[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[489] A una solución de (2S)-2-amino-N-[4-[[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-fenil]-5-ureido-pentanamida (3,00 g; 5,76 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (240 mL), se agregó en forma sucesiva Fmoc-Val-Osu (8,65 g; 8,65 mmol) y DIPEA (1,90 mL; 11,53 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de un embudo sinterizado y el sólido recuperado se lavó con 2-metiltetrahidrofurano (2 x 250 mL), luego se secó bajo alto vacío para dar el compuesto del título (3,57 g; 4,24 mmol) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (DMSO): δ 0,10 (s, 6H), 0,83-0,95 (*m*, 15H), 1,27-1,52 (*m*, 2H), 1,52-1,75 (*m*, 2H), 1,93-2,07 (*m*, 1H), 2,88-3,09 (*m*, 2H), 3,93 (*t*, 1H, *J* = 8,0 Hz), 4,17-4,49 (*m*, 4H), 4,56 (*s*, 2H), 5,40 (*s*, 2H), 5,96 (*t*, 1H, *J* = 5,6 Hz), 7,27-7,37 (*m*, 3H), 7,37-

7,48 (*m*, 3H), 7,54 (*d*, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,74 (*t*, 2H, *J* = 7,2 Hz), 7,88 (*d*, 2H, *J* = 7,6 Hz), 8,13 (*d*, 1H, *J* = 7,6 Hz), 8,22 (*s*, 1H), 10,11 (*s*, 1H).

Paso 5 : N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-[[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]prop-1-inil]fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[490] A una solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-[[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-iodo-fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (1,23 g; 1,46 mmol) en dimetilformamida (15,40 mL), se agregaron en forma sucesiva 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]prop-1-ino (930,0 mg; 2,20 mmol) y DIPEA (2,47 mL; 14,92 mmol). Después de 3 purgas con argón, se agregó $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (220 mg; 0,307 mmol) y CuI (68,0 mg; 0,36 mmol) y la mezcla de reacción se purgó con argón 3 veces. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. La mezcla se diluyó con acetato de isopropilo (200 mL) y se lavó con salmuera (3 x 150 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta secar. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa C18 en fase reversa depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge usando el método neutro para dar el compuesto del título (790,0 mg; 0,70 mmol) como una goma color amarillo pálido. ^{1}H RMN (DMSO): δ 0,08 (*s*, 6H), 0,85-0,90 (*m*, 15H), 1,36-1,45 (*m*, 2H), 1,58-1,71 (*m*, 2H), 1,97-2,00 (*m*, 1H), 2,93-3,03 (*m*, 2H), 3,23 (*s*, 3H), 3,40-3,43 (*m*, 2H), 3,49-3,52 (*m*, 25H), 3,56-3,58 (*m*, 2H), 3,63-3,66 (*m*, 2H), 3,93 (*dd*, 1H, *J* = 8,9, 6,9 Hz), 4,23-4,32 (*m*, 3H), 4,37-4,43 (*m*, 3H), 4,75 (*s*, 2H), 5,39 (*s*, 2H), 5,97 (*t*, 1H, *J* = 6,1 Hz), 7,30-7,43 (*m*, 6H), 7,51-7,54 (*m*, 1H), 7,72-7,78 (*m*, 3H), 7,88 (*d*, 2H *J* = 7,5 Hz), 8,12 (*d*, 2H, *J* = 7,4 Hz), 10,10 (*s*, 1H).

Paso 6: N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(hidroximetil)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]prop-1-inil]fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[491] A una solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-[[tert-butil(dimetil)silil]oximetil]-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]prop-1-inil]fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (452 mg; 0,40 mmol) en tetrahidrofurano (0,60 mL) y agua (0,90 mL), se agregó ácido acético (4,17 mL; 72,78 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 22 horas a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. Después de concentrar hasta secar, el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa C18 en fase reversa depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge usando el método neutro para dar el compuesto del título (327 mg, 0,32 mmol) como una goma blanca. ^{1}H RMN (DMSO): δ 0,87 (*dd*, 6H, *J* = 11,7, 6,8 Hz), 1,36-1,45 (*m*, 2H), 1,58-1,71 (*m*, 2H), 1,97-2,00 (*m*, 1H), 2,93-3,02 (*m*, 2H), 3,23 (*s*, 3H), 3,31 (*s*, 5H), 3,40-3,43 (*m*, 2H), 3,48-3,53 (*m*, 21H), 3,54-3,64 (*m*,

6H), 3,91-3,95 (*m*, 1H), 4,23-4,42 (*m*, 4H), 4,56 (*d*, 2H, *J* = 5,5 Hz), 5,19 (*t*, 1H, *J* = 5,6 Hz), 5,39 (*s*, 2H), 5,96 (*t*, 1H, *J* = 5,8 Hz), 7,30-7,34 (*m*, 2H), 7,39-7,43 (*m*, 4H), 7,50-7,52 (*m*, 1H), 7,72-7,76 (*s*, 3H), 7,88 (*d*, 1H *J* = 7,5 Hz), 8,12 (*d*, 2H, *J* = 7,4 Hz), 10,06 (*s*, 1H).

Paso 7: N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(hidroximetil)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propil]fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[492] A una solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(hidroximetil)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]prop-1-inil]fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (327,0 mg; 0,32 mmol) en THF (3,7 mL), se agregó ácido acético (0,37 mL). Después de 3 purgas con argón, se agregó Pt/C 5% (195 mg) y después de otras 3 purgas con argón, la mezcla de reacción se colocó bajo atmósfera de hidrógeno, se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. La mezcla se filtró a través de PTFE y el material filtrado se concentró hasta secar, luego se trituró en diclorometano/pentano (mezcla 1/4, 50 mL). El precipitado se recuperó mediante filtración para dar, después de secar, el compuesto del título (130 mg; 0,13 mmol) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (DMSO): δ 0,85-0,89 (*m*, 6H), 1,23-1,46 (*m*, 2H), 1,56-1,76 (*m*, 4H), 1,97-2,02 (*m*, 1H), 2,56-2,60 (*m*, 2H), 2,91-3,04 (*m*, 2H), 3,23 (*s*, 3H), 3,38-3,43 (*m*, 4H), 3,48-3,54 (*m*, 30H), 3,93 (*dd*, 1H, *J* = 8,9, 6,9 Hz), 4,21-4,31 (*m*, 3H), 4,38-4,41 (*m*, 1H), 4,45 (*d*, 2H, *J* = 5,3 Hz), 4,94 (*t*, 1H, *J* = 5,3 Hz), 5,37 (s, 2H), 5,95 (*t*, 1H, *J* = 5,8 Hz), 7,25 (*d*, 1H, *J* = 8,3 Hz), 7,30-7,34 (*m*, 2H), 7,39-7,43 (*s*, 5H), 7,72-7,76 (*m*, 2H), 7,88 (*d*, 1H *J* = 7,5 Hz), 8,06 (*d*, 2H, *J* = 7,6 Hz), 9,88 (*s*, 1H). UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1026,52

Paso 8: N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(bromometil)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propil]fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[493] A una solución de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(hidroximetil)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propil]fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (60 mg; 0,0584 mmol) en THF (6,6 mL), se agregó por goteo a 0°C PBr_3 (1M solución en THF) (0,0877 mL; 0,0877 mmol). La solución luego se agitó 3 horas a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS luego de la adición de una alícuota de morfolina para hacer reaccionar el compuesto de bromo esperado. La reacción se procesó con una solución acuosa saturada de NH_4Cl (50 µL). Luego de 5 minutos la mezcla se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se lavó con THF (2 ml) para dar el compuesto de bromo del título como una solución en THF, que se usó cruda en el siguiente paso. El análisis UPLC-MS se realizó después de la adición de metanol y morfolina.

Paso 9: ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propil]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato

[494] A una solución en THF de N-[(1S)-1-[[(1S)-1-[[4-(bromometil)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] propil]fenil]carbamoil]-4-ureido-butil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo del paso previo (0,0584 mmol), se agregó en forma sucesiva DMF (1,5 mL), ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **P1** (46,1 mg; 0,0527 mmol) y DIPEA (0,173 mL; 0,995 mmol). La mezcla de reacción se agitó 20 horas a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. La mezcla cruda que contenía el compuesto del título esperado y el compuesto desprotegido de Fmoc (esperado en el paso 10) se usó en el siguiente paso de desprotección. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M-Fmoc+H+H]+ = 1660,99

Paso 10: ácido (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propil]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato;ácido 2,2,2-trifluoroacético

[495] A la mezcla cruda obtenida en el paso previo en DMF se agregó piperidina (11,6 µL; 0,117 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. Una vez completa la reacción, el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa C_{18} en fase reversa depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge usando el método TFA para dar el compuesto del título (29,2 mg; 0,0155 mmol) como un polvo blanco. IR: 3600-2300, 1672, 1602, 1541+1516. HR-ESI+: m/z [M-CF_3COO]+ = 1660,7574 (1660,7575 teórico)

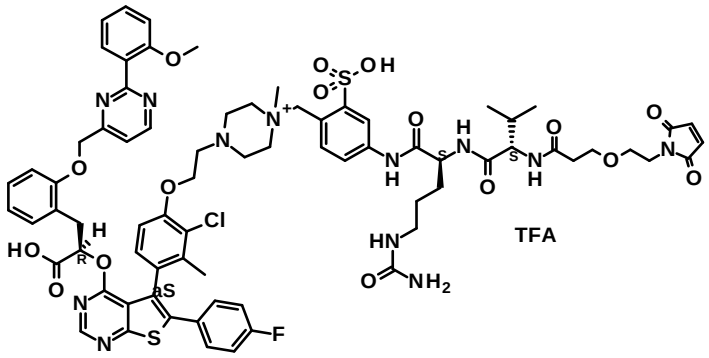
Paso 11: (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propil]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato;2,2,2-trifluoroacetato **L26-P1**

[496] A una solución de ácido (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-

metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propil]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato;ácido 2,2,2-trifluoroacético (42,5 mg; 0,0225 mmol) en DMF (1,28 mL), se agregó en forma sucesiva una solución de 3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (Brodpharm 21854) (7,71 mg; 0,0247 mmol) y DIPEA (19,6 µL; 0,112 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas y el progreso de la reacción se monitoreó mediante UPLC-MS. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa C_{18} en fase reversa depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge y usando el método TFA para dar **L26-P1** (28 mg; 0,0151 mmol) como un polvo blanco. HR-ESI+: m/z [M-CF_3COO]+ = 1855,8105 (1855,8106 teórico)

Preparación de L27-P1:

Ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-3-metil-5-ureido-pentanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



Paso 1: 2-(clorometil)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfonato

[497] Se disolvió ácido 5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfónico (300 mg; 0,4263 mmol) en NMP anhidra (6 mL) a temperatura ambiente. En paralelo, se preparó una solución de $SOCl_2$ (206 µL) en NMP (6 mL). A la reacción, se agregó, 6 veces a lo largo de un período de 75 minutos, una solución de 900 µL de la solución de $SOCl_2$. Después de la última adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en una columna Oasis usando el método TFA para dar el compuesto del título (138 mg; 0,1971 mmol) como un polvo blanco. ^{1}H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ ppm 10,15+8,1+7,42+6,0 (s+2d+m, 4H), 7,9 (m,HH), 7,75 (m, 3H), 7,42+7,31 (2m, 5H), 5,23 (s, 2H), 4,4 (m, 1H), 4,3-4,2 (m, 3H), 3,95 (dd, 1H), 3,0 (m, 2H),

2,0 (m, 1H), 1,7 + 1,6 (2m, 2H), 1,48 + 1,37 (2m, 2H), 0,88 (2d, 6H). HR-ESI+ : m/z [M+H]+ = 700,2199 / 700,2202 [medido/teórico]

Paso 2: ácido 5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[[4-[2-[2-cloro-4-[6-(4-fluorofenil)-4-[(1R)-2-metoxi-1-[[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]metil]-2-oxo-etoxi]tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]bencensulfónico

[498] A una solución de 2-(clorometil)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfonato (82,4 mg; 0,1177 mmol) en NMP anhidra (2,5 mL), se agregó a temperatura ambiente DIEA (94 µL; 0,540 mmol) seguida por (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de metilo (60 mg; 0,067 mmol) y TBAI (12,4 mg; 0,034 mmol). La reacción se agitó a 80°C durante 4 horas y durante la noche a temperatura ambiente. Luego se agregó nuevamente 2-(clorometil)-5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]bencensulfonato (14 mg; 0,017 mmol) seguido por TBAI (17 µL; 0,0337 mmol) y la reacción se agitó a 80°C durante 4 horas y luego durante la noche a temperatura ambiente. El paso de desprotección de Fmoc se realizó agregando DEA (53 µL; 0,515 mmol) a la reacción y agitando a temperatura ambiente durante la noche. La purificación se realizó por inyección directa de la mezcla en Oasis eluyendo con un gradiente de una solución A: $H_2O/CH_3CN/NH_4HCO_3$ (1960 ml/40/3,16 g) a una solución B: $CH_3CN/H_2O/NH_4HCO_3$ (1600 ml/400 ml/3,16 g) para dar el compuesto del título (17 mg; 0,009 mmol). UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M]+ = 1329

Paso 3 : ácido (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

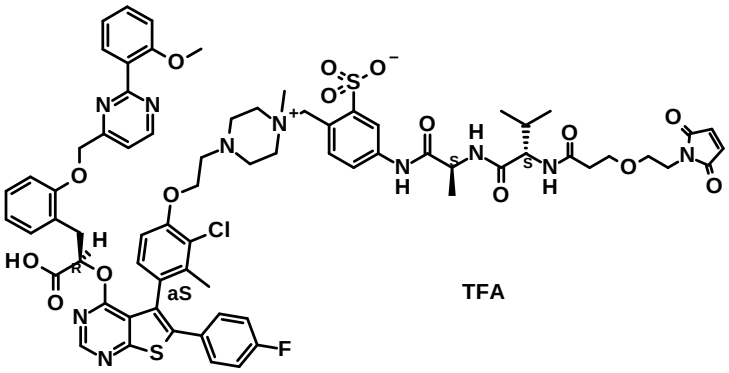
[499] A una mezcla de ácido 5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-[[4-[2-[2-cloro-4-[6-(4-fluorofenil)-4-[(1R)-2-metoxi-1-[[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]metil]-2-oxo-etoxi]tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metil-fenoxi]etil]-1-metil-piperazin-1-io-1-il]metil]bencensulfónico (18 mg; 0,014 mmol) en dioxano/agua (1 mL/1 mL) se agregó $LiOH{\cdot}H_2O$ (2,3 mg; 0,054 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución se ajustó a pH 6-7 mediante la adición de HCl 1N y el dioxano se evaporó bajo presión reducida. La purificación se realizó por inyección directa de la mezcla en Oasis eluyendo con un gradiente de una solución A: $H_2O/CH_3CN/NH_4HCO_3$ (1960 ml/40/3,16 g) a una solución B: $CH_3CN/H_2O/NH_4HCO_3$ (1600 ml/400 ml/3,16 g) para dar el compuesto del título (11mg; 0,008 mmol).

Paso 4: ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-3-metil-5-ureido-pentanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **L27-P1**

[500] A una solución de ácido (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (10,5 mg; 0,007 mmol) en DMF (0,4 mL), se agregó 3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (5,7 mg; 0,018 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución se purificó mediante columna X-Bridge C_{18} depositando directamente la mezcla de reacción en la columna y usando el método TFA para dar **L27-P1** (10 mg; 0,006 mmol). HR-ESI+: [M+H]+ 1511,5018 / 1511,5002 [medido/teórico]

Preparación de L28-P1:

Ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato



Paso 1: N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(clorometil)-3-metil-anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

[501] A una solución de 5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfonato (504,1 mg; 0,816 mmol) en NMP (5 mL), se agregó 6 veces a lo largo de un período de 75 minutos una solución de $SOCl_2$ (60 µL; 0,816 mmol) en NMP (500µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en una columna Oasis usando el método TFA para dar (337 mg) como una mezcla de 70% el compuesto del título (384 mmol) y 30% del material de partida (170 mmol) como

un polvo blanco. IR (cm^{-1}): 3600 a 2400, 1688+1648, 1599, 1518, 1022. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 614,17+616,18 (Cl)

Paso 2: ácido (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-metil-fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato

[502] A una solución de (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de metilo (152 mg; 0,171 mmol) en NMP (4,5 ml), se agregó en forma sucesiva N-[(1S)-1-[[(1S)-2-[4-(clorometil)-3-metil-anilino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamoil]-2-metil-propil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (150 mg; 0,171 mmol), DIPEA (238 µL; 1,37 mmol) y TBAI (76 mg; 0,205mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 28 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Luego se agregó una solución de $LiOH.H_2O$ (13,7 mg, 0,342 mmol) en agua (500 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa C_{18} en fase reversa depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge y usando el método TFA para dar el compuesto del título (40 mg; 0,0325 mmol) como un polvo blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M]+ = 1230,61+1232,61 (Cl)

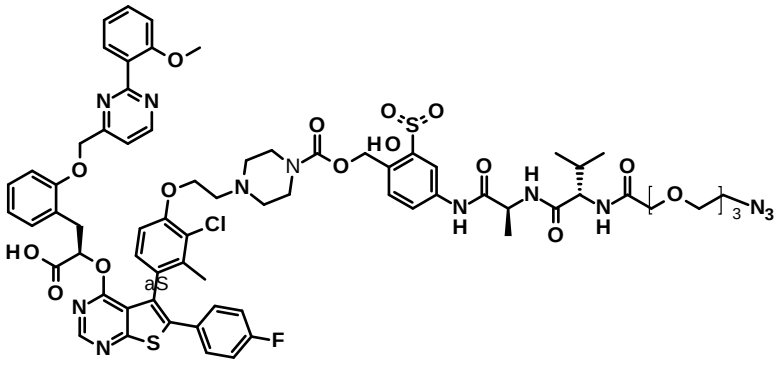
Paso 3: ácido (2R)-2-[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato **L28-P1**

[503] A una solución de ácido (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-metil-fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;2,2,2-trifluoroacetato (6,0 mg; 0,0049 mmol) en solución en DMF (180 µL), se agregó en forma sucesiva 3-[2-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]etilcarbamoil]oxetan-3-carboxilato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (2,3 mg; 0,0073 mmol) y DIPEA (3,0 µL; 0,017 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se monitoreó mediante UPLC-MS. El producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge usando el método TFA para dar **L28-P1** (2,9 mg; 0,0020 mmol) como un polvo blanco. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1425,4534/ 1425,4527 [medido/teórico]

Preparación de L29-C3:

Ácido (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-(2-azidoetoxi)acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-

cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



Paso 1:; 5-[[(2S)-2-(tert-butoxicarbonilamino)propanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfonato de sodio

[504] A una solución de Boc-L-Ala-OH (588 mg; 3,11 mmol) en DMF (38,6 mL), se agregó en forma sucesiva HATU (1,77 g; 4,67 mmol), 5-amino-2-(hidroximetil)bencensulfonato de sodio (771 mg; 3,42 mmol) y DIPEA (1,29 mL; 7,78 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente, luego se concentró hasta secar y se evaporó conjuntamente con agua para dar la mezcla de reacción cruda. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando acetato de etilo/metanol 95:5 a 80:20 como eluyente para dar el compuesto del título (1,17 g; 2,95 mmol) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (DMSO): δ 1,24 (*s*, 9H), 1,38 (*m*, 3H), 4,05-1,44 (*m*, 1H), 4,73 (*d*, 2H, *J* = 4,8 Hz), 5,04 (*t*, 1H, *J* = 5,6 Hz); 6,97-7,02 (*m*, 1H), 7,33 (*d*, 1H, *J* = 8 Hz), 7,65-7,70 (*m*, 1H), 7,83 (*s*, 1H), 9,91 (*s*, 1H).

Paso 2: clorhidrato de 5-[[(2S)-2-aminopropanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfonato

[505] Se suspendió 5-[[(2S)-2-(tert-butoxicarbonilamino) propanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfonato de sodio (1,17 g; 2,95 mmol; 1 eq.) en una solución de HCl en dioxano 4N (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, luego se concentró hasta secar para dar la mezcla cruda (982 mg; 2,95 mmol) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (DMSO): δ 1,45 (*d*, 3H, *J* = 5,6 Hz), 3,91-4,0 (*m*, 1H), 4,76 (*s*, 2H), 7,41 (*d*, 1H, *J* = 7,6 Hz), 7,66 (*d*, 1H, *J* = 7,6 Hz), 7,85 (*s*, 1H), 8,17 (*s*, 2H), 10,44 (*s*, 1H).

Paso 3: 5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfonato

[506] A una solución de clorhidrato de 5-[[(2S)-2-aminopropanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfonato (981 mg; 2,95 mmol) en DMF (34,5 mL) se agregaron Fmoc-L-Val-Osu (1,29 g; 2,95 mmol; 1 eq.) y DIPEA (975 µL; 5,9 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, luego se concentró hasta secar y se evaporó conjuntamente con agua para dar la mezcla cruda. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando acetato de etilo /metanol 95:5 a 80:20

como eluyente para dar el compuesto del título (1,28 g; 2,072 mmol) como un aceite incoloro. ^{1}H RMN (DMSO): δ 0,80-0,92 (*m*, 6H), 1,30 (*d*, 3H, *J* = 6,4 Hz), 2,02-2,10 (*m*, 1H), 4,17-4,31 (*m*, 3H), 4,37-4,44 (*m*, 1H), 4,73 (*d*, 2H, *J* = 5,6 Hz), 5,04 (*t*, 1H, *J* = 6,4 Hz), 7,28-7,36 (*m*, 3H), 7,37-7,47 (*m*, 3H), 7,66 (*d*, 1H, *J* = 8,4 Hz), 7,71-7,77 (*m*, 2H), 7,83-7,85 (*m*, 1H), 7,88 (*d*, 2H, *J* = 7,6 Hz), 8,14 (*d*, 1H, *J* = 6,4 Hz), 9,99 (*s*, 1H).

Paso 4: ácido 5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]bencensulfónico

[507] A una suspensión de 5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-(hidroximetil)bencensulfonato (1,28 g; 2,07 mmol) en THF (65 mL), se agregó piridina (875 µL; 10,8 mmol), seguida por cloroformiato de 4-nitrofenilo (1,09 g; 5,41 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se agregó más cloroformiato de 4-nitrofenilo (1,09 g; 5,41 mmol; 2,5 eq.). Luego de 5 horas de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se concentró hasta secar, luego se purificó mediante cromatografía en columna en C_{18} usando agua/acetonitrilo 90/10 a 0/100 como eluyente en 30 minutos. El acetonitrilo de los tubos combinados se retiró, y el resto se liofilizó para dar el compuesto del título (650 mg; 0,83 mmol) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (DMSO): δ 0,88 (*m*, 6H), 1,31 (*d*, 3H, *J* = 4,8 Hz), 1,97-2,03 (*m*, 1H), 3,92 (*t*, 1H, *J* = 6,8 Hz), 4,23 (*s*, 2H), 4,24-4,34 (*m*, 1H), 4,42 (*t*, 1H *J* = 5,6 Hz), 5,69 (*s*, 2H), 7,30-7,48 (*m*, 6H), 7,62 (*d*, 2H, *J* = 8 Hz), 7,72-7,76 (*m*, 3H), 7,89 (*d*, 2H, *J* = 6,4 Hz), 7,94 (*s*, 1H), 8,18 (*d*, 1H, *J* = 5,6 Hz), 8,33 (*d*, 2H, *J* = 7,6 Hz), 10,11 (s, 1H). ^{13}C RMN (DMSO): δ 18,01, 18,26, 19,21, 30,4, 46,66, 49,05, 59,91, 65,67, 67,82, 117,7, 119,1, 120,06, 122,66, 125,37, 126,33, 127,05, 127,62, 128,0, 138,06, 140,67, 143,77, 143,86, 145,1, 146,23, 151,96, 155,47, 156,12, 171,0, 171,15. LCMS (2-100 ACN/H_2O+0,05% TFA): 90,41 % Tr = 12,7 min. Modo positivo 578,41 detectado. Modo negativo 759,17 detectado

Paso 5: ácido (2S)-2-[[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]metil]-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[508] A una suspensión de ácido (2S)-2-[[5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]metil]-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico;ácido 2,2,2-trifluoroacético (178,4 mg; 0,183 mmol) en DMF (1,5 mL), se agregó en forma sucesiva ácido 5-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-[(4-nitrofenoxi)carboniloximetil]
bencensulfónico (150 mg; 0,192 mmol) y DIPEA (91 µL; 0,549 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente durante 15 minutos. El producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en la columna X-Bridge usando el método

NH_4HCO_3 para dar el compuesto del título (176 mg, 0,118 mmol) como un sólido blanco. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1482,15+1484,56(Cl)

Paso 6: ácido (2S)-2-[[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]metil]-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[509] A una solución de ácido (2S)-2-[[5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]metil]-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (176 mg; 0,118 mmol) en DMF (1,0 mL), se agregó piperidina (24,17 µL; 0,237 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en una columna X-Bridge usando el método NH_4HCO_3 para dar el compuesto del título (102 mg; 0,0809 mmol) como un polvo blanco. IR (cm^{-1}): 3620-2680, 1683, 1235. UPLC-MS: MS (ESI) m/z [M+H]+ = 1260,37+1262,37(Cl). ^{1}H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ ppm 10,20 (m, NH), 8,90 (m, 2H), 8,90 (m, 1H), 8,60 (m, NH), 8,60 (s, 1H), 7,90 (m, 1H), 7,78 (m, 1H), 7,70 (d, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,48 (t, 1H), 7,45 (d, 1H), 7,3/7,2 (m, 4H), 7,20 (m, 1H), 7,20 (d, 1H), 7,15 (t, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,05 (t, 1H), 7,00 (d, 1H), 6,7 (t, 1H), 6,2 (d, 1H), 5,48 (s, 2H), 5,50 (m, 1H), 5,23 (s, 2H), 4,50 (m, 1H), 4,25 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,4 (m, 4H), 3,40 (m, 1H), 3,35 (m, 1H) 2,80 (m, 2H), 2,5 (m, 4H), 2,50 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 1,80 (s, 3H), 1,30 (d, 3H), 0,90 (dd, 6H)

Paso 7: 2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato de (2,3,4,5,6-pentafluorofenilo)

[510] A una solución de ácido 2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acético (74 mg; 0,317 mmol) en THF (500 µL) se agregó sucesivamente 2,3,4,5,6-pentafluorofenol (70 mg; 0,380 mmol) en solución en THF (500 µL) y DCC (78,5 mg; 0,380 mmol) en solución en THF (500 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La suspensión cruda se filtró a través de una almohadilla de algodón en una pipeta pasteur y la solución se usó sin tratamiento posterior en el paso 8.

Paso 8: ácido (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[[2-(2-azidoetoxi)acetil]amino]-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico **L29-C3**

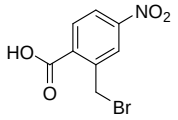
[511] A una solución de ácido (2S)-2-[[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-amino-3-metil-butanoil]amino]propanoil]amino]-2-sulfo-fenil]metoxicarbonil]piperazin-1-il]etoxi]-3-cloro-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]metil]-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (100 mg; 0,0793 mmol) en DMF (500 µL), se agregó sucesivamente

la solución de 2-[2-[2-(2-azidoetoxi)etoxi]etoxi]acetato de (2,3,4,5,6-pentafluorofenilo) en THF del paso 7 (0,317 mmol) y DIPEA (39,3 µL; 0,238 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El producto crudo se purificó depositando directamente la mezcla de reacción en una columna X-Bridge usando el método NH_4HCO_3 para dar **L29-C3** (43 mg, 0,0291 mmol) como un polvo blanco. IR (cm^{-1}): 3257, 2102, 1663, 1236/1082, 834/756. ^{1}H RMN (400 MHz, dmso-d6) δ ppm 10,03 (s, NH), 8,87 (d, 1H), 8,59 (sNC, 1H), 8,35 (d, NH), 7,89 (df, 1H), 7,69 (dd, 1H), 7,66 (m, 1H), 7,53 (d, 1H), 7,45 (t, 1H), 7,36 (d, 1H), 7,29 (dd, 2H), 7,21 (d, 1H), 7,20 (t, 2H), 7,19 (d, 1H), 7,14 (d, 1H), 7,13 (m, 1H), 7,09 (m, NH), 7,03 (t, 1H), 7,00 (d, 1H), 6,72 (t, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,48 (dNC, 1H), 5,44 (s, 2H), 5,23(AB, 2H), 4,40 (t, 1H), 4,30 (dd, 1H), 4,24 (m, 2H), 3,94 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,58 (m, 10H), 3,38 (m, 4H), 3,36 (t, 2H), 3,30 (NC, 1H), 2,75 (t, 2H), 2,50 (m, 4H), 2,50 (m, 1H), 2,00 (m, 1H), 1,51 (s, 3H), 1,30 (d, 3H), 0,88/0,82 (2d, 6H). ^{13}C RMN (100/126 MHz, dmso-d6) δ ppm 158,2, 131,6, 131,1, 130,9, 130,9, 130,9, 130,9, 128,3, 126,7, 120,7, 120,4, 119,3, 117,9, 116,2, 112,5, 112,1, 110,8, 70,2, 70,2; 69,6, 67,7, 64,0, 56,7, 56,5, 55,8, 53,2, 50,4, 49,2, 43,8, 31,7, 19,7, 18,7, 18,4, 17,8. ^{19}F RMN (376/470 MHz, dmso-d6) δ ppm -112,0. HR-ESI+: m/z [M+H]+ = 1475,4643/1475,4638; [2M+H+Ca]3+ = 996,6289/996,6273; [M+2H]2+ = 738,2378/738,2355; [M+H+Na]2+ = 749,2255/749,2265.

Ejemplo 2. Síntesis y caracterización de conectores, conectores-cargas útiles y precursores de los mismos adicionales.

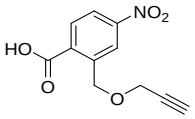
[512] Los ejemplos de conectores, conectores-cargas útiles y precursores de los mismos se sintetizaron usando los ejemplos de métodos que se describe en este ejemplo.

Síntesis de ácido 2-(bromometil)-4-nitrobenzoico



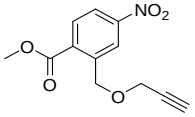
[513] A una solución agitada de ácido 2-metil-4-nitrobenzoico (300 g, 1,5371 mol) en CCl_4 (3000 ml) se agregó NBS (300,93 g, 1,6908 mol) y AIBN (37,86 g, 0,2305 mol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se monitoreó mediante un análisis por TLC. La mezcla de reacción se diluyó con una solución saturada de $NaHCO_3$ (2 l) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 2 l). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron bajo presión reducida. El compuesto crudo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando 2-3% de acetato de etilo en éter de petróleo como eluyente y se obtuvo ácido 2-(bromometil)-4-nitrobenzoico. $_1$H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,35 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,20 (q, J = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 8,12 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,97 (s, 2H), 4,00 (s, 3H).

Síntesis de ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico



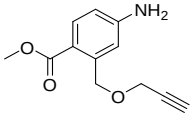
[514] A la mezcla de ácido 2-(bromometil)-4-nitrobenzoico (250 g, 0,9122 mol) en ACN (5000 ml) se agregó prop-2-in-1-ol (255,68 g, 265,50 ml, 4,5609 mol, d=0,963 g/ml) y Cs_2CO_3 (743,03 g, 2,2805 mol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a 80 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite, se lavó con acetato de etilo (2 l). El filtrado se concentró bajo presión reducida. Al compuesto crudo obtenido se agregó una solución saturada de $NaHCO_3$ (1 l) y la capa acuosa se acidificó hasta pH 2 usando HCl 2 N (2 l). Después de una filtración en vacío con secado se obtuvo ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico. $_1$H RMN (400 MHz, DMSO): δ 13,61 (brs, 1H), 8,37 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 8,23 (dd, J = 2,4, 8,4 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 4,37 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,52 (t, J = 2,4 Hz, 1H)

Síntesis de 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo



[515] A una solución agitada de ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico (130 g, 0,5527 mol) en MeOH (1300 ml) se agregó lentamente $SOCl_2$ (526,08 g, 320,78 ml, 4,4219 mol, d = 1,64 g/ml) a 0 °C. La reacción se agitó a 70 °C durante 4 h. El solvente de reacción se evaporó bajo presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en acetato de etilo (1000 ml) y se lavó con $NaHCO_3$ saturado (600 ml), agua (500 ml) y solución salina (500 ml). La capa orgánica separada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó bajo presión reducida para obtener 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo. $_1$H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,56 (t, J = 0,8 Hz, 1H), 8,18 – 8,09 (m, 2H), 5,03 (s, 2H), 4,35 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 2,49 (t, J = 2,4 Hz, 1H).

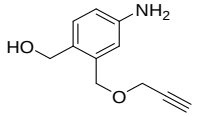
Síntesis de 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo



[516] A una solución de 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo (110 g, 0,4414 mol) en una mezcla de EtOH (1100 ml) y H_2O (550 ml) se agregó polvo de Fe (197,21 g, 3,5310 mol) y NH_4Cl (188,88 g, 3,5310 mol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a 80 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite® y se lavó con acetato de etilo (2 l). El filtrado se concentró bajo presión reducida hasta la mitad del volumen. A este residuo, se agregó acetato de etilo (1,5 l) y se separaron las dos capas y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 l). Las

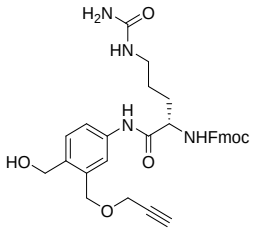
capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para obtener el producto crudo. La purificación mediante cromatografía en columna de SiO_2 (15-20% de acetato de etilo en éter de petróleo) dio 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo. $_1$H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,67 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,78 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 6,48 (q, J = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 4,79 (s, 2H), 4,25 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,70 (d, J = 4,0 Hz, 3H), 3,42 (t, J = 2,4 Hz, 1H).

Síntesis de (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol



[517] A una solución agitada de THF (1000 ml) se agregó lentamente LiAlH4 (1 M en THF) (21,23 g, 798,2 mmol, 798,2 ml) a 0 °C. Se agregó lentamente una solución de 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de (70 g, 319,3 mmol) en THF (800 ml) a 0 °C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, luego se agregó agua (22 ml) muy lentamente, seguido por la adición de 20% de NaOH (22 ml) y agua (66 ml). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. Se agregó sulfato de sodio anhidro para absorber el exceso de agua. La mezcla se filtró a través de Celite®. La torta de filtrado se lavó con acetato de etilo (1000 ml) y 10% de MeOH/DCM (500 ml). El filtrado se concentró bajo presión reducida. El compuesto crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna con SiO_2 (35-40% de acetato de etilo en éter de petróleo como eluyente) para dar (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol. $_1$H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6,98 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,56 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,43 (dd, J = 2,4, 8,0 Hz, 1H), 4,98 (s, 2H), 4,64 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 4,47 (s, 2H), 4,34 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 4,15 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,46 (t, J = 2,4 Hz, 1H).

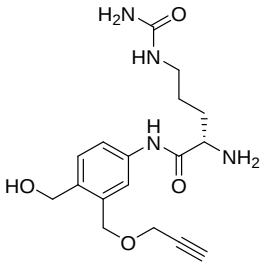
Síntesis de (S)-(1-((4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[518] A una solución de (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol (1,92 g, 10,04 mmoles, 1,0 equiv.), (S)-(1-amino-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (3,99 g, 10,04 mmoles, 1,0 equiv.) y hexafluorofosfato de (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (4,20 g, 11,04 mmoles, 1,1 equiv.) en DMF (10 ml) se agregó N,N-diisopropiletilamina (2,62 ml, 15,06 mmoles, 1,5 equiv.). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla se vertió en agua

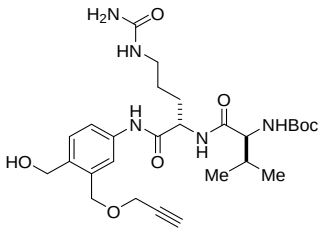
(200 ml). Los sólidos resultantes se filtraron, se lavaron con agua y se secaron bajo vacío, y se obtuvo (S)-(1-((4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo. LCMS: MH+ = 571,5; Rt = 0,93 min (método ácido de 2 min).

Síntesis de (S)-2-amino-N-(4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)-5-ureidopentanamida



[519] A (S)-(1-((4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (6,08 g, 10,65 mmoles, 1,0 equiv.) se agregó dimetilamina (2 M en THF, 21,31 ml, 42,62 mmoles, 4 equiv.). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, la solución de sobrenadante se decantó del residuo tipo goma que se había formado. El residuo se trituró con éter (3 x 50 ml) y los sólidos resultantes se filtraron, se lavaron con éter y se secaron bajo vacío. Se obtuvo (S)-2-amino-N-(4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)-5-ureidopentanamida. LCMS: MH+ 349,3; Rt = 0,42 min (método ácido de 2 min).

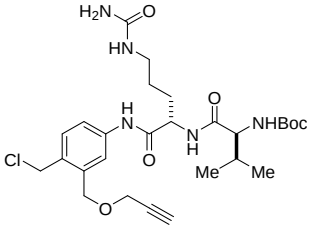
Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-((4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de ter-butilo



[520] A una solución de (S)-2-amino-N-(4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)-5-ureidopentanamida (3,50 g, 10,04 mmoles, 1,0 equiv.), (ter-butoxicarbonil)-L-valina (2,62 g, 12,05 mmol, 1,2 equiv.) y (1-hexafluorofosfato de [bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (4,58 g, 12,05 mmoles, 1,2 equiv.) en DMF (10 ml) se agregó N,N-diisopropiletilamina (3,50 ml, 20,08 mmoles, 2,0 equiv). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla se vertió en agua (200 ml) y la suspensión resultante se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron bajo vacío. Después de una purificación mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-20% de metanol/diclorometano), se obtuvo ((S)-1-(((S)-1-((4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-

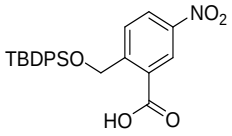
il)carbamato de ter-butilo. $_1$H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 10,00 (s, 1H), 7,96 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,55 (dq, J = 4,9, 2,2 Hz, 2H, arilo), 7,32 (d, J = 8,9 Hz, 1H, arilo), 6,76 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 5,95 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 5,38 (s, 2H), 5,01 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,54 (s, 2H), 4,45 (dd, J = 25,2, 5,3 Hz, 3H), 4,20 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,83 (dd, J = 8,9, 6,7 Hz, 1H), 3,49 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 2,97 (dh, J = 26,0, 6,5 Hz, 2H), 1,96 (h, J = 6,6 Hz, 1H), 1,74 - 1,50 (m, 2H), 1,39 (m, 11H), 0,84 (dd, J = 16,2, 6,7 Hz, 6H). LCMS: Mna+ 570,5; Rt = 0,79 min (método ácido de 2 min).

Síntesis de ((S)-1-(((S)-1-((4-(clorometil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de ter-butilo



[521] A una solución de ((S)-1-(((S)-1-((4-(hidroximetil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de ter-butilo (2,00 gramos, 3,65 mmol, 1,0 equiv.) en acetonitrilo (13,3 ml) a 0 ^{o}C se agregó cloruro de tionilo (0,53 ml, 7,30 mmol, 2,0 equiv). Después de agitar en el baño de hielo durante una hora la solución se diluyó con agua (40 ml) y el precipitado blanco resultante se recolectó por filtración, se secó al aire y se secó bajo alto vacío para obtener ((S)-1-(((S)-1-((4-(clorometil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de ter-butilo. LCMS: Mna+ 588,5; Rt = 2,17 min (método ácido de 5 min).

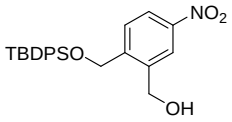
Síntesis de ácido 2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobenzoico



[522] A una solución de 6-nitroisobenzofuran-1(3H)-ona (90 g, 502,43 mmol, 1,00 eq) en MeOH (1000 ml) se agregó KOH (28,19 g, 502,43 mmol, 1,00 eq) en H_2O (150 ml). La mezcla marrón se agitó a 25 °C durante 1,5 h. La mezcla marrón se concentró bajo presión reducida para dar un residuo y se disolvió en DCM (2000 ml). A la mezcla se agregó a TBDPSCl (296,91 g, 1,08 mol, 277,49 ml, 2,15 eq) e IMIDAZOL (171,03 g, 2,51 mol, 5,00 eq) y se agitó a 25 °C durante 12 h. La mezcla se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 1/0, 1/1) y se obtuvo ácido 2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobenzoico como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, METANOL-d4): δ ppm 1,13 (s, 9 H) 5,26 (s, 2 H) 7,34 - 7,48 (m, 6 H) 7,68 (br d, J = 8 Hz, 4 H) 8,24 (br d, J = 8 Hz, 1 H) 8,46 (br d, J = 8 Hz, 1 H) 8,74 (s, 1

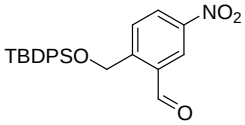
H).

Síntesis de (2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrofenil)metanol



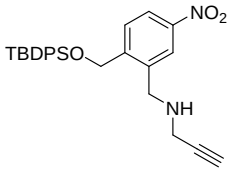
[523] A una mezcla de ácido 2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobenzoico (41 g, 94,14 mmol, 1 eq) en THF (205 ml) se agregó BH_3. THF (1 M, 470,68 ml, 5 eq). La mezcla amarilla se agitó a 60 °C durante 2 h. A la mezcla se agregó MeOH (400 ml) y se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. Después de la adición de H_2O (200 ml) y DCM(300 ml), se extrajo con DCM (3 ×200 ml), se lavó con salina (300 ml), se secó sobre anhidro $MgSO_4$, se filtró y se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 1/0, 1/1). Se obtuvo (2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrofenil)metanol como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, METANOL-d4) δ ppm 1,10 (s, 9 H) 4,58 (s, 2 H) 4,89 (s, 2 H) 7,32 - 7,51 (m, 6 H) 7,68 (dd, J = 8, 1,38 Hz, 4 H) 7,76 (d, J = 8 Hz, 1 H) 8,15 (dd, J = 8 2,26 Hz, 1 H) 8,30 (d, J = 2 Hz, 1 H).

Síntesis de 2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobenzaldehído



[524] A una solución de (2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrofenil)metanol (34 g, 80,65 mmol, 1 eq) en DCM (450 ml) se agregó MnO_2 (56,09 g, 645,22 mmol, 8 eq). La mezcla negra se agitó a 25 °C durante 36 h. La mezcla se agregó MeOH (400 ml), y se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. Después de la adición de H_2O (200 ml) y DCM (300 ml), se extrajo con DCM (3 ×200 ml), se lavó con salina (300 ml), se secó sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (CH_2Cl_2=100%). Se obtuvo 2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobenzaldehído como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d): δ ppm 1,14 (s, 9 H) 5,26 (s, 2 H) 7,34 - 7,53 (m, 6 H) 7,60 - 7,73 (m, 4 H) 8,13 (d, J = 8Hz, 1 H) 8,48 (dd, J = 8, 2,51 Hz, 1 H) 8,67 (d, J = 2 Hz, 1 H) 10,16 (s, 1 H).

Síntesis de N-(2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)prop-2-in-1-amina

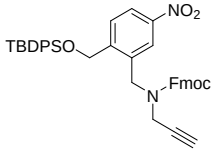


[525] A una solución de 2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobenzaldehído (12,6 g, 30,03 mmol, 1 eq) en DCM (130 ml) se agregó prop-2-in-1-amina (4,14 g, 75,08 mmol, 4,81 ml, 2,5

eq) y $MgSO_4$ (36,15 g, 300,33 mmol, 10 eq), luego la mezcla en suspensión se agitó a 25 °C durante 24 h. Se tomó un poco de solución de reacción y se trató con $NaBH_4$, luego la TLC mostró que se había formado un nuevo punto. La mezcla de reacción se filtró y se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. Se obtuvo (E)-N-[[2-[[ter-butil(difenil)silil]oximetil]-5-nitro-fenil]metil]prop-2-in-1-imina como un sólido amarillo. $_1$H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d): δ ppm 1,11 (s, 9 H) 2,48 (t, J = 2,38 Hz, 1 H) 4,52 (t, J = 2,13 Hz, 2 H) 5,09 (s, 2 H) 7,35 - 7,49 (m, 6 H) 7,63 - 7,72 (m, 4 H) 7,79 (d, J = 8,53 Hz, 1 H) 8,25 (dd, J = 8,53, 2,51 Hz, 1 H) 8,68 (d, J = 2,26 Hz, 1 H) 8,84 (t, J = 1,88 Hz, 1 H).

[526] Se disolvió (E)-N-[[2-[[ter-butil(difenil)silil]oximetil]-5-nitro-fenil]metil]prop-2-in-1-imina (12 g, 26,28 mmol, 1 eq) en MeOH (100 ml) y THF (50 ml), luego se agregó $NaBH_4$ (1,49 g, 39,42 mmol, 1,5 eq) y la mezcla amarilla se agitó a -20 °C durante 2 h. La LCMS mostró que se había detectado el compuesto deseado. La mezcla de reacción se detuvo mediante adición de MeOH (200 ml) a -20 °C, y luego se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. El residuo se disolvió con EtOAc (500 ml) lavado con salina (150 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (eluyente de un gradiente de 0-10% de acetato de etilo/éter de petróleo). Se obtuvo N-(2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)prop-2-in-1-amina como un aceite amarillo pálido. $_1$H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d): δ ppm 1,12 (s, 9 H) 2,13 (t, J = 2,38 Hz, 1 H) 3,33 (d, J = 2,51 Hz, 2 H) 3,80 (s, 2 H) 4,93 (s, 2 H) 7,36 - 7,49 (m, 6 H) 7,69 (dd, J = 7,91, 1,38 Hz, 4 H) 7,77 (d, J = 8,53 Hz, 1 H) 8,16 (dd, J = 8,41, 2,38 Hz, 1 H) 8,24 (d, J = 2,26 Hz, 1 H).

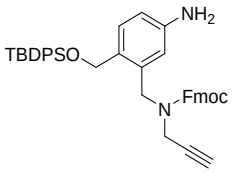
Síntesis de (2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[527] A una solución de N-(2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)prop-2-in-1-amina (9 g, 19,62 mmol, 1 eq) y FMOC-OSU (7,28 g, 21,59 mmol, 1,1 eq) en dioxano (90 ml) se agregó $NaHCO_3$ saturado (90 ml) y la suspensión blanca se agitó a 20 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (150 ml) y se extrajo con EtOAc (150 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina (200 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (eluyente de 0-30% de acetato de etilo/éter de petróleo). Se obtuvo (2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (7,7 g, 11,08 mmol, 56,48% de rendimiento, 98% de pureza) como un sólido blanco. $_1$H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 1,12 (s, 9 H) 2,17 (br d, J =

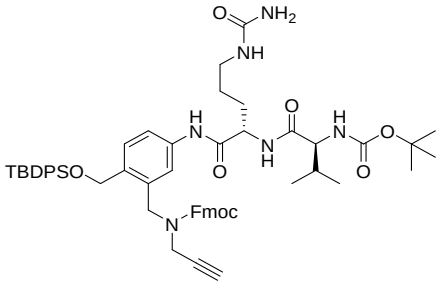
14,31 Hz, 1 H) 3,87 - 4,97 (m, 9 H) 6,98 - 8,28 (m, 21 H).

Síntesis de (5-amino-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[528] A una solución enfriada en baño de hielo de (2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (5,0 g, 7,34 mmoles, 1,0 equiv.) en 10% de AcOH/CH_2Cl_2 (100 ml) se agregó Zn (7,20 g, 110 mmoles, 15 equiv.). Se retiró el baño de hielo y la mezcla resultante se agitó durante 2 horas en cuyo momento se filtró a través de un lecho de Celite®. Los volátiles se eliminaron en vacío y el residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con $NaHCO_3$ (sat.), NaCl (sat.), se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, se concentró y después de la cromatografía ISCO SiO_2 (0-75% de EtOAc/heptanos) se obtuvo (5-amino-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo. LCMS: MH+ = 651,6; Rt = 3,77 min (método ácido de 5 min).

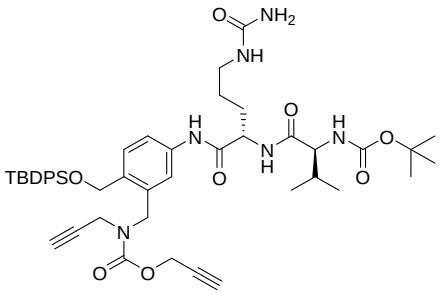
Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[529] A (5-amino-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (2,99 g, 4,59 mmoles, 1,0 equiv) y ácido (S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanoico (1,72 g, 4,59 mmoles, 1,0 equiv.) en CH_2Cl_2 (40 ml) se agregó 2-etoxiquinolin-1(2H)-carboxilato de etilo (2,27 g, 9,18 mmoles, 2,0 equiv.). Después de agitar durante 10 min, se agregó MeOH (1 ml) y la solución se volvió homogénea. La reacción se agitó durante 16 h, los volátiles se eliminaron en vacío y después de purificación mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-15% de MeOH/CH2Cl2) se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo. LCMS: MH+ = 1008,8; Rt = 3,77 min (método ácido de 5 min).

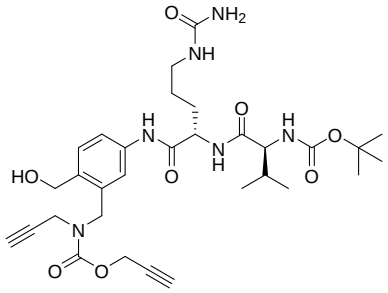
Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato

de prop-2-in-1-ilo



[530] A (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (1,60 g, 1,588 mmoles, 1,0 equiv.) se agregó dimetilamina 2 M en MeOH (30 ml, 60 mmol, 37 equiv.) y THF (10 ml). Después de dejar asentar por 3 h, los volátiles se eliminaron en vacío y el residuo se trituró con Et_2O para eliminar los productos secundarios de desprotección de FMOC. Al sólido resultante se agregó CH_2Cl_2 (16 ml) y piridina (4 ml) y a la solución heterogénea se agregó cloroformiato de propargilo (155 ul, 1,588 mmol, 1,0 equiv.). Después de agitar durante 30 minutos se agregó cloroformiato de propargilo adicional (155 ul, 1,588 mmol, 1,0 equiv.). Después de agitar durante otros 20 min, se agregó MeOH (1 ml) para neutralizar el cloroformiato remanente y los volátiles se eliminaron en vacío. Tras purificación mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-15% de MeOH/CH_2Cl_2) se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo. LCMS: MH+ = 867,8; Rt = 3,40 min (método ácido de 5 min).

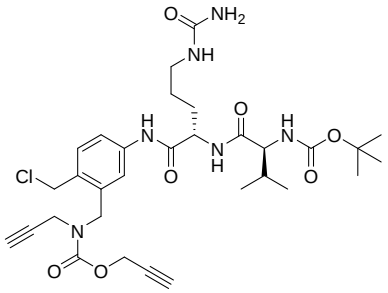
Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo



[531] A una solución de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo (984 mg, 1,135 mmoles, 1,0 equiv.) en THF (7,5 ml) se agregó 1,0 M fluoruro de tetrabutilamonio en THF (2,27 ml, 2,27 mmoles, 2,0 equiv.). Después de dejar asentar durante 6 h, los volátiles se eliminaron en vacío, el residuo se purificó mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-40% de MeOH/CH2Cl2) y se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-

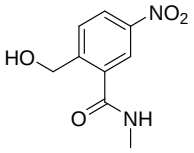
(hidroximetil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo. LCMS: MH+ = 629,6; Rt = 1,74 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo



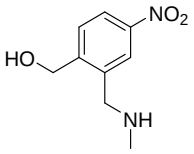
[532] A (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo (205 mg, 0,326 mmoles, 1,0 equiv.) en CH_2Cl_2 (10 ml) se agregó piridina (158 ul, 1,96 mmoles, 5 equiv.). La mezcla heterogénea se enfrió a 0 ºC en baño de hielo y cloruro de tionilo (71 ul, 0,98 mmoles, 3 equiv.). Después de agitar en el baño de hielo durante 3 horas, la reacción se purificó directamente mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-30% de MeOH/CH_2Cl_2) y se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo; LCMS: MH+ = 647,6; Rt = 2,54 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de 2-(hidroximetil)-N-metil-5-nitrobenzamida



[533] A una suspensión agitada de 6-nitroisobenzofuran-1(3H)-ona (500 g, 2,79 mol) en MeOH (1500 ml) se agregó $MeNH_2$ (3,00 kg, 29,94 mol, 600 ml, 31,0% de pureza) a 25 °C y se agitó durante 1 h. El sólido se filtró y se lavó con agua dos veces (600 ml) y se secó bajo alto vacío para dar un residuo. El producto 2-(hidroximetil)-N-metil-5-nitrobenzamida se obtuvo como un sólido blanco. LCMS: Rt = 0,537 min, MS m/z = 193,2. $_1$H RMN: 400 MHz DMSO δ 8,57 (br d, J = 4,4 Hz, 1H), 8,31 (dd, J = 2,4, 8,6 Hz, 1H), 8,21 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,54 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,72 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 2,78 (d, J = 4,4 Hz, 3H).

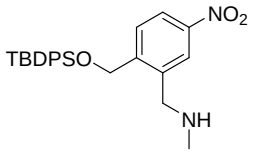
Síntesis de (2-((metilamino)metil)-4-nitrofenil)metanol



[534] Se enfrió una solución de 2-(hidroximetil)-N-metil-5-nitrobenzamida (560 g, 2,66 mol)

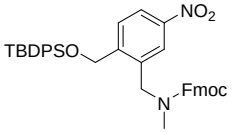
en THF (5000 ml) a 0 °C, luego se agregó BH3-Me2S (506 g, 6,66 mol) (2,0 M en THF) por gotas durante 60 min y se calentó a 70 °C durante 5 h. La LCMS mostró que se había consumido el material de partida. Una vez completada, se agregó HCl 4 M (1200 ml) en metanol a la mezcla de reacción a 0 °C y se calentó a 65 °C durante 8 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, el sólido se filtró y se concentró bajo presión reducida. El producto (2-((metilamino)metil)-4-nitrofenil)metanol (520 g) se obtuvo como un sólido blanco. LCMS: Rt = 0,742 min, MS m/z = 197,1 [M+H]+. $_1$H RMN: 400 MHz DMSO δ 9,25 (br s, 2H), 8,37 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 8,14 (dd, J = 2,4, 8,5 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,72 (br s, 1H), 4,65 (s, 2H), 4,15 (br s, 2H), 2,55 - 2,45 (m, 3H)

Síntesis de 1-(2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrofenil)-N-metilmetanamina



[535] A una solución de (2-((metilamino)metil)-4-nitrofenil)metanol (520 g, 2,65 mol) e imidazol (721 g, 10,6 mol) en DCM (2600 ml) enfriada a 0 °C se agregó TBDPS-CL (1,09 kg, 3,98 mol, 1,02 l) por gotas y se agitó durante 2 h. La mezcla se vertió en agua helada (1000 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina, se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se evaporaron bajo vacío para dar el producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluído con acetato de etilo: éter de petróleo (de 10/1 a 1) para dar un residuo. El producto 1-(2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrofenil)-N-metilmetanamina se obtuvo como un líquido amarillo. LCMS: producto: Rt = 0,910 min, MS m/z = 435,2 [M+H]+. $_1$H RMN: 400 MHz CDCl3 δ 8,23 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 8,15 (dd, J = 2,4, 8,4 Hz, 1H), 7,76 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,71 - 7,66 (m, 4H), 7,50 - 7,37 (m, 6H), 4,88 (s, 2H), 3,65 (s, 2H), 2,39 (s, 3H), 1,12 (s, 9H)

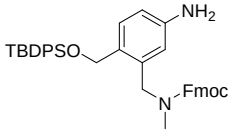
Síntesis de (2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[536] A una solución de 1-(2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrofenil)-N-metilmetanamina (400 g, 920,3 mmol) en THF (4000 ml) se agregó FMOC-OSU (341,5 g, 1,01 mol) y Et_3N (186,2 g, 1,84 mol, 256,2 ml); la mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla se vertió en agua (1600 ml) y se extrajo con acetato de etilo (1000 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina, se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se evaporaron bajo vacío para dar el producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluído con éter de petróleo: acetato de etilo (de 1/0 a 1/1) para dar (2-(((ter-

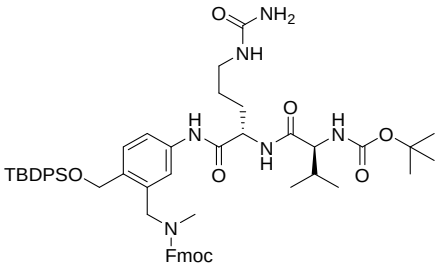
butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo como un sólido blanco. LCMS: Rt = 0,931 min, MS m/z = 657,2 [M+H]+. $_1$H RMN: EW16000-26-P1A, 400 MHz CDCl3 δ 8,21 - 7,96 (m, 1H), 7,87 - 7,68 (m, 3H), 7,68 - 7,62 (m, 4H), 7,62 - 7,47 (m, 2H), 7,47 - 7,28 (m, 9H), 7,26 - 7,05 (m, 2H), 4,81 (br s, 1H), 4,62 - 4,37 (m, 4H), 4,31 - 4,19 (m, 1H), 4,08 - 3,95 (m, 1H), 2,87 (br d, J = 5,2 Hz, 3H), 1,12 (s, 9H).

Síntesis de (5-amino-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[537] Se desgaseó una solución de (2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)-5-nitrobencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (3,0 g, 4,57 mmol, 1,0 equiv.) en MeOH (90 ml) y EtOAc (30 ml) y se purgó con un balón de N_2 mediante una llave de tres vías. Después de repetir el desgaseado/purga con N_2 2x, se agregó 10% de Pd/C tipo deGussa (0,486 g, 0,457 mmoles, 0,1 equiv.). La mezcla resultante se desgaseó y se purgó con un balón de 2 H_2 mediante una llave de tres vías. Después de repetir el desgaseado/purga con H_2 2x, la reacción se agitó bajo la presión de H_2 del balón durante 4 horas. La reacción se desgaseó y se purgó con N_2, se filtró a través de un lecho de Celite y elución adicional con MeOH. Después de eliminar los volátiles en vacío y bombeo a alto vacío se obtuvo (5-amino-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo. LCMS: MH+ = 627,7; Rt = 1,59 min (método ácido de 2 min).

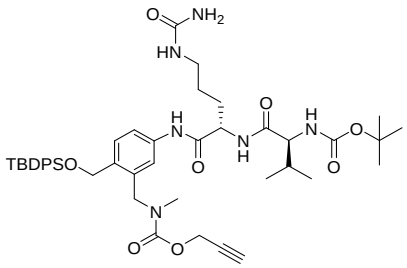
Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[538] Se agregó 2-etoxiquinolin-1(2H)-carboxilato de etilo (2,256 g, 9,12 mmoles, 2,0 equiv.) a (5-amino-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (2,86 g, 4,56 mmoles, 1,0 equiv) y ácido (S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanoico (1,71 g, 4,56 mmoles, 1,0 equiv.) en 2:1 de CH_2Cl_2/MeOH (60 ml). La solución homogénea se agitó durante 16 horas en cuyo momento se agregaron ácido (S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanoico (0,340 g, 0,2 equiv.) y 2-etoxiquinolin-1(2H)-carboxilato de etilo (0,452 g,

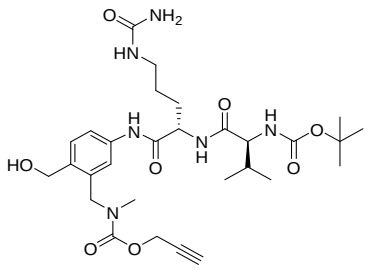
0,4 equiv.) adicionales para llevar la reacción a término. Después de agitar durante 5 horas adicionales, los volátiles se eliminaron en vacío y después de purificación mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-5% de MeOH/CH_2Cl_2) se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo. LCMS: MH+ = 984,1; Rt = 1,54 min (método ácido de 2 min).

Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo



[539] Se agregó dimetilamina 2,0 M en MeOH (10,42 ml, 20,85 mmol, 10 equiv.) a (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (2,05 g, 2,085 mmol, 1,0 equiv) en THF (10 ml). Después de agitar durante 16 horas los volátiles se eliminaron en vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (20 ml) y se agregaron DIEA (0,533 ml, 4,17 mmol, 2 equiv.) y cloroformiato de propargilo (0,264 ml, 2,71 mmol, 1,3 equiv.). Después de agitar at rt durante 16 horas la reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (20 ml), se lavó con $NaHCO_3$ (sat.), NaCl (sat.), se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, se concentró y se purificó mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-15% de MeOH/CH_2Cl_2) para obtener (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo. LCMS: MH+ = 843,8; Rt = 1,35 min (método ácido de 2 min).

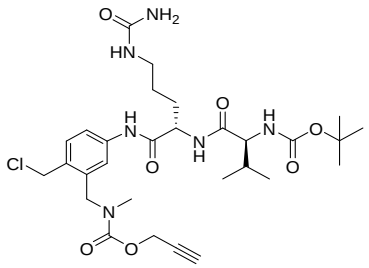
Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo



[540] A una solución a 0 ºC de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-

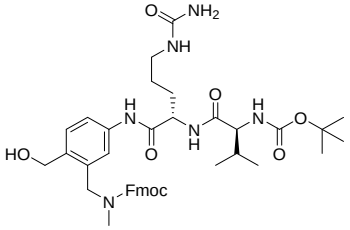
butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo (1,6 g, 1,90 mmoles, 1,0 equiv.) en THF (10,0 ml) se agregó 1,0 M fluoruro de tetrabutilamonio en THF (3,80 ml, 3,80 mmoles, 2,0 equiv.). Después de calentar a temperatura ambiente y agitar durante 16 h los volátiles se eliminaron en vacío, el residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con $NaHCO_3$(sat.), con NaCl (sat.), se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-30% de MeOH/CH2Cl2) para obtener (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo. LCMS: MH+ = 605,7; Rt = 0,81 min (método ácido de 2 min).

Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo



[541] A (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo (350 mg, 0,579 mmoles, 1,0 equiv.) en CH_2Cl_2 (10 ml) se agregó piridina (0,278 ml, 3,47 mmoles, 6 equiv.). La mezcla heterogénea se enfrió a 0 ºC en un baño de hielo y cloruro de tionilo (0,126 ml, 1,73 mmoles, 3 equiv.). Después de agitación en el baño de hielo durante 3 h, la reacción se purificó mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-30% de MeOH/CH_2Cl_2) y se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo. LCMS: MH+ = 623,7; Rt = 2,19 min (método ácido de 5 min).

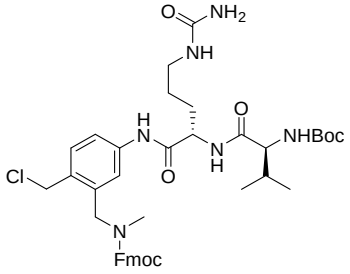
Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[542] A (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((ter-butildifenilsilil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (2,6 g, 2,64 mmol, 1,0 equiv.) disuelto en THF (20 ml) se agregó ácido acético (0,757 ml, 13,22 mmol, 5,0 equiv.) y TBAF 1,0 M en THF (2,91 ml, 2,91 mmol, 1,1 equiv.). La

solución se agitó durante 72 horas en cuyo momento los volátiles se eliminaron en vacío. Después de purificación mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-30% de MeOH/CH_2Cl_2) se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo. LCMS: MH+ = 745,5; Rt = 1,07 min (método ácido de 2 min).

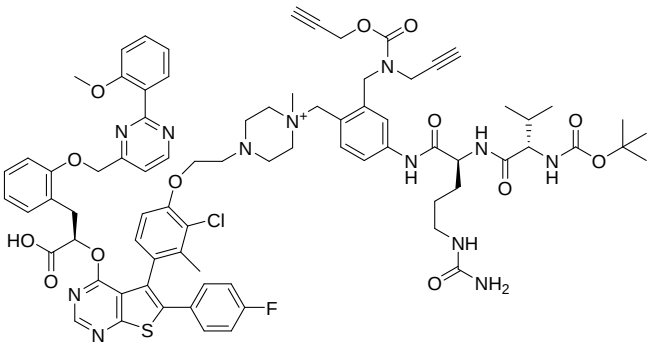
Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo



[543] A (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (200 mg, 0,269 mmoles, 1,0 equiv.) en CH_2Cl_2 (10 ml) se agregó piridina (0,130 ml, 1,61 mmoles, 6 equiv.). La mezcla heterogénea se enfrió a 0 ^oC en baño de hielo y cloruro de tionilo (0,059 ml, 0,806 mmoles, 3 equiv.). Después de agitación breve en el baño de hielo, la reacción se agitó a medida que se calentaba a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se purificó mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-30% de MeOH/CH_2Cl_2) y se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo. LCMS: MH+ = 763,2; Rt = 1,18 min (método ácido de 2 min).

PROCEDIMIENTO GENERAL 1

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-il((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io

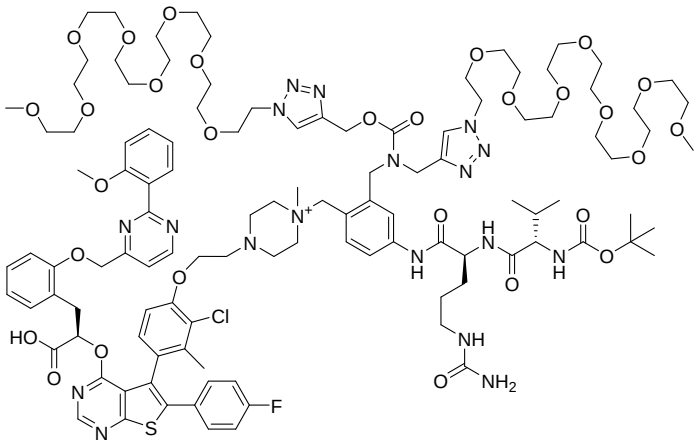


[544] Al clorhidrato del ácido (R)-2-((5-(3-cloro-2-metil-4-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi)fenil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-

il)metoxi)fenil)propanoico (73,8 mg, 0,81 mmoles, 1,0 equiv.) y (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(prop-2-in-1-il)carbamato de prop-2-in-1-ilo (78 mg, 0,122 mmoles, 1,5 equiv.) disuelto en DMF (0,5 ml) se agregó DIEA (70 ul, 0,405 mmoles, 5,0 equiv.) seguido por ioduro de tetrabutilamonio (25,4 mg, 0,069 mmoles, 0,85 equiv.). Después de agitar durante 5 h, la reacción se diluyó con DMSO (3 ml) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, 0,1% de modificador NH4OH). Tras una liofilización, se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-il((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. LCMS: M+=1486,3; Rt = 2,70 min (método básico de 5 min).

PROCEDIMIENTO GENERAL 2

Síntesis de 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io

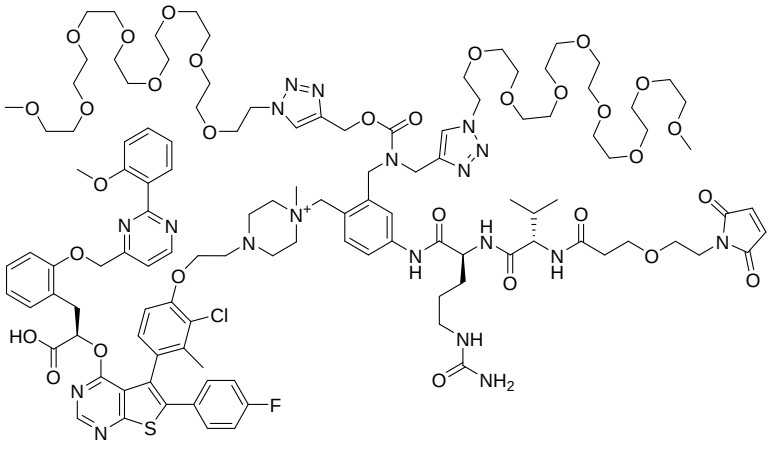


[545] A 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-il((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (24 mg, 0,016 mmoles, 1,0 equiv) y 25-azido-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosano (26,5 mg, 0,065 mmoles, 4 equiv.) se agregó t-BuOH (1 ml). La mezcla se desgaseó en recámara de vacío y se purgó con un balón de N_2 mediante una llave de 3 vías. El desgaseado/purga se repitió 3 veces. Se agregó una solución acuosa 16 mg/ml de ascorbato de sodio (297 ul, 0,024

mmoles, 1,5 equiv.) y la solución se desgaseó y se purgó con N_2 tres veces. Se agregó un solución acuosa 4 mg/ml de sulfato de cobre (298 ul, 0,0048 mmoles, 0,3 equiv.) y la solución se desgaseó y se purgó con N_2 tres veces. Después de agitar bajo N_2 durante 3 h la reacción se diluyó con DMSO (3 ml) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Tras una liofilización se obtuvo 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS M+ = 2307,0730, Rt = 2,69 min (método ácido de 5 min).

PROCEDIMIENTO GENERAL 3

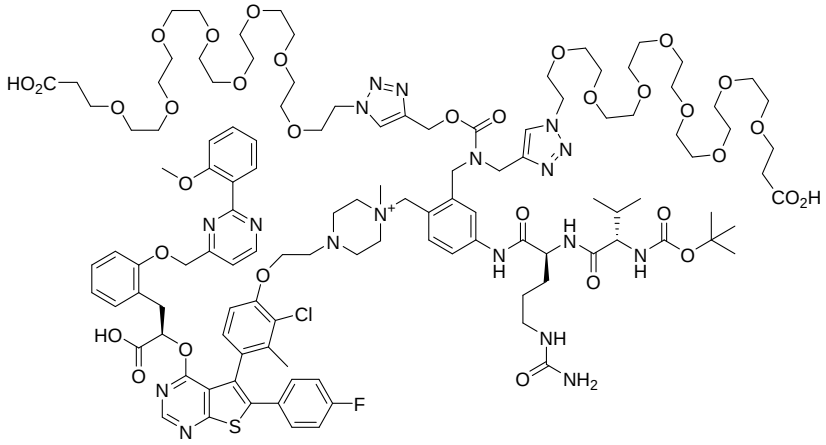
Síntesis de 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L1-P1)



[546] A 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (19 mg, 0,0082 mmoles, 1,0 equiv.) se agregó 25% de TFA/CH_2Cl_2 (2 ml). Después de dejar asentar durante 45 min, los volátiles se eliminaron en vacío, se agregó CH_2Cl_2 y los volátiles se eliminaron en vacío y se bombeó. El residuo se disolvió en DMF (1

ml) y DIEA (22 ul, 0,124 mmoles, 15 equiv.) y se agregó 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (5,1 mg, 0,016 mmoles, 2 equiv.). Después de reposar durante 18 h, la solución se diluyó con DMSO (3 ml) y se purificó mediante cromatografía RP-ISCO oro. Tras una liofilización, se obtuvo 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io **(L1-P1)**. HRMS: M+ = 2399,0797, Rt = 2,43 min (corrida ácida de 5 min). $_1$H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 0,83 (dd, *J* = 13,82, 6,72 Hz, 6 H) 1,30 - 1,52 (m, 2 H) 1,55 - 1,76 (m, 2 H) 1,83 (s, 3 H) 1,88 - 2,08 (m, 1 H) 2,28 - 2,46 (m, 7 H) 2,73 - 2,84 (m, 4 H) 2,84 - 3,08 (m, 8 H) 3,15 - 3,27 (m, 3 H) 3,43 - 3,66 (m, 68 H) 3,73 - 3,83 (m, 7 H) 4,16 - 4,30 (m, 3 H) 4,32 - 4,43 (m, 2 H) 4,47 (br s, 6 H) 4,60 (br s, 3 H) 5,16 - 5,30 (m, 3 H) 5,40 (br s, 2 H) 5,44 - 5,52 (m, 1 H) 5,99 (br t, *J* = 5,07 Hz, 1 H) 6,21 (d, *J* = 6,48 Hz, 1 H) 6,71 (t, *J* = 7,40 Hz, 1 H) 6,97 - 7,04 (m, 2 H), 7,00 (s, 2H) 7,12 - 7,23 (m, 5 H) 7,27 - 7,54 (m, 8 H) 7,63 (d, *J* = 5,14 Hz, 1 H) 7,78 - 7,94 (m, 3 H) 7,99 (br s, 1 H) 8,05 - 8,23 (m, 2 H) 8,60 (s, 1 H) 8,88 (d, *J* = 5,13 Hz, 1 H) 10,24 (br s, 1 H).

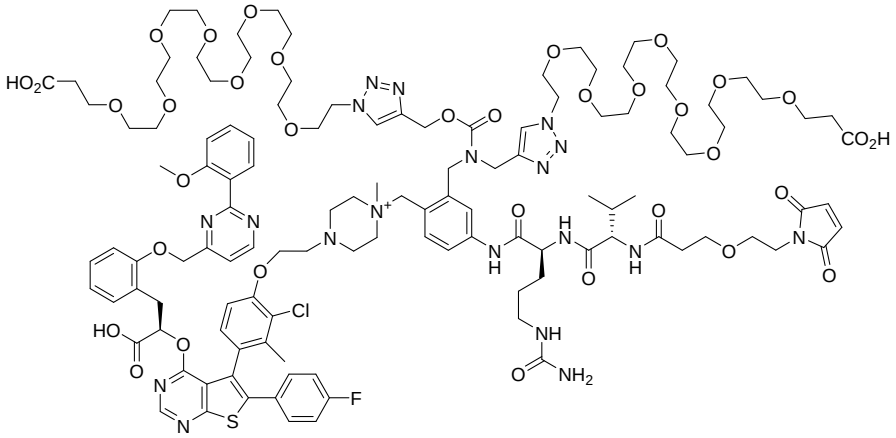
Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[547] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-il((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-

metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (30 mg, 0,020 mmoles, 1,0 equiv) y ácido 1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oico (28,3 mg, 0,061 mmoles, 3 equiv.), para obtener 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 2420,0867, Rt = 2,57 min (método ácido de 5 min).

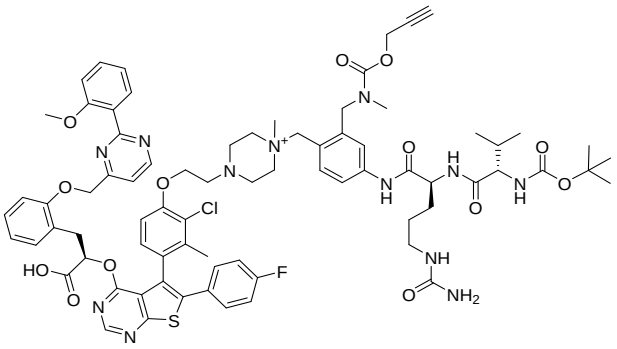
EJEMPLO 2: **Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L10-P1)**



[548] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (30 mg, 0,012 mmoles, 1,0 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io

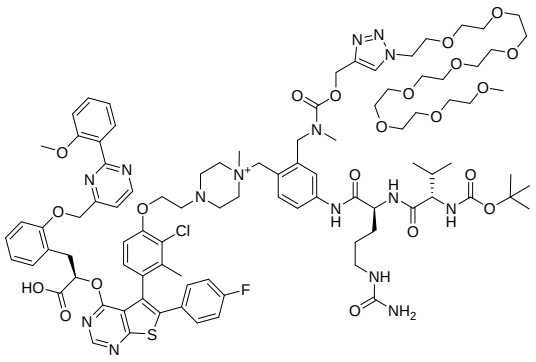
(L10-P1)). HRMS: M+ = 2515,0879, Rt = 2,43 min (método ácido de 5 min). $_1$H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 0,83 (dd, *J* = 13,82, 6,72 Hz, 6 H) 1,30 - 1,52 (m, 2 H) 1,55 - 1,76 (m, 2 H) 1,83 (s, 3 H) 1,88 - 2,08 (m, 1 H) 2,28 - 2,46 (m, 7 H) 2,73 - 2,84 (m, 4 H) 2,84 - 3,08 (m, 8 H) 3,15 - 3,27 (m, 3 H) 3,43 - 3,66 (m, 68 H) 3,73 - 3,83 (m, 7 H) 4,16 - 4,30 (m, 3 H) 4,32 - 4,43 (m, 2 H) 4,47 (br s, 6 H) 4,60 (br s, 3 H) 5,16 - 5,30 (m, 3 H) 5,40 (br s, 2 H) 5,44 - 5,52 (m, 1 H) 5,99 (br t, *J* = 5,07 Hz, 1 H) 6,21 (d, *J* = 6,48 Hz, 1 H) 6,71 (t, *J* = 7,40 Hz, 1 H) 6,97 - 7,04 (m, 2 H), 7,00 (s, 2H) 7,12 - 7,23 (m, 5 H) 7,27 - 7,54 (m, 8 H) 7,63 (d, *J* = 5,14 Hz, 1 H) 7,78 - 7,94 (m, 3 H) 7,99 (br s, 1 H) 8,05 - 8,23 (m, 2 H) 8,60 (s, 1 H) 8,88 (d, *J* = 5,13 Hz, 1 H) 10,24 (br s, 1 H).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



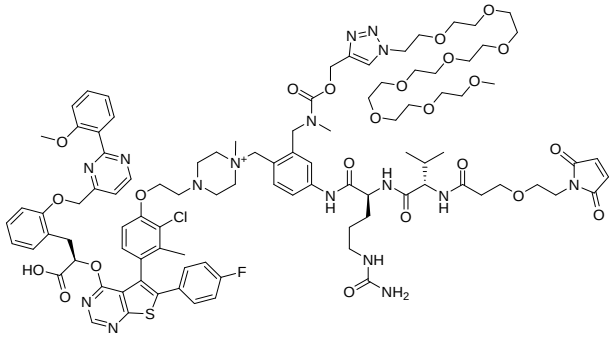
[549] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 1 con clorhidrato del ácido (R)-2-((5-(3-cloro-2-metil-4-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi)fenil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)propanoico (300 mg, 0,329 mmol, 1,0 equiv.) y prop-2-in-1-ilo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(metil)carbamato (246 mg, 0,395 mmol, 1,2 equiv.), para obtener 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 1461,5800, Rt = 2,53 min (método ácido de 5 min).

Síntesis 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[550] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (20 mg, 0,14 mmol, 1,0 equiv.) y 25-azido-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosano (16,8 mg, 0,041 mmol, 3,0 equiv.), para obtener 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 1872,8359, Rt = 2,56 min (método ácido de 5 min).

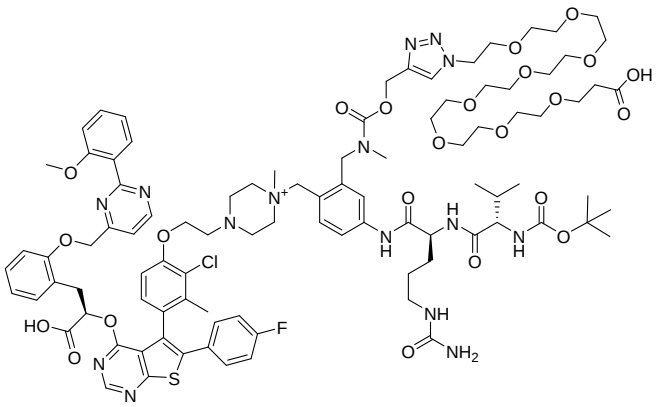
Síntesis de 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L4-P1)



[551] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-

fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (16,9 mg, 0,009 mmol, 1,0 equiv.), para obtener 1-(2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io **(L4-P1)**. HRMS: M+ = 1967,8375, Rt = 2,46 min (método ácido de 5 min).

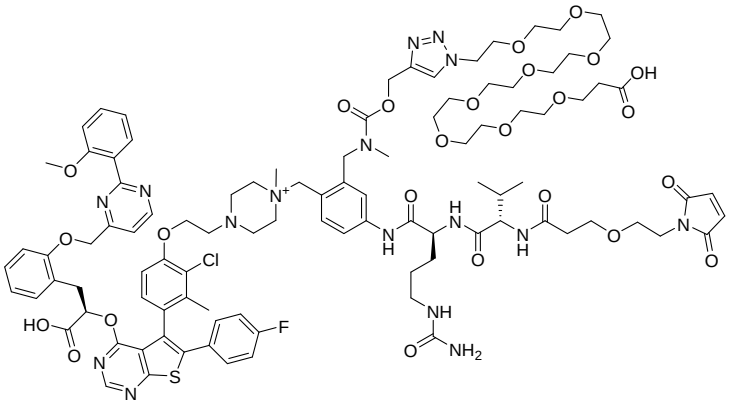
Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[552] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (12 mg, 0,0082 mmol, 1,0 equiv) y ácido 1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oico (11,5 mg, 0,025 mmol, 3,0 equiv.), para obtener 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 1928,8459, Rt = 2,52 min (método ácido de 5 min).

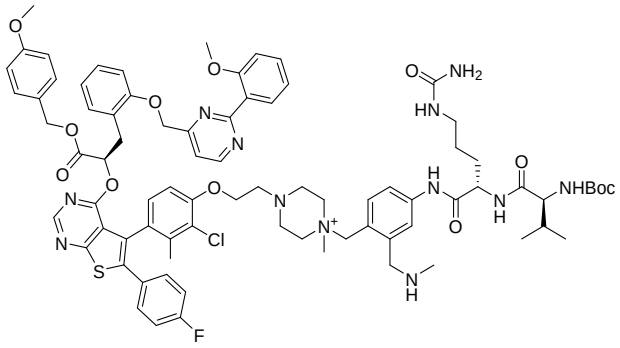
Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-

dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L3-P1)



[553] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (12 mg, 0,006 mmol,1,00 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io **(L3-P1)**. HRMS: M+ = 2024,8516, Rt = 2,42 min (método ácido de 5 min).

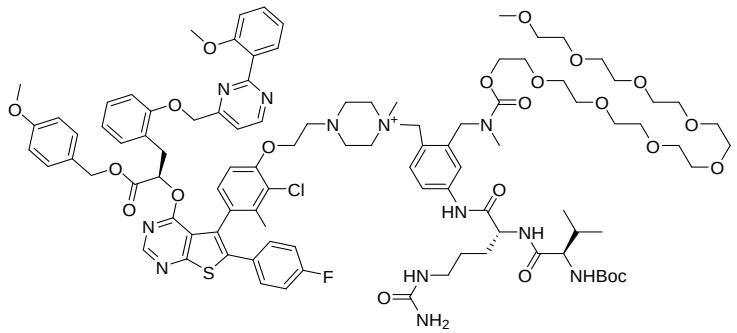
Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[554] A (R)-2-((5-(3-cloro-2-metil-4-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi)fenil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)propanoato de 4-metoxibencilo (160 mg, 0,161 mmol, 1,0 equiv.) y (5-((S)-2-

((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(metil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (153 mg, 0,201 mmoles, 1,25 equiv.) disuelto en DMF (2 ml) se agregó DIEA (0,056 ml, 0,321 mmoles, 2,0 equiv.) seguido por ioduro de tetrabutilamonio (65,3 mg, 0,177 mmoles, 1,1 equiv.). Después de reposar durante 16 h, se agregó 2,0 dimetilamina en THF (0,804 ml, 1,67 mmol, 10 equiv.). Después de reposar durante 2 h, los volátiles se eliminaron en vacío, se agregó DMSO (6 ml) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Tras una liofilización, se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 1499,3700; Rt = 2,59 min (método ácido de 5 min).

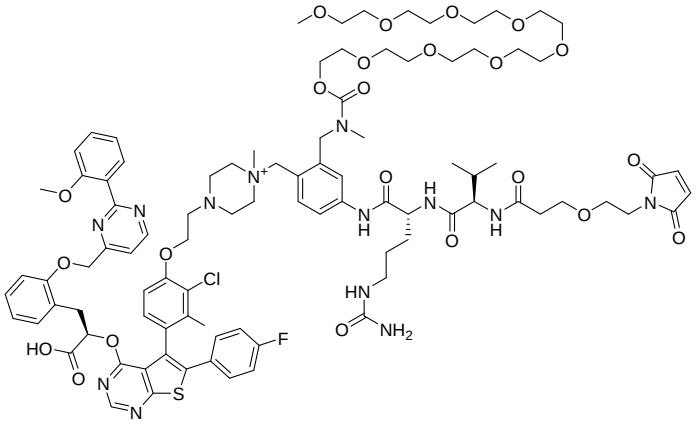
Síntesis de 1-(4-((R)-2-((R)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-2-azanonacosil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[555] A 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (40 mg, 0,027 mmol, 1,0 equiv.) y (2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)carbonato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (30,8 mg, 0,059 mmoles, 2,2 equiv.) disuelto en DMF (1,5 ml) se agregó DIEA (0,009 ml, 0,053 mmoles, 2,0 equiv.). Después de reposar durante 1 hora, se agregó DMSO (3 ml) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Tras una liofilización se obtuvo 1-(4-((R)-2-((R)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-2-azanonacosil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-

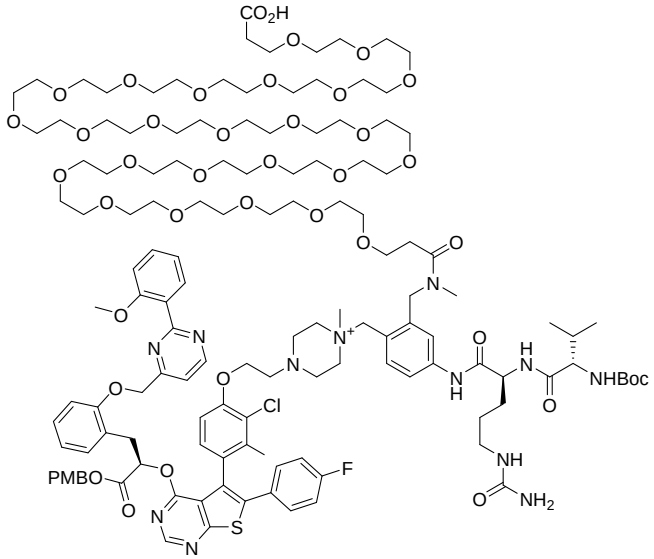
il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 1909,3800; Rt = 2,92 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((R)-2-((R)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-2-azanonacosil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L2-P1)



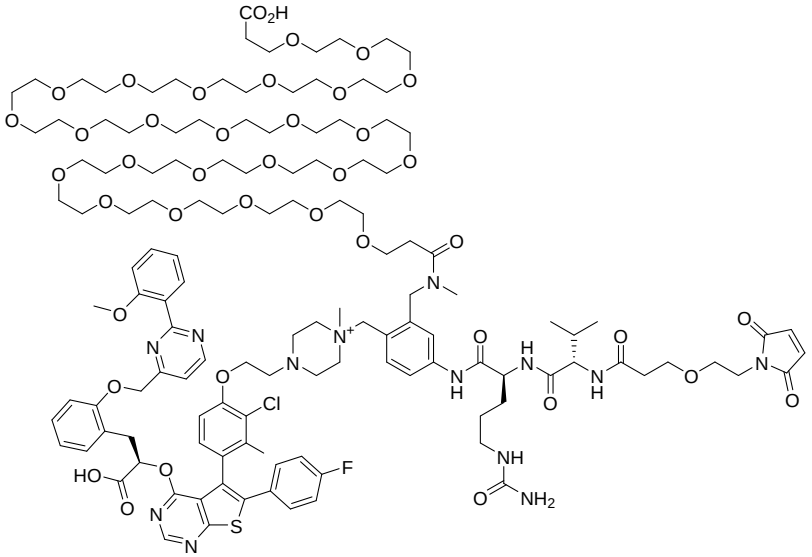
[556] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(4-((R)-2-((R)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-2-azanonacosil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (25,3 mg, 0,013 mmol, 1,0 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((R)-2-((R)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-2-azanonacosil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io **(L2-P1)** . HRMS: M+ = 1884,7900, Rt = 2,50 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(80-carboxi-2-metil-3-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-pentacosaoxa-2-azaoctacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



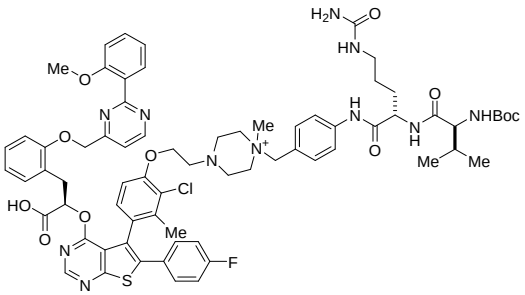
[557] A 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (150 mg, 0,093 mmol, 1,0 equiv.) y ácido 79-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-79-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-pentacosaoxanonaheptacontanoico (134 mg, 0,102 mmoles, 1,1 equiv.) disuelto en DMF (2 ml) se agregó DIEA (0,081 ml, 0,464 mmoles, 5,0 equiv.). Después de reposar durante 18 h, se agregó DMSO (6 ml) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Tras una liofilización se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(80-carboxi-2-metil-3-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-pentacosaoxa-2-azaoctacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 2700,8701; Rt = 2,83 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(80-carboxi-2-metil-3-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-pentacosaoxa-2-azaoctacontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L11-P1)



[558] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(80-carboxi-2-metil-3-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-pentacosaoxa-2-azaoctacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io, para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(80-carboxi-2-metil-3-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-pentacosaoxa-2-azaoctacontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (**L11-P1)**. HRMS: M+ = 2674,8201, Rt = 2,44 min (método ácido de 5 min).

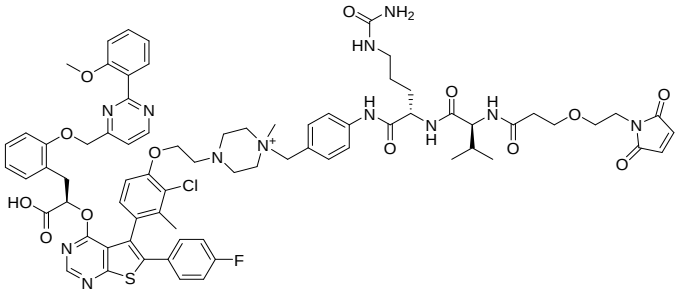
Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[559] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 1 con (R)-2-((5-(3-cloro-2-metil-4-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi)fenil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)propanoico ácido (50 mg, 0,057 mmol, 1,0 equiv.) y ter-

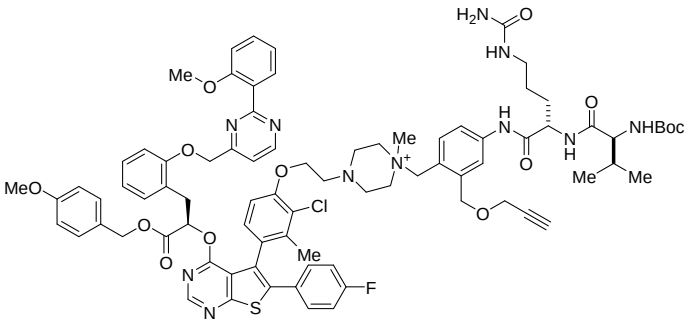
butilo ((S)-1-(((S)-1-((4-(clorometil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (34,1 mg, 0,069 mmol, 1,2 equiv.), para obtener 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. LCMS: M+ = 1337,2, Rt = 1,11 min (método ácido de 2 min).

Síntesis de ácido 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io o (2R)-2-[(5S$_a$)-5-[3-cloro-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-dioxopirrol-1-il)etoxi]propanoilamino]-3-metil-butanoil]amino]-5-ureido-pentanoil]amino]fenil]metil]-4-metil-piperazin-4-io-1-il]etoxi]-2-metil-fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (L9-P1)



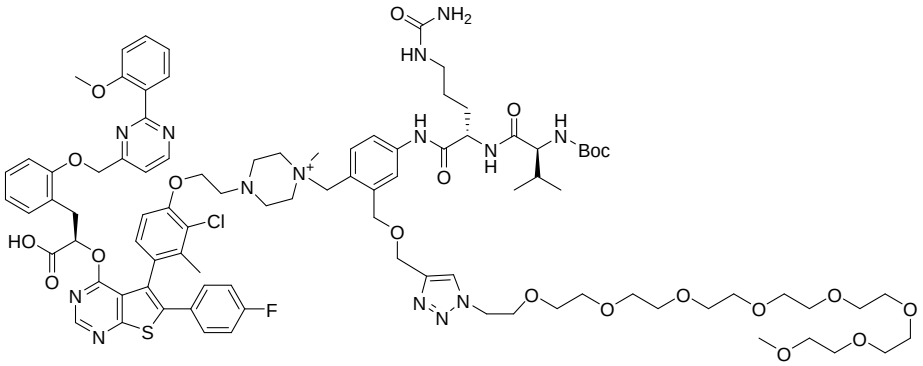
[560] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (55 mg, 0,041 mmol, 1,0 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (**L9-P1)**. HRMS: M+ = 1431,5400, Rt = 2,50 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[561] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 1 con 4-metoxibencilo (R)-2-((5-(3-cloro-2-metil-4-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi)fenil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)propanoato (85 mg, 0,085 mmol, 1,0 equiv.) y ((S)-1-(((S)-1-((4-(clorometil)-3-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de ter-butilo (58 mg, 0,102 mmol, 1,2 equiv.), para obtener 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 1524,6200, Rt = 2,95 min (método ácido de 5 min).

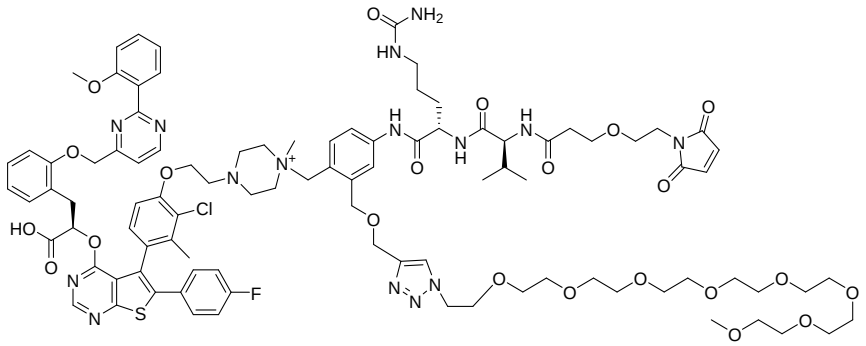
Síntesis de 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[562] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (20 mg, 0,014 mmoles, 1,0 equiv) y 25-azido-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosano (5,8 mg, 0,014 mmoles, 1 equiv.), para obtener 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-

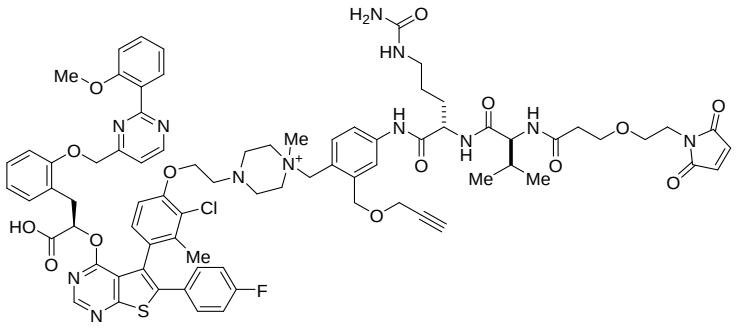
((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. LCMS: [(M+)+H+]+2/2=908,5, Rt = 1,15 min (método ácido de 2 min).

Síntesis de 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L8-P1)



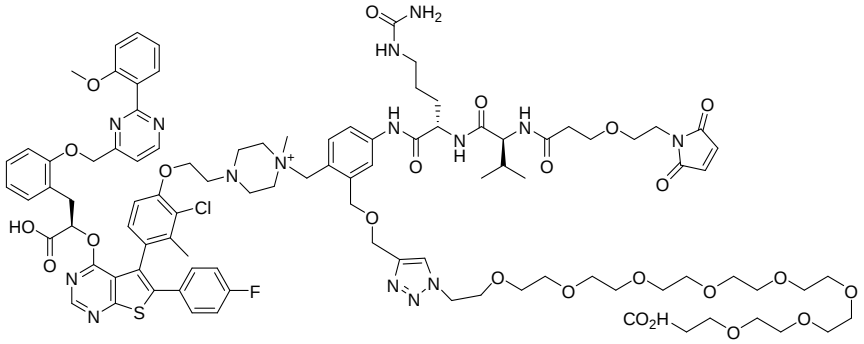
[563] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (20 mg, 0,010 mmol, 1,0 equiv.), para obtener 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io **(L8-P1)**. HRMS: M+ = 1908,8097, Rt = 2,37 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io



[564] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (123,1 mg, 0,075 mmol, 1,0 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ = 1499,5601, Rt = 2,50 min (método ácido de 5 min).

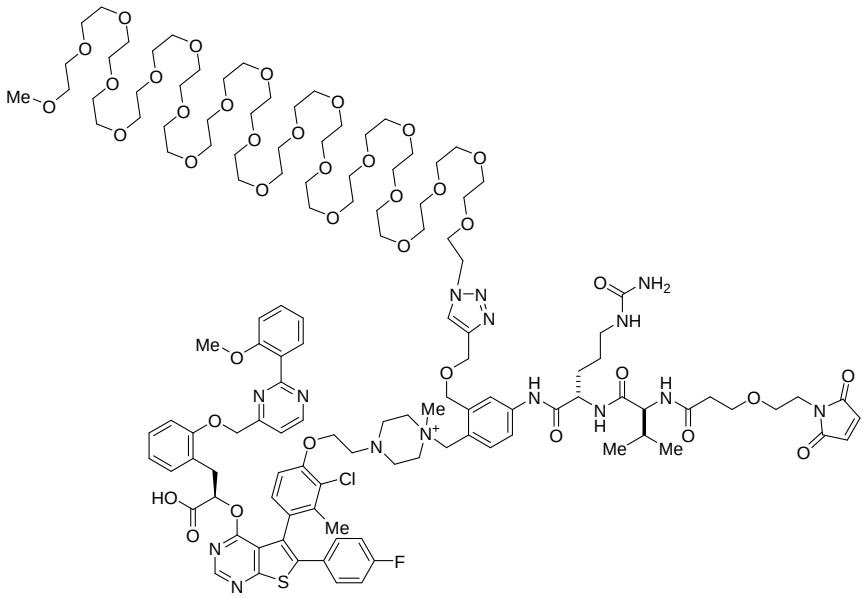
Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L7-P1)



[565] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (40 mg, 0,027 mmoles, 1,0 equiv) y ácido 1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oico (37,4 mg, 0,080 mmoles, 3,0 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-

fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-(26-carboxi-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L7-P1). HRMS: M+ = 1965,5601, Rt = 2,35 min (método ácido de 5 min).

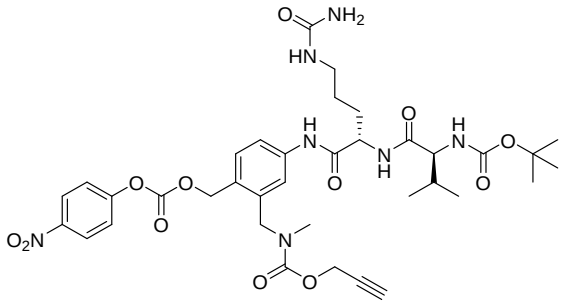
Síntesis de 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxatriheptacontan-73-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L5-P1)



[566] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (20,4 mg, 0,014 mmoles, 1,0 equiv) y 73-azido-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxatriheptacontane (28,1 mg, 0,025 mmoles, 1,5 equiv.), para obtener 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxatriheptacontan-73-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-

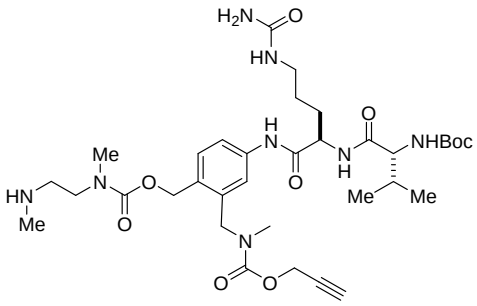
metilpiperazin-1-io **(L5-P1)**. HRMS: M+ = 2613,2100, Rt = 2,44 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo



[567] Se mezcló suavemente una solución de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(hidroximetil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo (249 mg, 0,412 mmoles) y (4-nitrosofenil)carbonato de 4-nitrofenilo (356 mg, 1,24 mmoles, 3,0 equiv.) en DMF (2 ml) hasta homogeneidad y sat durante 16 horas. La solución se diluyó con DMSO (6 ml) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, no modificador). Tras una liofilización, se obtuvo (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo. LC/MS MH+ = 770,7, Rt = 2,45 min (método ácido de 5 min).

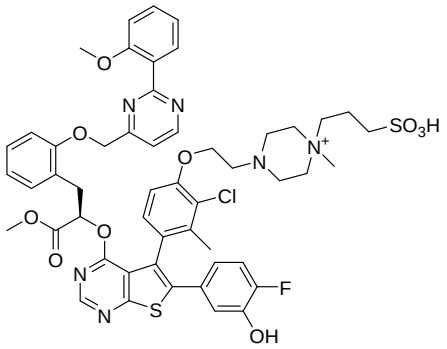
Síntesis de (5-((R)-2-((R)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((metil(2-(metilamino)etil)carbamoil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo



[568] A una solución de (5-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo (100 mg, 0,130 mmol) en DMF (1 ml) se agregó N,N'-dimetil-etilendiamina (22,90 mg, 0,260 mmol), seguido por la adición de DIPEA (0,113 ml, 0,650 mmol) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con DMSO, se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H_2O, 0,1% de modificador NH4OH). Tras una liofilización se obtuvo (5-((R)-2-((R)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((metil(2-

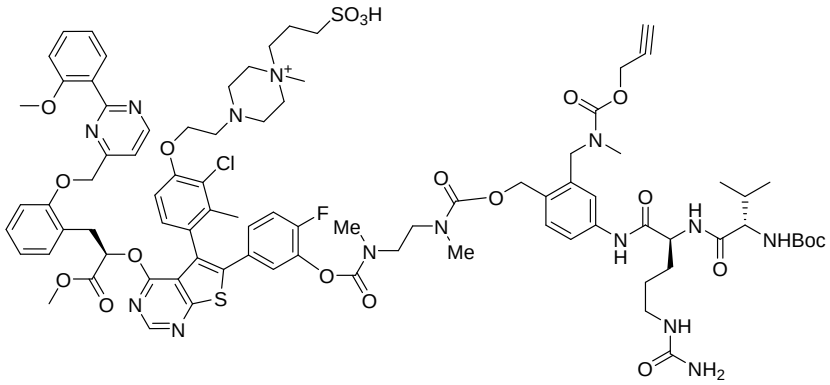
(metilamino)etil)carbamoil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo. LCMS: MH+ = 719,9, Rt = 0,73 min (método ácido de 2 min).

Síntesis de (R)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluoro-3-hidroxifenil)-4-((1-metoxi-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io



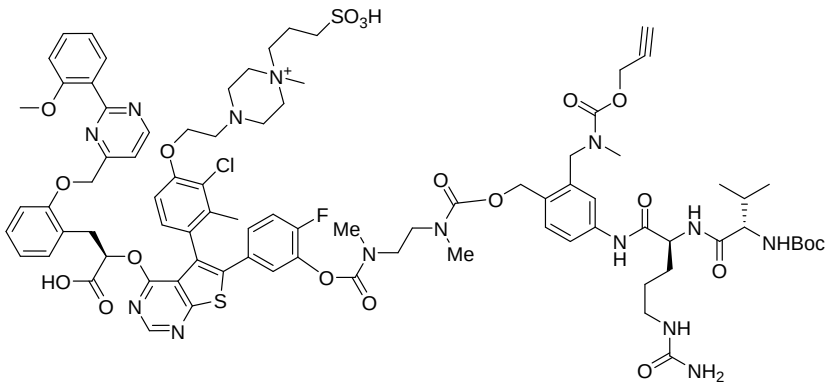
[569] A una solución de ácido (R)-4-(2-(4-(4-(1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluoro-3-hidroxifenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io o (2*R*)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-[4-metil-4-(3-sulfopropil)piperazin-4-io-1-il]etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-hidroxi-fenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (100 mg, 0,099 mmoles) en MeOH (1,5 ml) se agregaron unas pocas gotas de H_2SO_4 (conc.). Después de agitar durante la noche, el MeOH se eliminó en vacío, el residuo se disolvió en DMSO, se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Tras una liofilización, se obtuvo (R)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluoro-3-hidroxifenil)-4-((1-metoxi-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io. HRMS M+ = 1027,2900, Rt = 2,31 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de 4-(2-(4-(6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)-4-(((R)-1-metoxi-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io



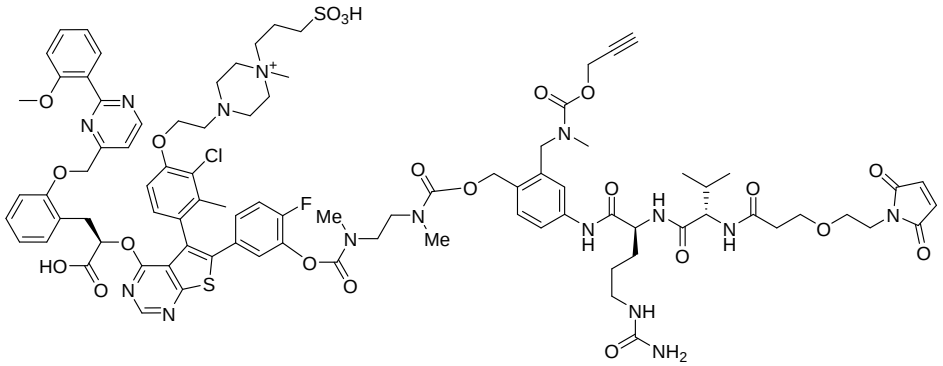
[570] A una solución de (R)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluoro-3-hidroxifenil)-4-((1-metoxi-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (50 mg, 0,049 mmoles, 1,0 equiv) en CH2Cl2 (1 ml) a 0 ºC se agregó TEA (34 ul, 0,243 mmoles, 5,0 equiv.) seguido por cloroformiato de 4-nitrofenilo (10,8 mg, 0,054 mmoles, 1,1 equiv.). Después de agitar durante 15 min, se agregó una solución de (5-((R)-2-((R)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((metil(2-(metilamino)etil)carbamoil)oxi)metil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo (66,3 mg, 0,092 mmoles, 2,0 equiv) en DMF (1 ml) seguido por DIEA (40 ul, 0,231 mmoles, 5,0 equiv.). Después de agitar durante 2 h, los volátiles se eliminaron en vacío, la solución se diluyó con DMSO (3 ml) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Tras una liofilización se obtuvo 4-(2-(4-(6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)-4-(((R)-1-metoxi-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io. HRMS M+ = 1771,6700, Rt = 2,57 min (método ácido de 5 min).

Síntesis de 4-(2-(4-(6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io



[571] A una solución de 4-(2-(4-(6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)-4-(((R)-1-metoxi-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (23 mg, 0,013 mmoles, 1,0 equiv) en THF (1 ml) se agregó LiOH 2 N (0,032 ml, 0,065 mmoles, 5 equiv). Después de agitar durante 2 h, la solución se neutralizó con AcOH y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO oro (10-100% de MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Tras una liofilización, se obtuvo 4-(2-(4-(6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io. HRMS M+ = 1757,6200, Rt = 2,46 min (método ácido de 5 min).

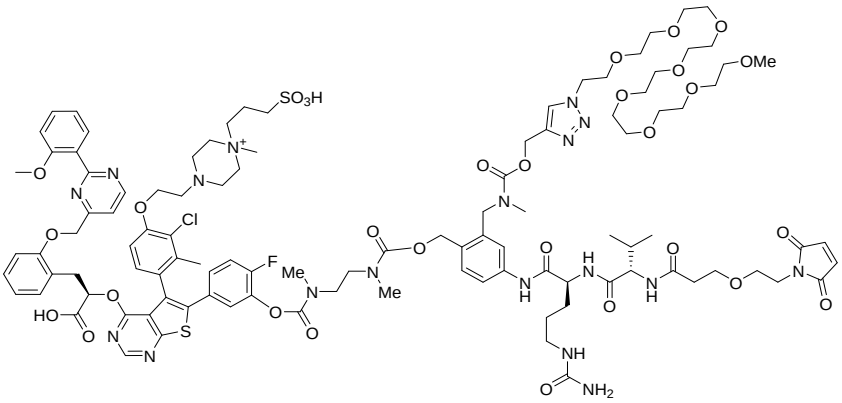
Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io



[572] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 4-(2-(4-(6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-

((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (17 mg, 0,0097 mmol, 1,0 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io. HRMS: M+ = 1852,5200, Rt = 2,29 min (método ácido de 5 min).

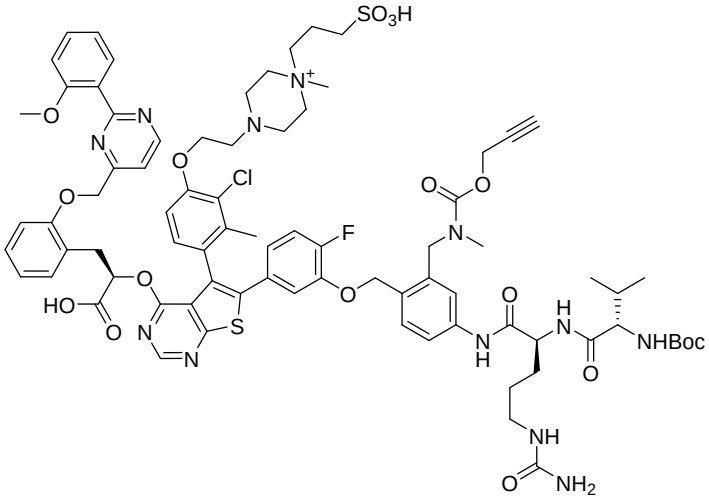
Síntesis de 4-(2-(4-(6-(3-(((2-((((2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (L12-P2)



[573] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(3-(((2-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (10 mg, 0,0054 mmoles, 1,0 equiv.) y 25-azido-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosano (4,4 mg, 0,011 mmoles, 2 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(6-(3-(((2-((((2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-

il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)etil)(metil)carbamoil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io **(L12-P2**). HRMS: M+ = 2261,8601, Rt = 2,24 min (método ácido de 5 min).

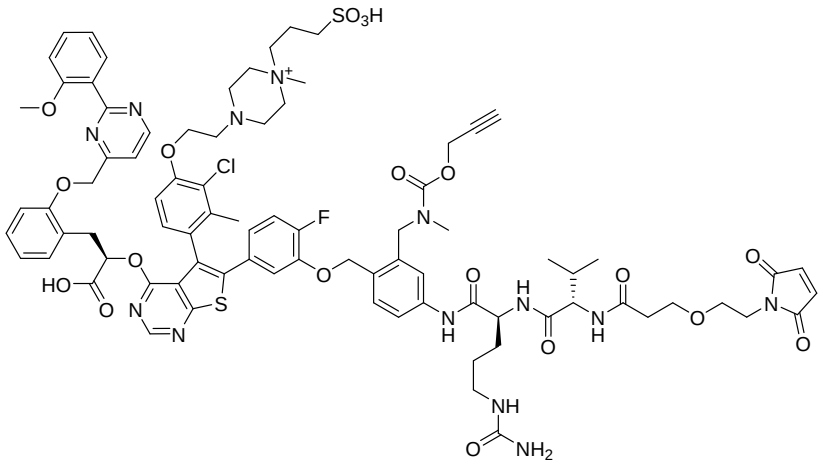
Síntesis de 4-(2-(4-(6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io



[574] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 1 usando (R)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluoro-3-hidroxifenil)-4-((1-metoxi-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (40 mg, 0,039 mmol, 1,0 equiv.) y (5-((R)-2-((R)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(clorometil)bencil)(metil)carbamato de prop-2-in-1-ilo (36,4 mg, 0,058 mmol, 1,5 equiv.), con la modificación después de haber completado la alquilación mediante adición de LiOH 2 N (0,097 ml, 0,195 mmoles, 5,0 equiv.) y agitación durante 2 h antes de su neutralización y purificación mediante RP-HPLC. Tras una liofilización, se obtuvo 4-(2-(4-(6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io. HRMS: M+ = 1599,5856, Rt = 1,34 min (método ácido de 2 min).

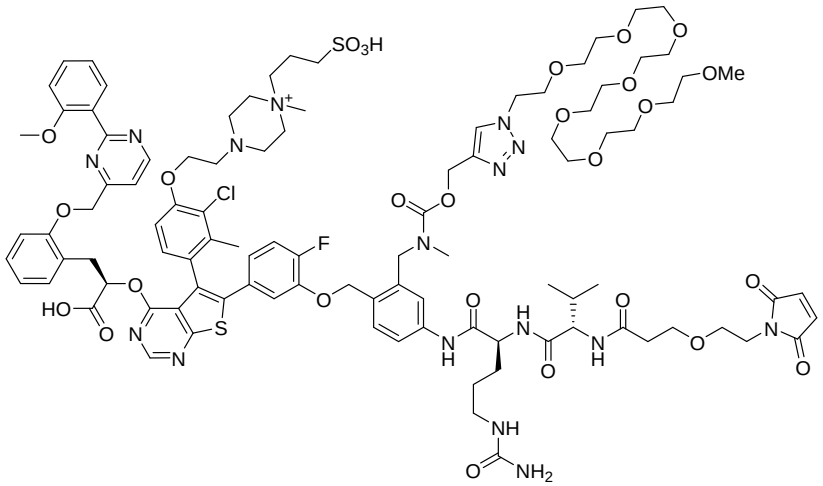
Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-

il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)-4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io



[575] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 4-(2-(4-(6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-((terbutoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (46 mg, 0,029 mmol, 1,0 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)-4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io. HRMS: M+ = 1694,5699, Rt = 2,55 min (método ácido de 5 min).

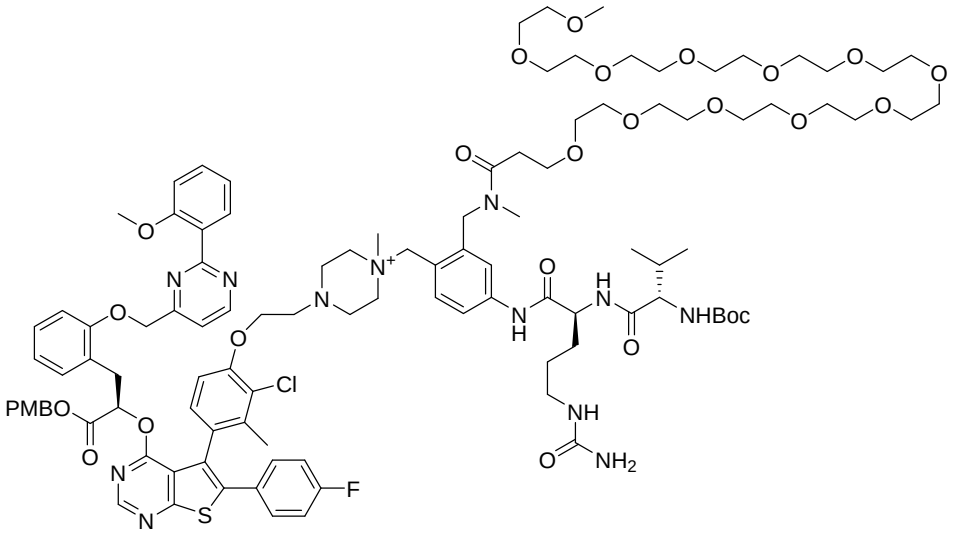
Síntesis de 4-(2-(4-(6-(3-((2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (L4-P2)



[576] Se utilizó el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metil((prop-2-in-1-iloxi)carbonil)amino)metil)bencil)oxi)-4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io (44 mg, 0,026 mmoles, 1,0 equiv.) y 25-azido-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosano (21,2 mg, 0,052 mmoles, 2 equiv.), para obtener 4-(2-(4-(6-(3-((2-(((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)-4-fluorofenil)-4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metil-1-(3-sulfopropil)piperazin-1-io **(L4-P2)**. HRMS: M+ = 2103,8000, Rt = 2,47 min (método ácido de 5 min).

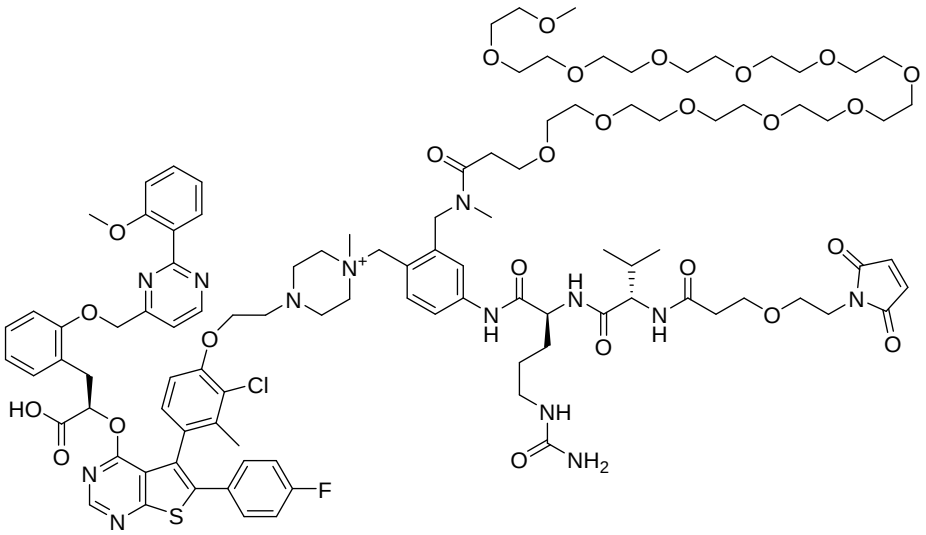
PROCEDIMIENTO GENERAL 4:

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(39-metil-38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39-azatetracontan-40-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



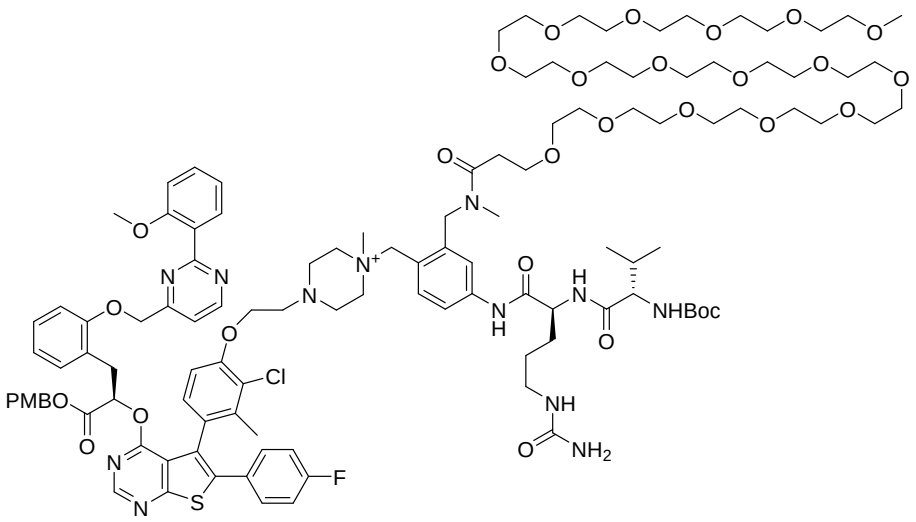
[577] A 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (60 mg, 0,040 mmol, 1,0 equiv.) y 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (35,7 mg, 0,052 mmoles, 1,3 equiv.) disuelto en DMF (1 mL) se agregó DIPEA (0,035 mL, 0,200 mmoles, 5,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 18 h, se agregó DMSO (2 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(39-metil-38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39-azatetracontan-40-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: [M+Na]+=2092,9399; Rt=2,88 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(39-metil-38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39-azatetracontan-40-il)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L32-P1)



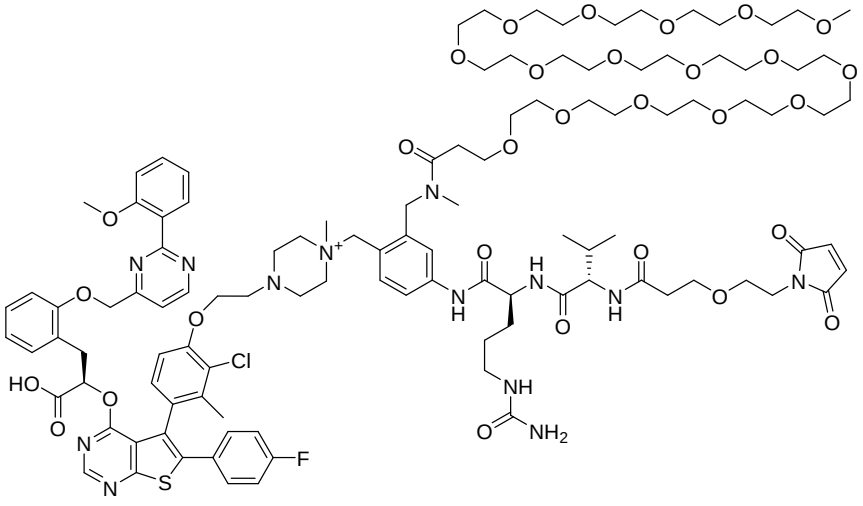
[578] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(39-metil-38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39-azatetracontan-40-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (43,4 mg, 0,021 mmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(39-metil-38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39-azatetracontan-40-il)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: [M+Na]+= 2066,8799; Rt=2,44 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(51-metil-50-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-hexadecaoxa-51-azadopentacontan-52-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



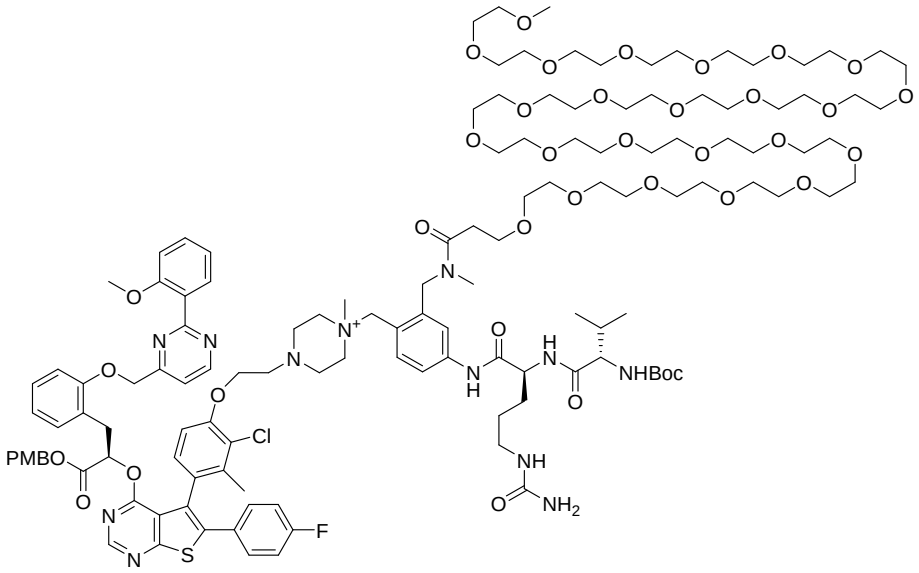
[579] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 4** con 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-hexadecaoxapentacontan-50-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (44,8 mg, 0,021 mmol, 1 eq), se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(51-metil-50-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-hexadecaoxa-51-azadopentacontan-52-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2246,0400; Rt=2,88 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(51-metil-50-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-hexadecaoxa-51-azadopentacontan-52-il)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L31-P1)



[580] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(51-metil-50-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-hexadecaoxa-51-azadopentacontan-52-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (47,5 mg, 0,021 mmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(51-metil-50-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-hexadecaoxa-51-azadopentacontan-52-il)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2221,0000; Rt=2,45 min (5 min, método ácido).

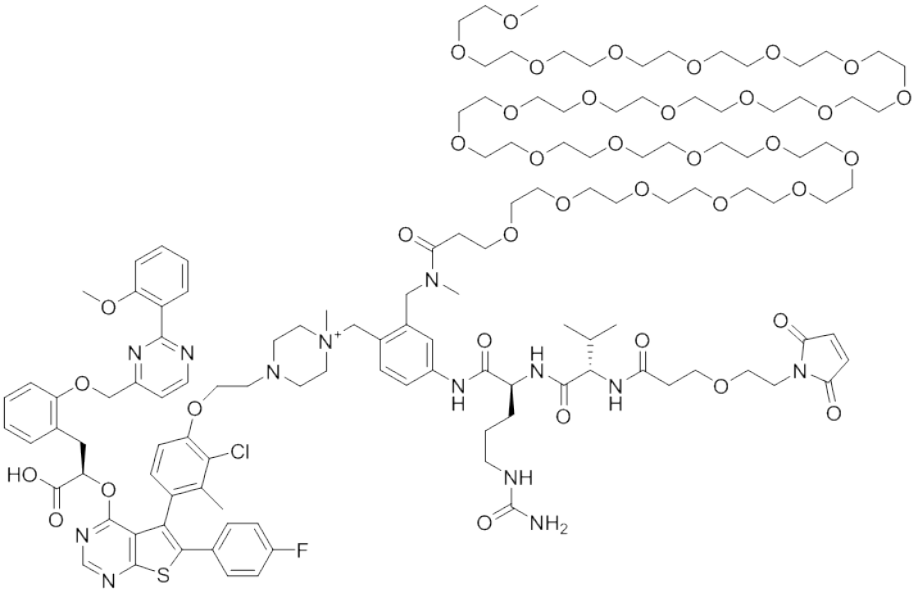
Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(75-metil-74-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxa-75-azahexaheptacontan-76-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[581] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 4** con 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxatetraheptacontan-74-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (52,6 mg, 0,043 mmol, 1,3 eq), se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(75-metil-74-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxa-75-azahexaheptacontan-76-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-

il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2598,2500; Rt=2,88 min (5 min, método ácido).

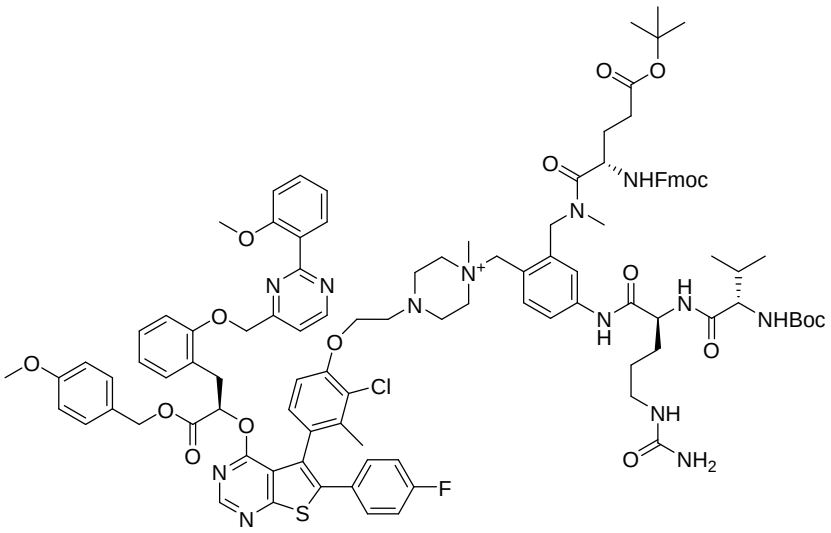
Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(75-metil-74-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxa-75-azahexaheptacontan-76-il)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L30-P1)



[582] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(75-metil-74-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxa-75-azahexaheptacontan-76-il)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (38,8 mg, 0,014 mmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(75-metil-74-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-tetracosaoxa-75-azahexaheptacontan-76-il)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2573,2000; Rt=2,47 min (5 min, método ácido).

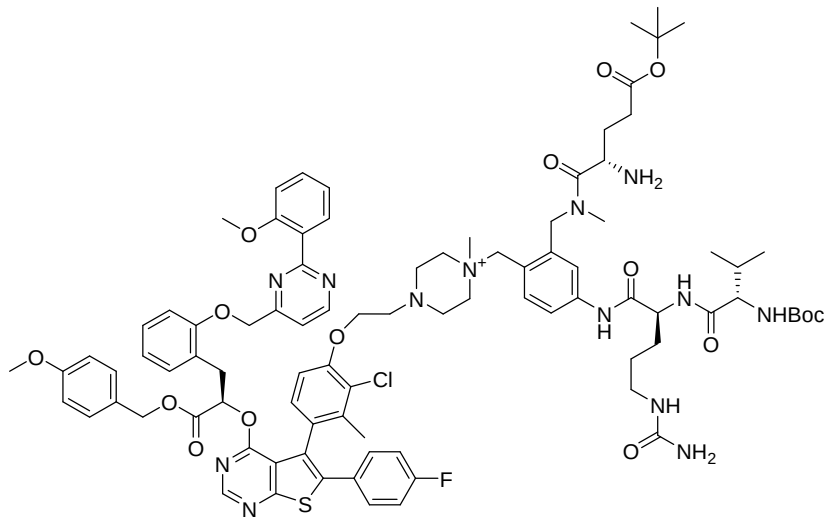
Síntesis de 1-(2-(((S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxopentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-

1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[583] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 4** con 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-glutamato de 5-(tert-butilo) (39,0 mg, 0,075 mmol, 1,1 equiv.), se obtuvo 1-(2-(((S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxopentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1906,8101; Rt=3,03 min (5 min, método ácido).

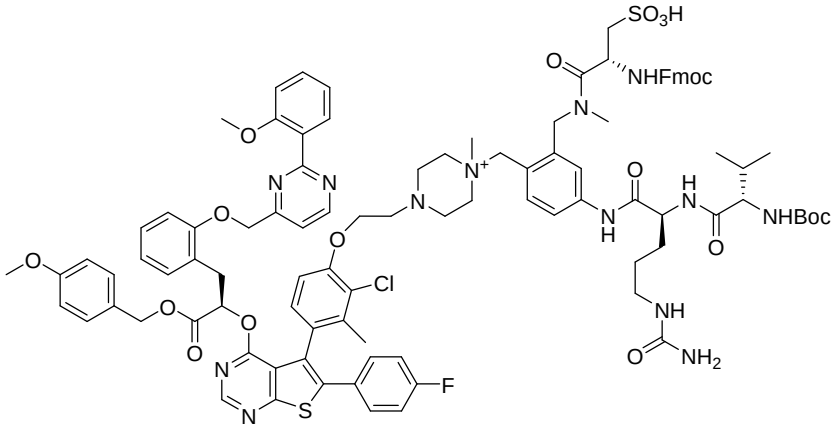
Síntesis de 1-(2-(((S)-2-amino-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxopentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[584] A 11-(2-(((S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxopentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (38,8 mg, 0,026 mmoles, 1,0 equiv.) disuelto en DMSO (2 mL) se agregó dimetilamina (0,192 mL, 0,384 mmoles, 20 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 4 hr, se agregó DMSO (2 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(2-(((S)-2-amino-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxopentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1684,4000; Rt=2,64 min (5 min, método ácido).

PROCEDIMIENTO GENERAL 5

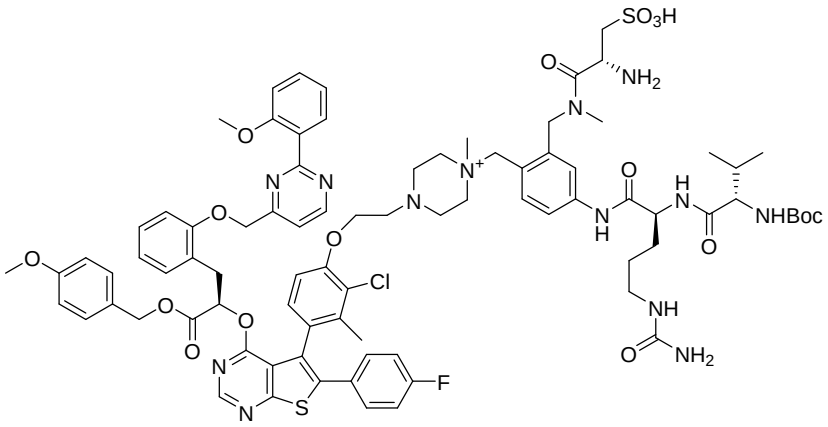
Síntesis de 1-(2-(((R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-N-metil-3-sulfopropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[585] A (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(sulfo)-D-alanina (55,2 mg, 0,141 mmol, 1,3 eq) y hexafluorofosfato (V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (41,3 mg, 0,109 mmoles, 1,0 equiv.) disuelto en DMF (2 mL) se agregó DIPEA (0,024 mL, 0,138 mmoles, 8,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 10 min, se agregó 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (200 mg, 0,109 mmol, 1,0 eq). Después de dejarse en

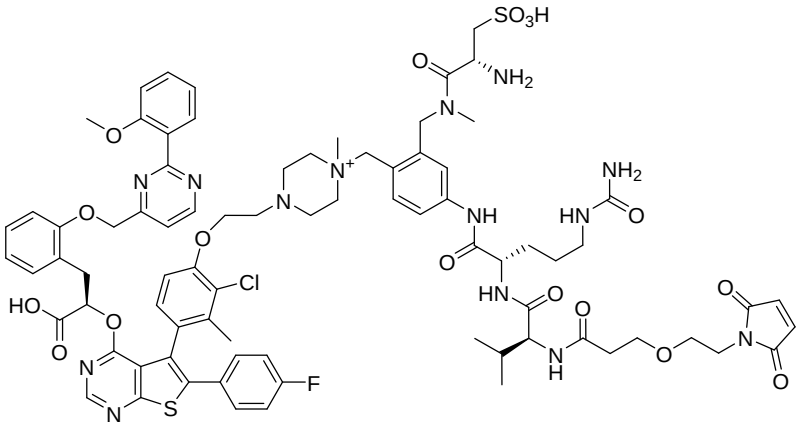
reposo durante 2,5 hr, se agregó DMSO (4 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(2-(((R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-N-metil-3-sulfopropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1872,7000; Rt=3,09 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(2-(((R)-2-amino-N-metil-3-sulfopropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[586] A 1-(2-(((R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-N-metil-3-sulfopropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (173 mg, 0,087 mmoles, 1,0 equiv.) disuelto en THF (2 mL) se agregó dimetilamina (0,870 mL, 1,740 mmoles, 20 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 5 hr, todos los materiales volátiles se eliminaron al vacío. El sólido se trituró con éter dietílico. Se agregó DMSO (2 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(2-(((R)-2-amino-N-metil-3-sulfopropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1650,5800; Rt=2,71 min (5 min, método ácido).

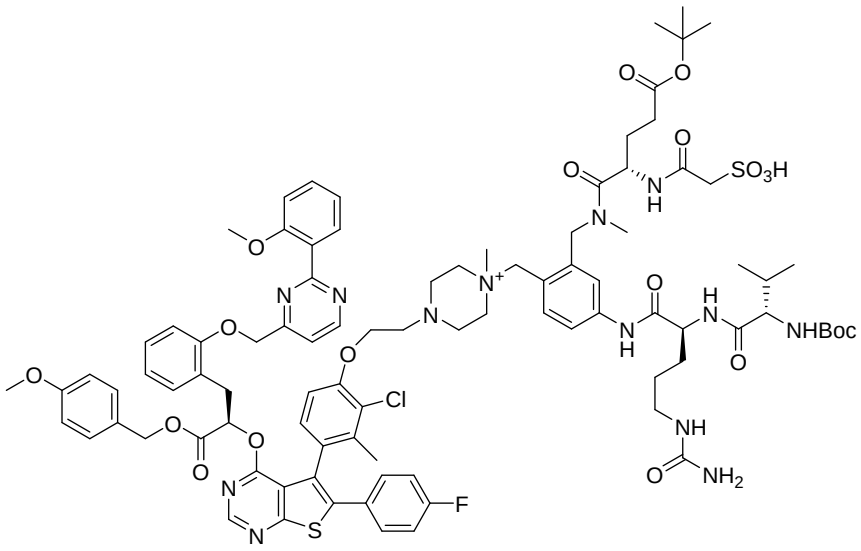
Síntesis de 1-(2-(((R)-2-amino-N-metil-3-sulfopropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L70-P1)



[587] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(2-(((S)-2-amino-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxopentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (145 mg, 0,088 mmol, 1 eq), se obtuvo 1-(2-(((R)-2-amino-N-metil-3-sulfopropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1625,5601; Rt=2,32 min (5 min, método ácido).

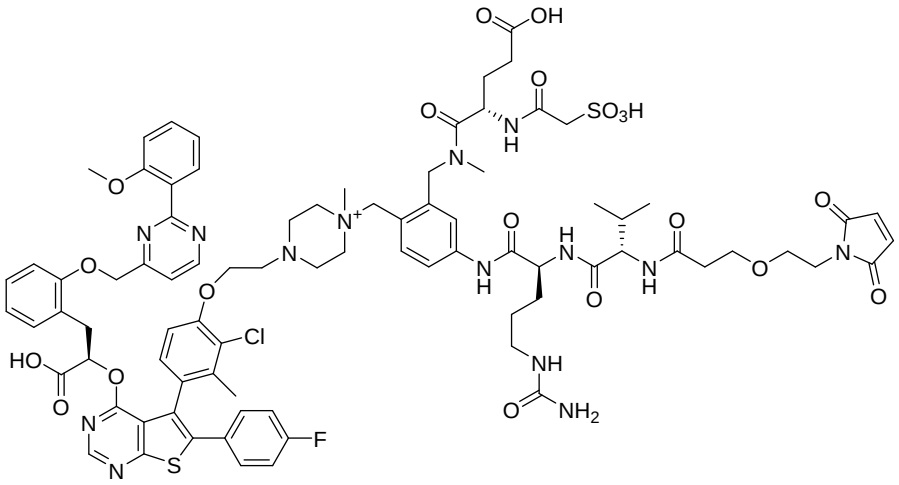
PROCEDIMIENTO GENERAL 6

Síntesis de 1-(2-(((S)-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxo-2-(2-sulfoacetamido)pentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



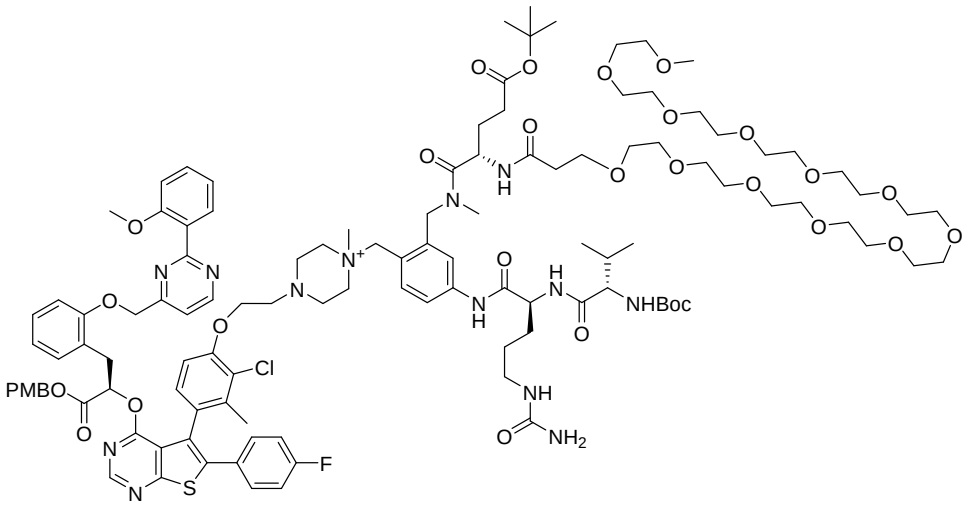
[588] A ácido 2-sulfoacético (4,83 mg, 0,035 mmol, 2,0 equiv.) y hexafluorofosfato (V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (9,85 mg, 0,026 mmoles, 1,5 equiv.) disuelto en DMF (1 mL) se agregó DIPEA (0,024 mL, 0,138 mmoles, 8,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 10 min, se agregó 1-(2-(((S)-2-amino-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxopentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (29,1 mg, 0,017 mmoles, 1,0). Después de dejarse en reposo durante 45 min, se agregó DMSO (2 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(2-(((S)-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxo-2-(2-sulfoacetamido)pentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1806,7000; Rt=3,10 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-4-carboxi-N-metil-2-(2-sulfoacetamido)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L71-P1)



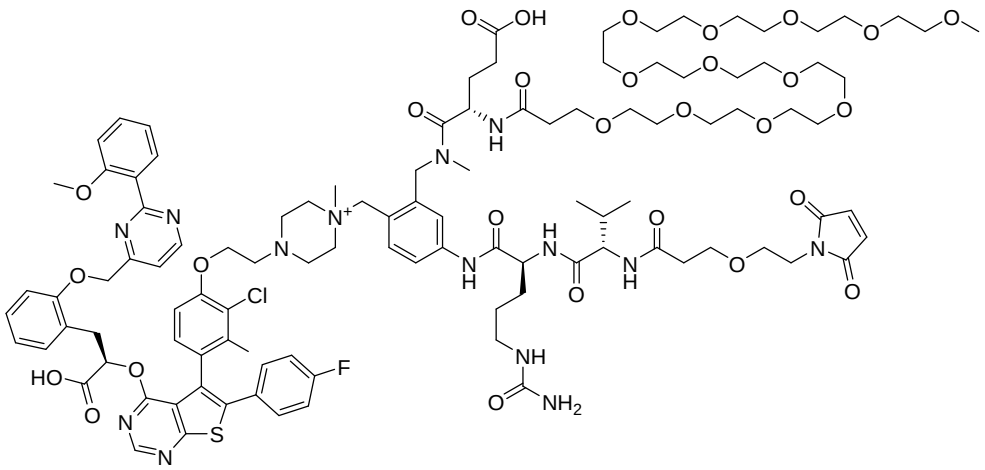
[589] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(2-(((S)-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxo-2-(2-sulfoacetamido)pentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (23,7 mg, 0,011 mmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-4-carboxi-N-metil-2-(2-sulfoacetamido)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1725,5900; Rt=2,39 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(2-((S)-40-(3-(tert-butoxi)-3-oxopropil)-42-metil-38,41-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,42-diazatritetracontan-43-il)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



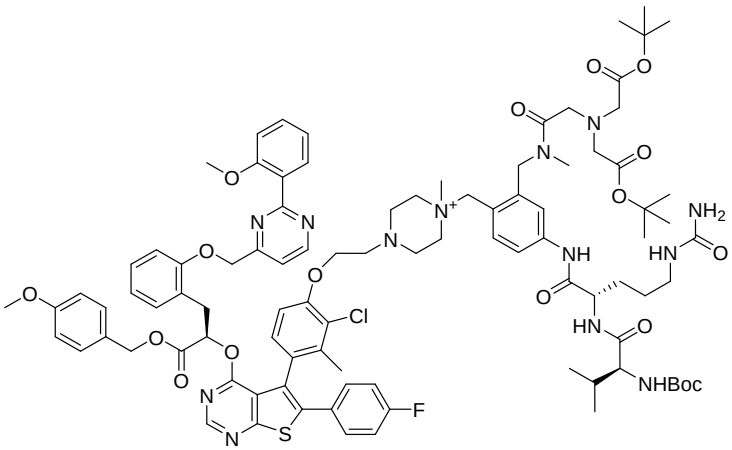
[590] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 4** con 1-(2-(((S)-2-amino-5-(tert-butoxi)-N-metil-5-oxopentanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (30 mg, 0,018 mmol, 1,0 eq) y éster Mal-PEG12-NHS (18,31 mg, 0,027 mmol, 1,5 eq), se obtuvo 1-(2-((S)-40-(3-(tert-butoxi)-3-oxopropil)-42-metil-38,41-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,42-diazatritetracontan-43-il)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2255,0400; Rt=2,97 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-((S)-40-(2-carboxietil)-42-metil-38,41-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,42-diazatritetracontan-43-il)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L72-P1)



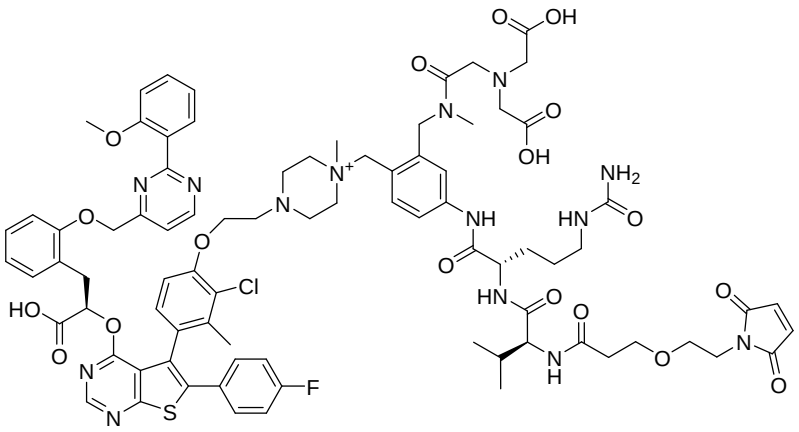
[591] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(2-((S)-40-(3-(tert-butoxi)-3-oxopropil)-42-metil-38,41-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,42-diazatritetracontan-43-il)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io se obtuvo (20,1 mg, 8,91 µmmol, 1 eq), 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-((S)-40-(2-carboxietil)-42-metil-38,41-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,42-diazatritetracontan-43-il)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: [M]+= 2173,9199; Rt=2,40 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(2-((2-(bis(2-(tert-butoxi)-2-oxoetil)amino)-N-metilacetamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[592] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 5** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (17,0 mg, 0,011 mmol, 1,0 eq) y bis(2-(tert-butoxi)-2-oxoetil)glicina (10,97 mg, 0,017 mmol, 1,5 eq), se obtuvo 1-(2-((2-(bis(2-(tert-butoxi)-2-oxoetil)amino)-N-metilacetamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1784,8000; Rt=3,31 min (5 min, método ácido).

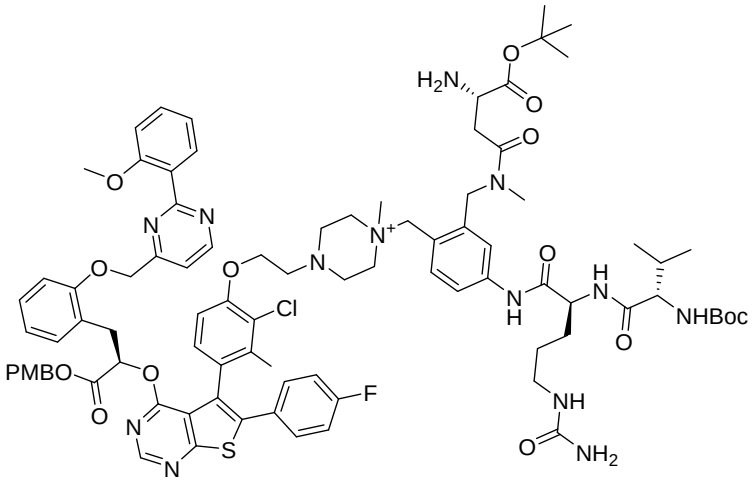
Síntesis de 1-(2-((2-(bis(carboximetil)amino)-N-metilacetamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L67-P1)



[593] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(2-((2-(bis(2-(tert-butoxi)-2-oxoetil)amino)-N-metilacetamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (9,2 mg, 5,12 µmmol, 1 eq), se obtuvo 1-(2-((2-(bis(carboximetil)amino)-N-metilacetamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1647,6100; Rt=2,28 min (5 min, método ácido).

Procedimiento general 7

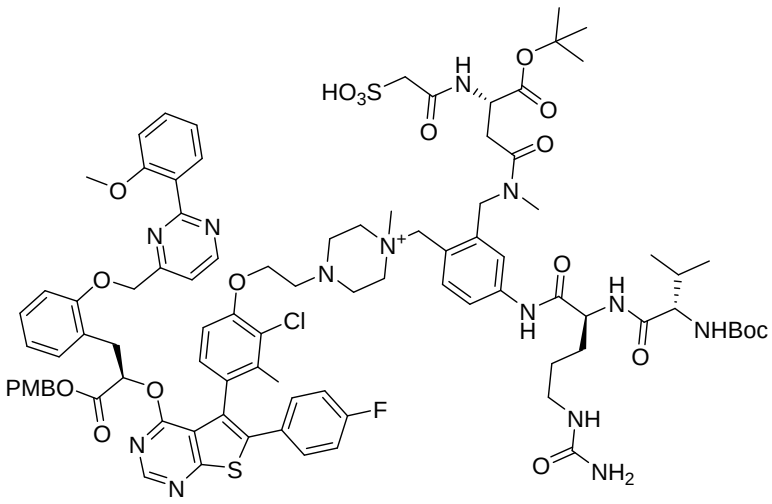
Síntesis de 1-(2-(((S)-3-amino-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxobutanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[594] Los reactivos se usaron como solución madre en DMF. A ácido (S)-3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-4-(tert-butoxi)-4-oxobutanoico (8,04 mg, 161 µL, 0,020 mmol, 1,2 equiv.) y hexafluorofosfato (V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (6,81 mg, 681 µL, 0,018 mmoles, 1,1 equiv.) se agregó DIPEA (22,68 µL, 0,130 mmoles, 8,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 10 min, se agregó 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (30 mg, 353 µL, 0,016 mmoles, 1,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 45 min, se agregó dimetilamina (163 µl, 0,326 mmol). Después de dejarse en reposo durante 16 horas, se agregó DMSO (2 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(2-(((S)-3-amino-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxobutanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1670,2300; Rt=2,69 min (5 min, método ácido).

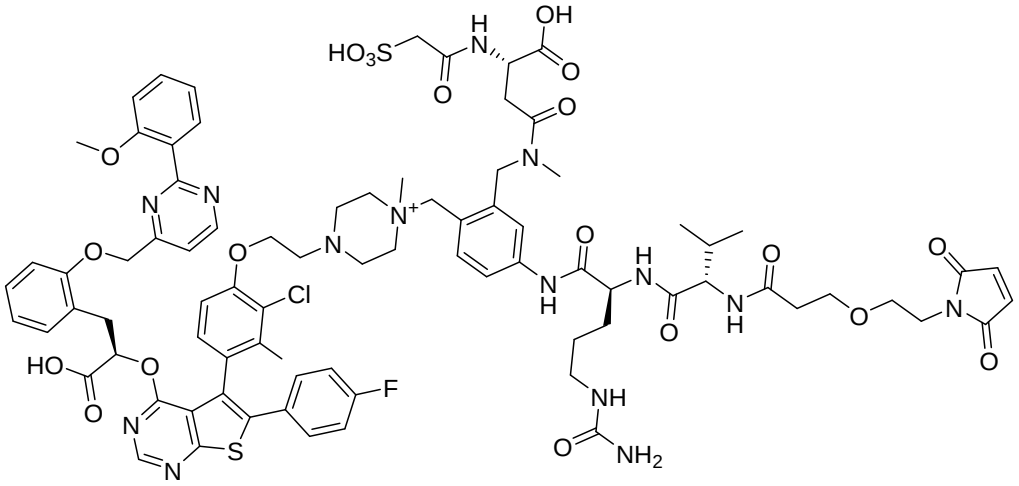
Síntesis de 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-(2-sulfoacetamido)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-

1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



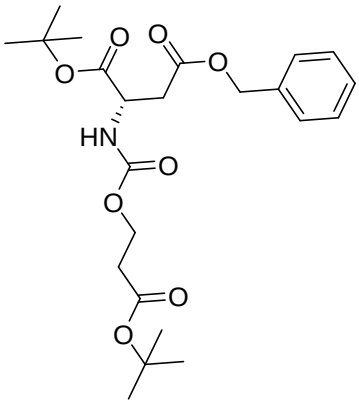
[595] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 6** con 1-(2-(((S)-3-amino-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxobutanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (20,6 mg, 10,23 µmol, 1 eq), se obtuvo 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-(2-sulfoacetamido)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1792,6899; Rt=3,17 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-(2-sulfoacetamido)propanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L79-P1)



[596] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-(2-sulfoacetamido)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (25,3 mg, 0,012 mmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-(2-sulfoacetamido)propanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1711,5699; Rt=2,48 min (5 min, método ácido).

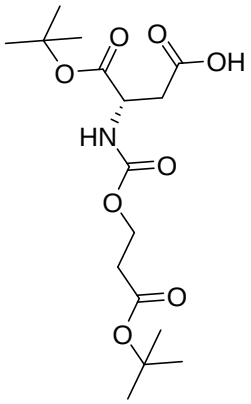
Síntesis de ((3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo)



[597] A 3-hidroxipropanoato de tert-butilo (111 mg, 0,760 mmol, 1 equiv.) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (289 mg, 0,950 mmol, 1,2 equiv.) disuelto en DMF (2 mL) se agregó DIPEA (0,221 mL, 1,267 mmoles, 2,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 1 hr, se agregó L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (200 mg, 0,633 mmol). Después de dejarse en reposo durante 16 hr, se agregó DMSO (4 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-

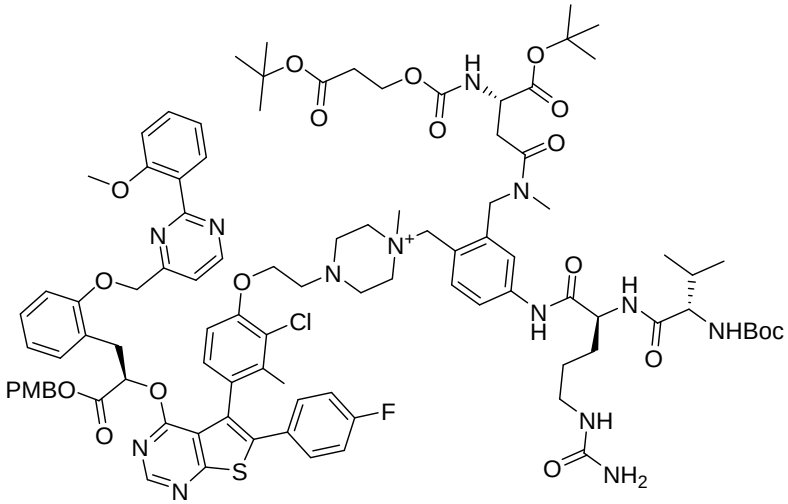
HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo ((3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo). HRMS: [M+H]+=452,4; Rt=2,68 min (5 min, método ácido).

Síntesis de ácido ((S)-4-(tert-butoxi)-3-(((3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)amino)-4-oxobutanoico



[598] A ((3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (52,7 mg, 0,117 mmol) disuelto en MeOH (2 mL) se agregó hidróxido de paladio (8,20 mg, 0,012 mmol, 0,1 equiv.). La atmósfera de la reacción se cambió por hidrógeno. Después de agitar durante 16 hr, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite. El material filtrado se retiró al vacío para obtener ((3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo).

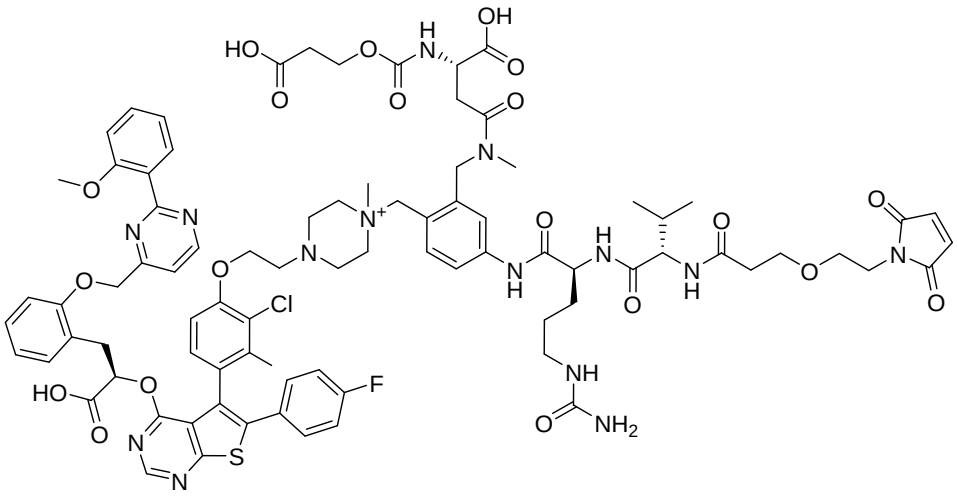
Síntesis de 1-(2-((S)-5-(tert-butoxicarbonil)-2,13,13-trimetil-3,7,11-trioxo-8,12-dioxa-2,6-diazatetradecil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[599] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 7** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-

((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (20 mg, 235 µL, 0,011 mmol, 1 eq) y ((3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (7,84 mg, 204 µL, 0,022 mmol, 2 equiv.), se obtuvo 1-(2-((S)-5-(tert-butoxicarbonil)-2,13,13-trimetil-3,7,11-trioxo-8,12-dioxa-2,6-diazatetradecil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1842,8000; Rt=3,23 min (5 min, método ácido).

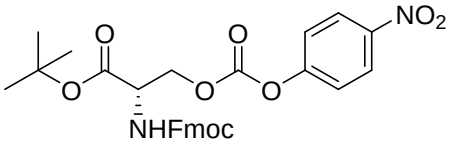
Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-3-carboxi-3-(((2-carboxietoxi)carbonil)amino)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L102-P1)



[600] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(2-((S)-5-(tert-butoxicarbonil)-2,13,13-trimetil-3,7,11-trioxo-8,12-dioxa-2,6-diazatetradecil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (17,6 mg, 0,008 mmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-3-carboxi-3-(((2-carboxietoxi)carbonil)amino)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-

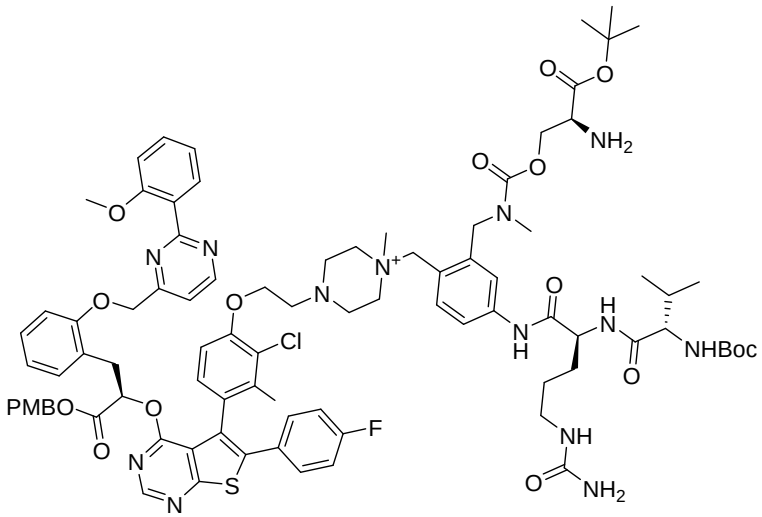
ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1705,6200; Rt=2,41 min (5 min, método ácido).

Síntesis de N-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-O-((4-nitrofenoxi)carbonil)-L-serinato de tert-butilo



[601] A (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-serinato de tert-butilo (300 mg, 0,782 mmol, 1 equiv.) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (357 mg, 1,174 mmol, 1,5 equiv.) disuelto en DMF (2 mL) se agregó DIPEA (0,136 mL, 0,782 mmoles, 1,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 16 hr, se agregó DMSO (4 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo N-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-O-((4-nitrofenoxi)carbonil)-L-serinato de tert-butilo. HRMS: M+= 566,4; Rt=3,01 min (5 min, método ácido).

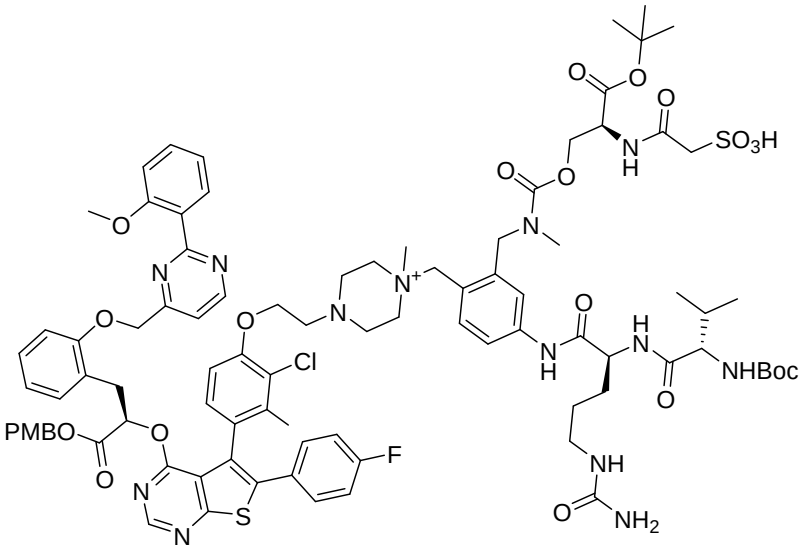
Síntesis de 1-(2-(((((S)-2-amino-3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[602] A N-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-O-((4-nitrofenoxi)carbonil)-L-serinato de tert-butilo (7,14 mg, 143 µL, 0,013mmol, 1,2 equiv.) y 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (20 mg, 235 µL, 0,011 mmol, 1,0 equiv.) se agregó DIPEA (15,1 µL, 0,087 mmoles, 8,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 16 hr, se

agregó dimetilamina (109 µl, 0,217 mmol, 20 equiv.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hr. Se agregó DMSO (4 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(2-(((((S)-2-amino-3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1686,7200; Rt=2,71 min (5 min, método ácido).

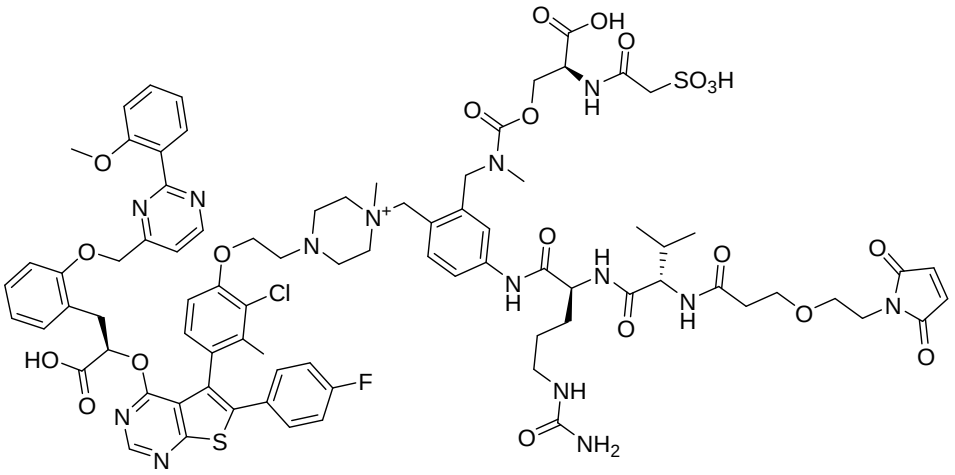
Síntesis de 1-(2-(((((S)-3-(tert-butoxi)-3-oxo-2-(2-sulfoacetamido)propoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[603] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 6** con 1-(2-(((((S)-2-amino-3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (22,9 mg, 0,011 mmol, 1 eq), se obtuvo 1-(2-(((((S)-3-(tert-butoxi)-3-oxo-2-(2-sulfoacetamido)propoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-

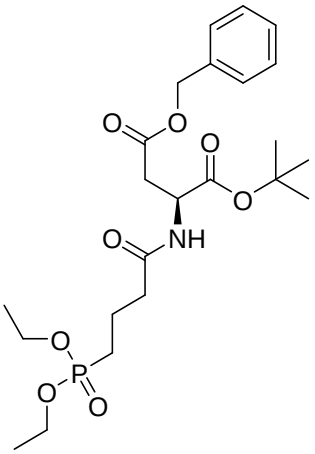
oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1808,6899; Rt=3,18 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((((S)-2-carboxi-2-(2-sulfoacetamido)etoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L77-P1)



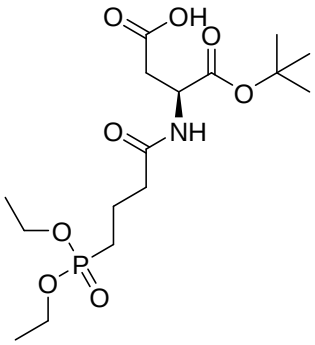
[604] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(2-(((((S)-2-amino-3-(tert-butoxi)-3-oxopropoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (15,3 mg, 7,11 µmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((((S)-2-carboxi-2-(2-sulfoacetamido)etoxi)carbonil)(metil)amino)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1727,5800; Rt=2,47 min (5 min, método ácido).

Síntesis de (4-(dietoxifosforil)butanoil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo)



[605] A L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (200 mg, 0,633 mmol, 1,0 equiv.) y ácido 4-(dietoxifosforil)butanoico (213 mg, 0,950 mmol, 1,5 equiv.) disuelto en DMF (2 mL) se agregó diciclohexilmetandiimina (157 mg, 0,760 mmol, 1,2 equiv.), 1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-1-ol hidrato (146 mg, 0,950 mmol, 1,5 equiv.) y DIPEA (0,110 mL, 0,633 mmol, 1,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 16 hr, se agregó DMSO (4 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo (4-(dietoxifosforil)butanoil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo). HRMS: [M+H]+=486,4; Rt=2,15 min (5 min, método ácido).

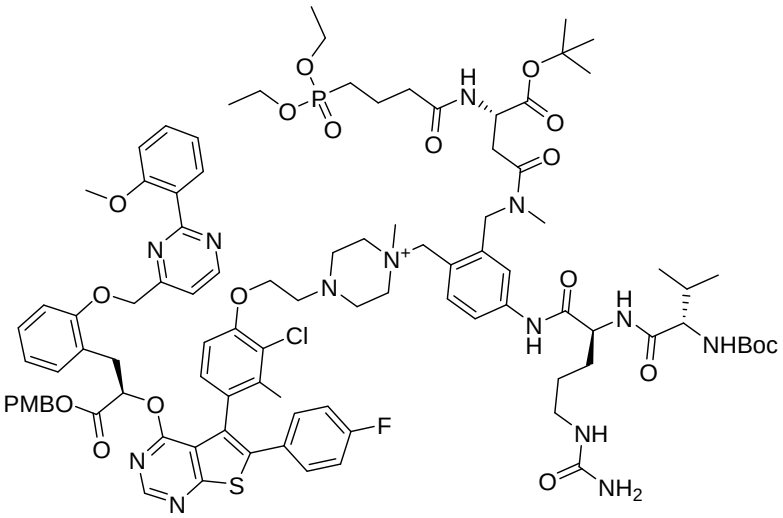
Síntesis de ácido (S)-4-(tert-butoxi)-3-(4-(dietoxifosforil)butanamido)-4-oxobutanoico



[606] A (4-(dietoxifosforil)butanoil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (YUBI5-040-EXP082-001 (100 mg, 0,206 mmol, 1,0 equiv.) disuelto en MeOH (2 mL) se agregó hidróxido de paladio (14,46 mg, 0,021 mmol, 0,1 equiv.). La atmósfera de la reacción se cambió por hidrógeno. Después de agitar durante 16 hr, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite. El material filtrado se retiró al vacío para obtener ácido (S)-4-(tert-butoxi)-3-(4-(dietoxifosforil)butanamido)-4-oxobutanoico. HRMS: [M+H]+= 396,3; Rt=1,35 min (5 min, método ácido).

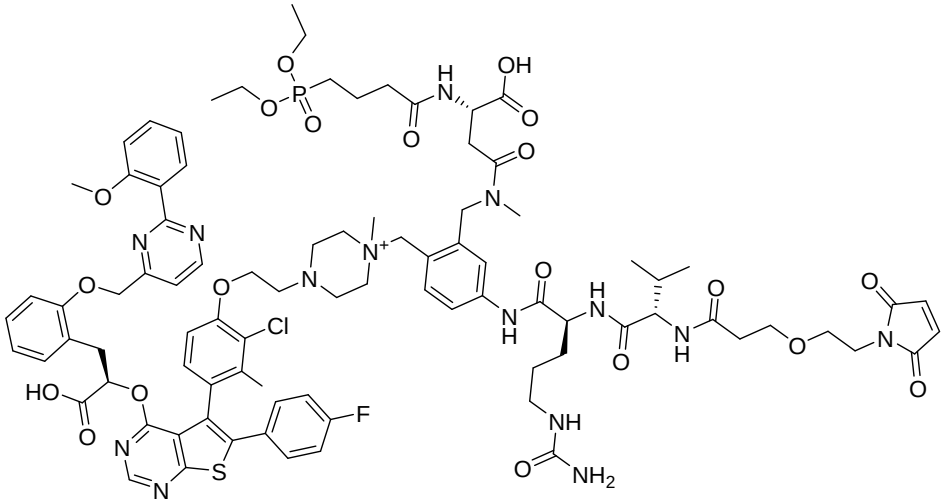
Síntesis de 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-3-(4-(dietoxifosforil)butanamido)-N-metil-4-oxobutanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-

metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



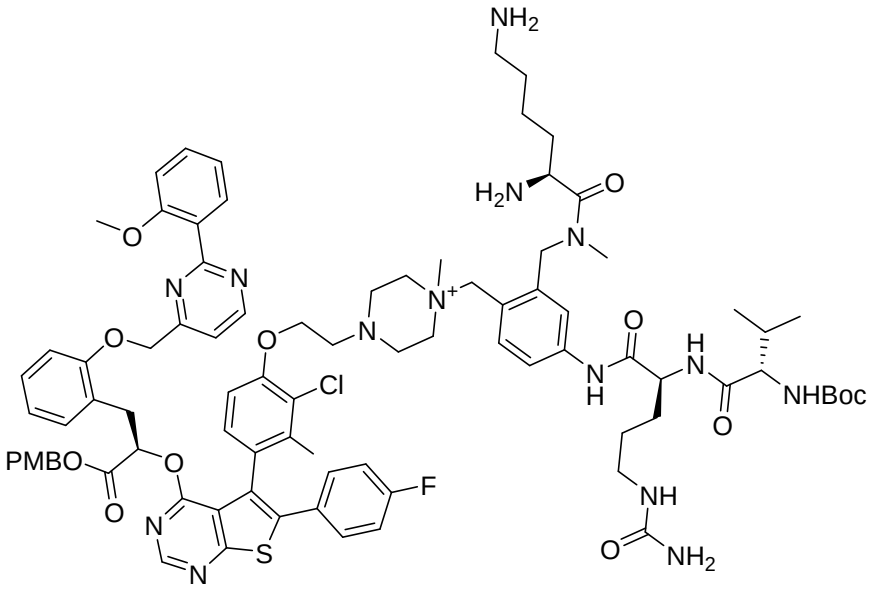
[607] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 7** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (30 mg, 353 µL, 0,016 mmol, 1 eq) y ácido (S)-4-(tert-butoxi)-3-(4-(dietoxifosforil)butanamido)-4-oxobutanoico (12,87 mg, 161 µl, 0,033 mmol, 2 equiv.), se obtuvo 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-3-(4-(dietoxifosforil)butanamido)-N-metil-4-oxobutanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. MS: M/2+= 940,3; Rt=2,60 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-3-carboxi-3-(4-(dietoxifosforil)butanamido)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L103-P1)



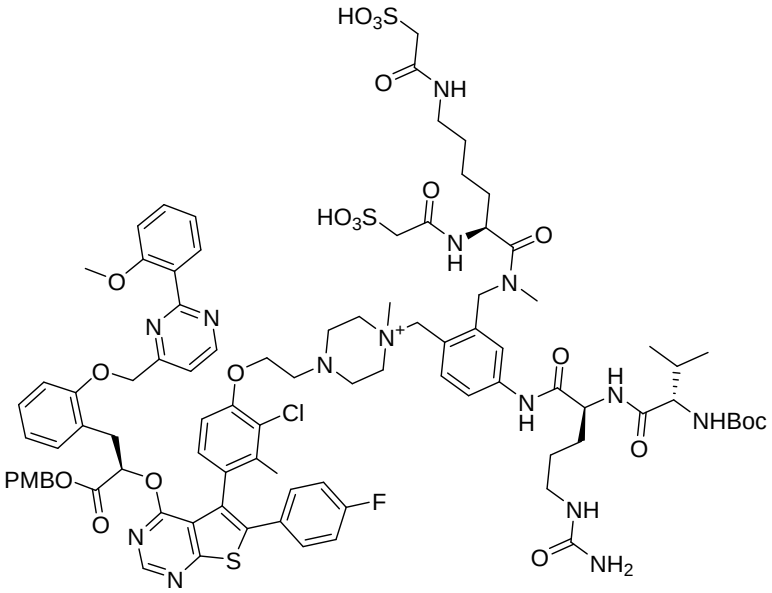
[608] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-3-(4-(dietoxifosforil)butanamido)-N-metil-4-oxobutanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (20 mg, 0,009 mmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-3-carboxi-3-(4-(dietoxifosforil)butanamido)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1795,6700; Rt=2,44 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-2,6-diamino-N-metilhexanamido)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



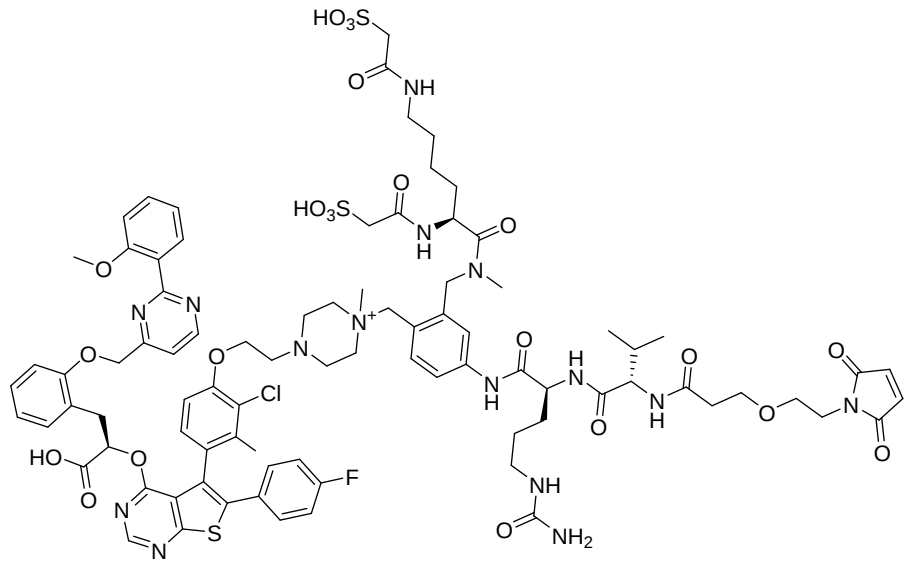
[609] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 7** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (20 mg, 0,011 mmol, 1 eq) y ácido (S)-2,5-bis((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)pentanoico (7,51 mg, 0,013 mmol, 1,2 eq), se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-2,6-diamino-N-metilhexanamido)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1627,4000; Rt=2,48 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-N-metil-2,6-bis(2-sulfoacetamido)hexanamido)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



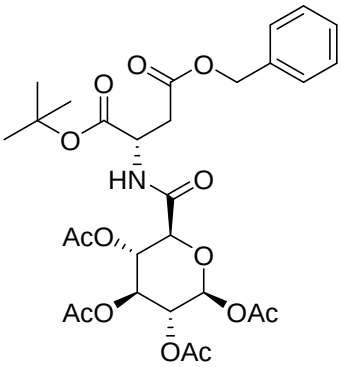
[610] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 6** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-2,6-diamino-N-metilhexanamido)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (9,7 mg, 0,0049 mmol, 1 eq), se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-N-metil-2,6-bis(2-sulfoacetamido)hexanamido)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1871,6700; Rt=3,02 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-N-metil-2,6-bis(2-sulfoacetamido)hexanamido)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L78-P1)



[611] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con –(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-N-metil-2,6-bis(2-sulfoacetamido)hexanamido)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (15 mg, 7,55 µmol, 1 eq), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-N-metil-2,6-bis(2-sulfoacetamido)hexanamido)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1846,6000; Rt=2,49 min (5 min, método ácido).

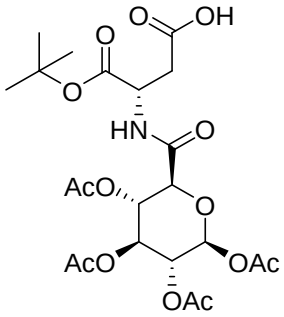
Síntesis de ((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo)



[612] A ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (344 mg, 0,950 mmol) y L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (300 mg, 0,950 mmol) disuelto en DMF (3,2 mL) se agregó DIPEA (0,165 mL, 0,950 mmol, 1,0 equiv.), 1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-1-ol hidrato (154 mg, 0,997 mmol, 1,05 equiv.) y clorhidrato de 3-(((etilimino)metilen)amino)-N,N-dimetilpropan-1-amina (191 mg, 0,997 mmol, 1,05 equiv.).

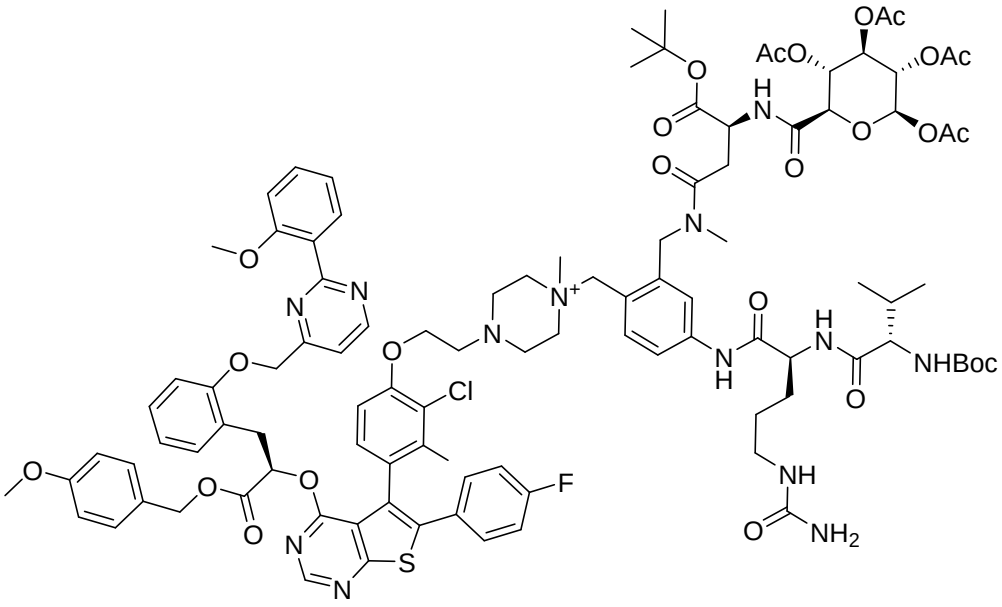
Después de dejarse en reposo durante 16 hr, se agregó DMSO (4 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo ((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo). HRMS: M+=641,5; Rt=2,55 min (5 min, método ácido).

Síntesis de ácido (S)-4-(tert-butoxi)-4-oxo-3-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)butanoico



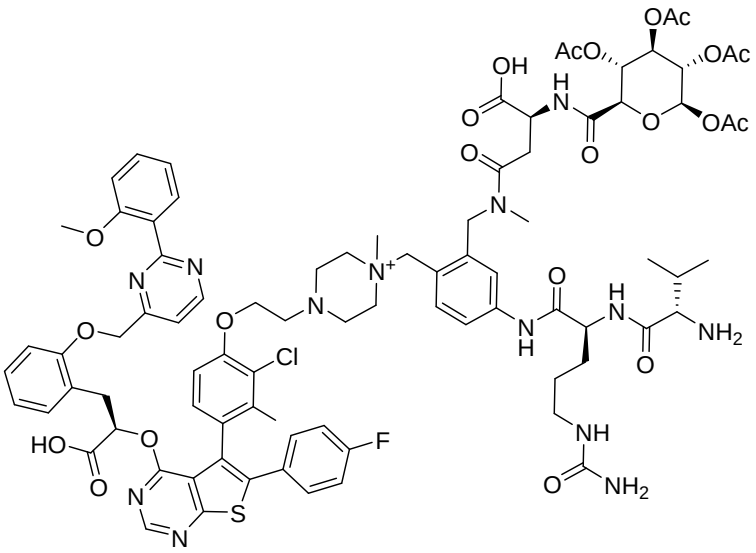
[613] A ((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (100 mg, 0,160 mmol, 1,0 eq) disuelto en MeOH (2 mL) se agregó hidróxido de paladio (11,26 mg, 0,016 mmol, 0,1 equiv.). La atmósfera de la reacción se cambió por hidrógeno. Después de agitar durante 16 hr, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite. El material filtrado se retiró al vacío para obtener ácido (S)-4-(tert-butoxi)-4-oxo-3-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)butanoico. HRMS: [M-H]-= 532,3, Rt=1,71 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



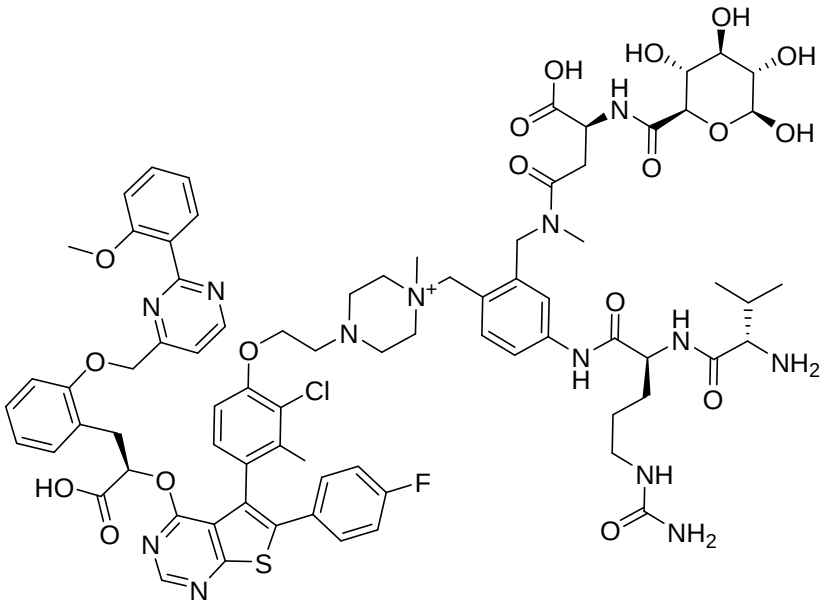
[614] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 7** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (30 mg, 0,016 mmol, 1,0 eq) y ácido (S)-4-(tert-butoxi)-4-oxo-3-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)butanoico (12,2 mg, 968 µL, 0,023 mmol, 1,4 eq), se obtuvo 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=2014,7800; Rt=3,21 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



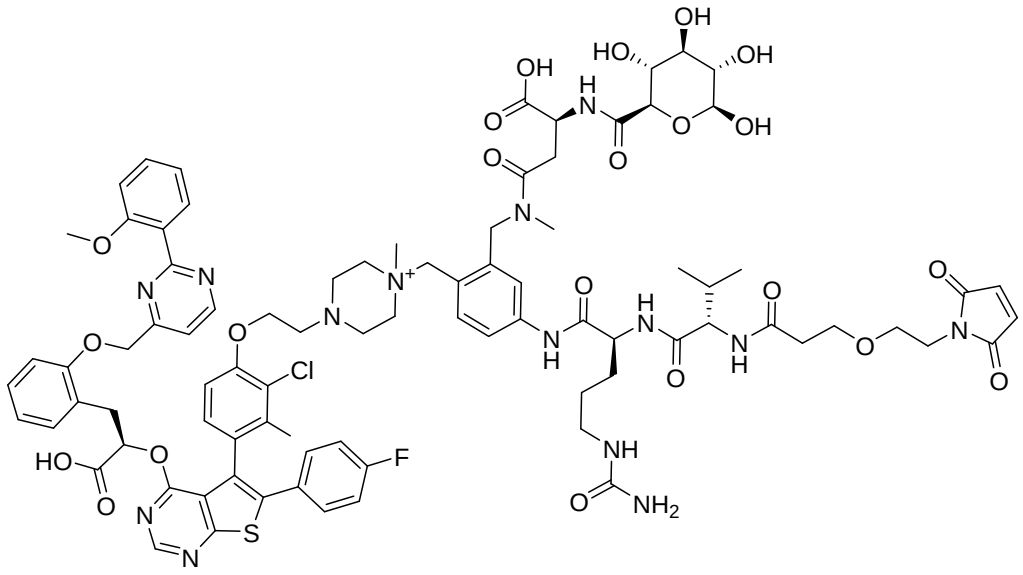
[615] A 1-(2-(((S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (22,7 mg, 0,009 mmoles, 1,0 equiv.) disuelto en DCM (32mL) se agregó TFA (0,67 mL). Después de agitar durante 45 min, el solvente se eliminó al vacío para obtener 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1738,6200; Rt=2,30 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



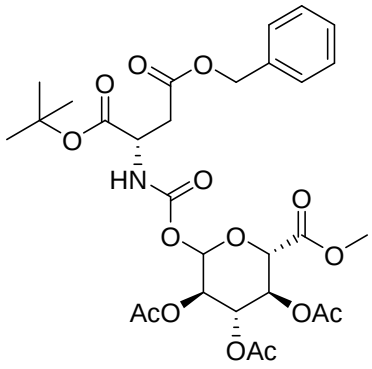
[616] A 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-tetraacetoxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (22,7 mg, 0,009 mmoles, 1,0 equiv.) disuelto en THF (1 mL) y MeOH (1 mL) se agregó hidróxido de litio (5,04 mg, 0,120 mmol, 10 equiv.). Después de agitar durante 2 horas, el solvente se eliminó al vacío. Se agregó agua (1 mL), TFA (0,2 mL), MeCN (1 mL) y DMSO (4 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1570,5900; Rt=2,02 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)propanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L68-P1)



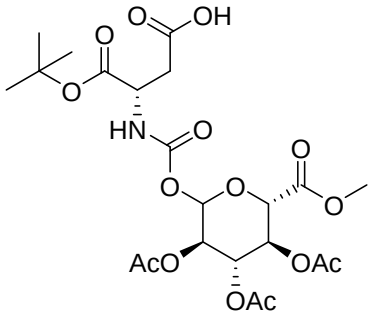
[617] A 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (10,8 mg, 0,0056 mmoles, 1,0 equiv.) y 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (5,25 mg, 0,017 mmol, 3,5 equiv.) disuelto en DMF (1 mL) se agregó DIPEA (7,86 µL, 0,045 mmol, 8 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 1,5 hora, se agregó DMSO (2mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((S)-3-carboxi-N-metil-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxamido)propanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1765,6500; Rt=2,31 min (5 min, método ácido).

Síntesis de ((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo)



[618] A triacetato de ((3R,4S,5S,6S)-2-hidroxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (254 mg, 0,760 mmol, 1,2 equiv.) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (289 mg, 0,950 mmol, 1,5 equiv.) disuelto en DMF (2 mL) se agregó DIPEA (0,221 mL, 1,267 mmol, 2,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 1 hr, se agregó L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (200 mg, 0,633 mmol, 1,0 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 16 hr, se agregó DMSO (6 mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo ((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo). HRMS: [M-H]-= 638,4; Rt=2,61 min (5 min, método ácido).

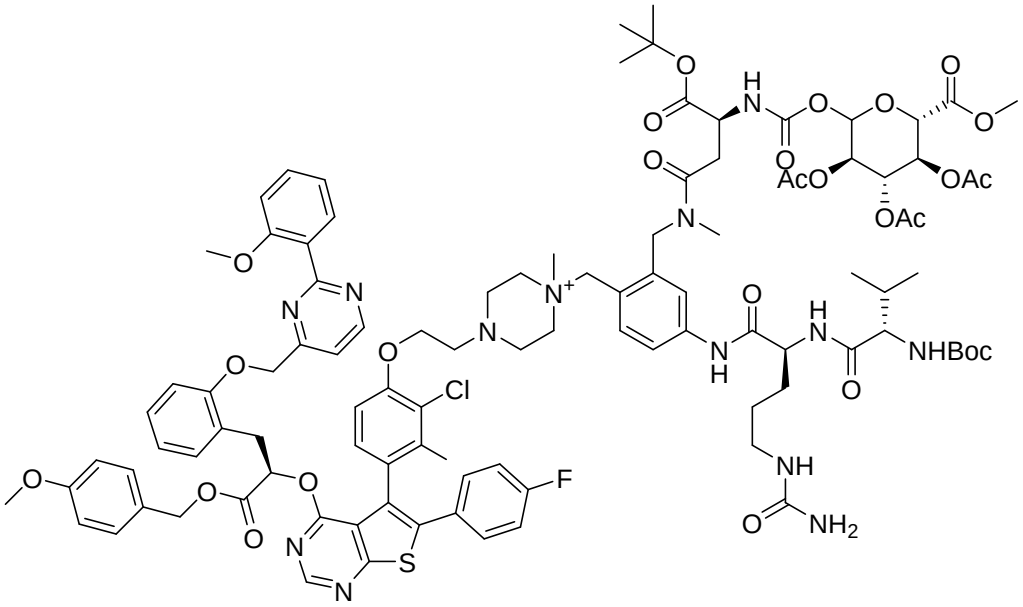
Síntesis de ácido (3S)-4-(tert-butoxi)-4-oxo-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)butanoico



[619] A ((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)-L-aspartato de 4-bencilo 1-(tert-butilo) (50 mg, 0,078 mmol, 1,0 eq) disuelto en MeOH (2 mL) se agregó hidróxido de paladio (5,49 mg, 7,82 µmol, 0,1 equiv.). La atmósfera de la reacción se cambió por hidrógeno. Después de agitar durante 16 hr, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite. El material filtrado se retiró al vacío para obtener ácido (3S)-4-(tert-butoxi)-4-oxo-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)butanoico. HRMS: [M-H]-: 548,4, Rt=1,79 min (5 min, método ácido).

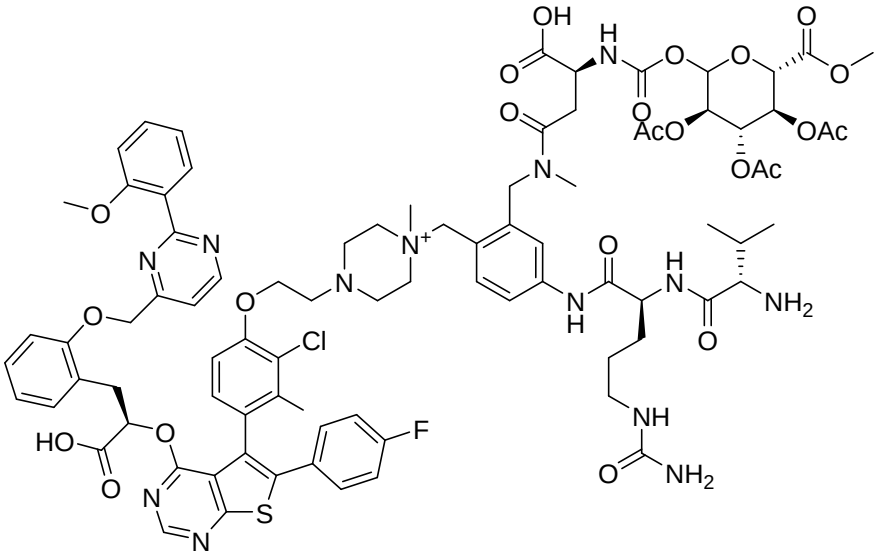
Síntesis de 1-(2-(((3S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)butanamido)metil)-4-((S)-

2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



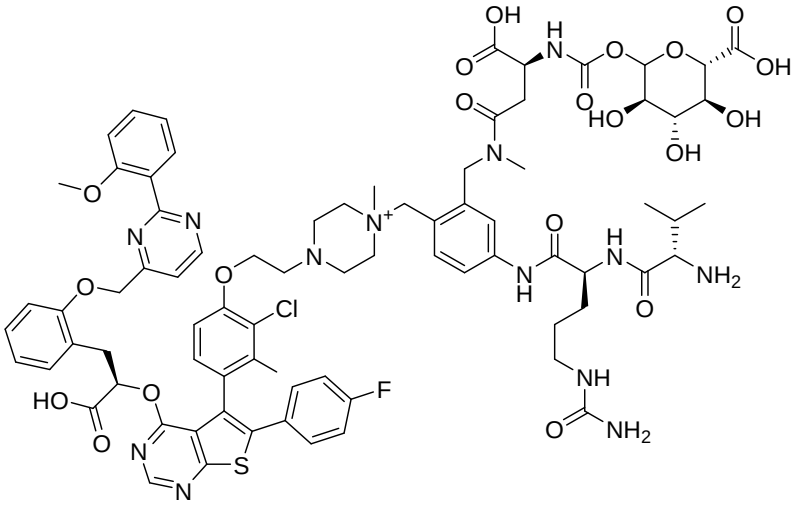
[620] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 7** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (30 mg, 0,016 mmol, 1,0 eq) y ácido (3S)-4-(tert-butoxi)-4-oxo-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)butanoico (12,5 mg, 0,250 mL, 0,023 mmol ,1,4 eq), se obtuvo 1-(2-(((3S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=2030,7900; Rt=3,19 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((3S)-3-carboxi-N-metil-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



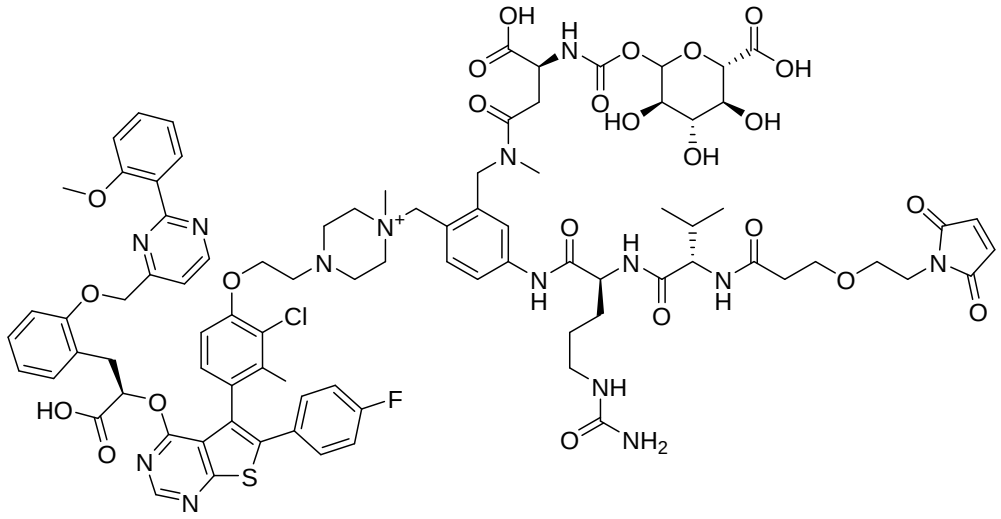
[621] A 1-(2-(((3S)-4-(tert-butoxi)-N-metil-4-oxo-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)butanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (25,8 mg, 10,86 µmol, 1,0 equiv.) disuelto en DCM (2 mL) se agregó TFA (0,67 mL). Después de agitar durante 2 hrs, el solvente se eliminó al vacío para obtener 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((3S)-3-carboxi-N-metil-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1754,6200; Rt=2,31 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((3S)-3-carboxi-3-(((((3R,4S,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)-N-metilpropanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



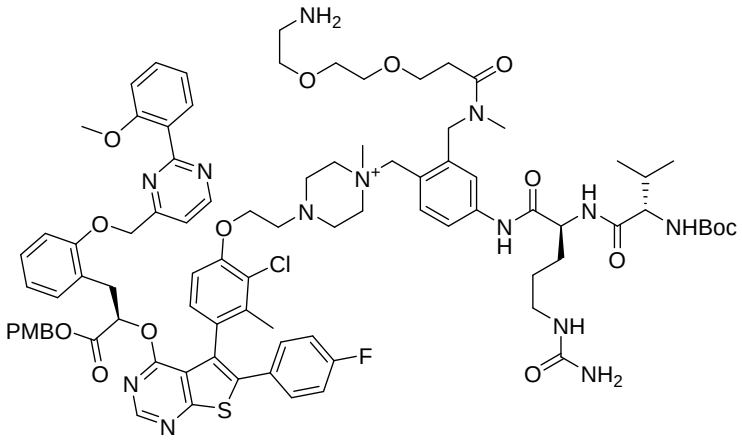
[622] A 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((3S)-3-carboxi-N-metil-3-(((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)propanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (26 mg, 0,012 mmol, 1,0 equiv.) disuelto en THF (1 mL) y MeOH (1 mL) se agregó hidróxido de litio (5,20 mg, 0,124 mmol, 10 equiv.). Después de agitar durante 2 horas, el solvente se eliminó al vacío. Agua (1 mL), TFA (0,2 mL), MeCN (1 mL) y DMSO (4 mL) se agregaron y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((3S)-3-carboxi-3-(((((3R,4S,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)-N-metilpropanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1614,5800; Rt=2,04 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((3S)-3-carboxi-3-(((((3R,4S,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L69-P1)



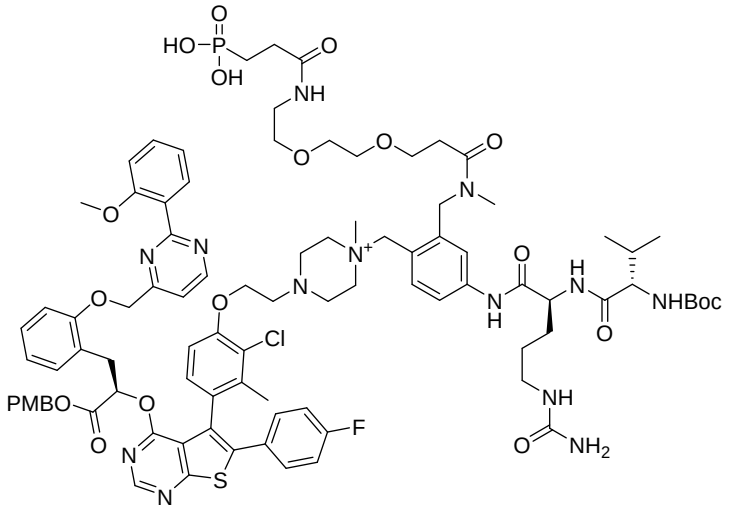
[623] A 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((3S)-3-carboxi-3-(((((3R,4S,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)-N-metilpropanamido)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (10 mg, 5,11 µmol, 1,0 equiv.) y 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (4,75 mg, 0,015 mmol, 3,5 equiv.) disuelto en DMF (1 mL) se agregó DIPEA (7,12 µl, 0,041 mmol, 8 equiv.). Después de dejarse en reposo durante 1,5 hora, se agregó DMSO (2mL) y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-70% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((3S)-3-carboxi-3-(((((3R,4S,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)carbonil)amino)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=1809,6300; Rt=2,32 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(2-((3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



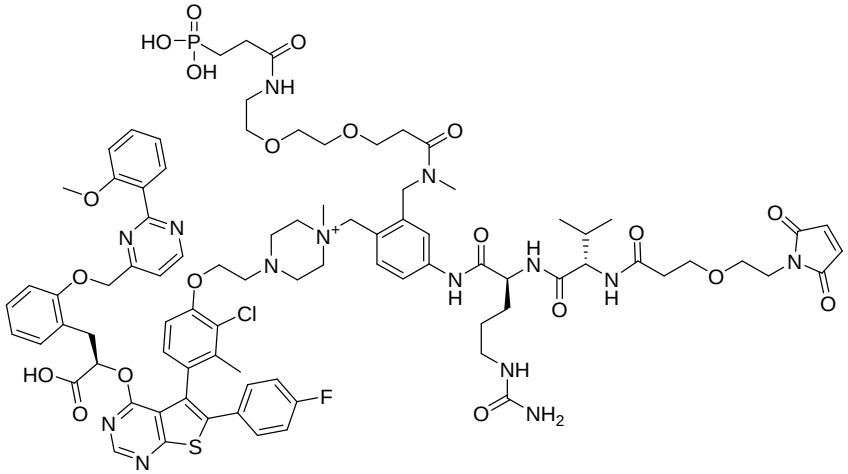
[624] Una mezcla de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (45 mg, 0,026 mmol), ácido 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azatridecan-13-oico (12 mg, 0,030 mmol), HBTU (12 mg, 0,032 mmol), y DIPEA (0,023 mL, 0,13 mmol) en DMF (1 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregó Me_2NH (2M en THF, 0,065 mL, 0,13 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregó más Me_2NH (2M en THF, 0,1 mL, 0,2 mmol). Se continuó la agitación de la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, se diluyó con DMSO (3 mL), y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (MeCN/H_2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(2-((3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1658,7200, Rt=2,57 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3,13-dioxo-15-fosfono-6,9-dioxa-2,12-diazapentadecil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



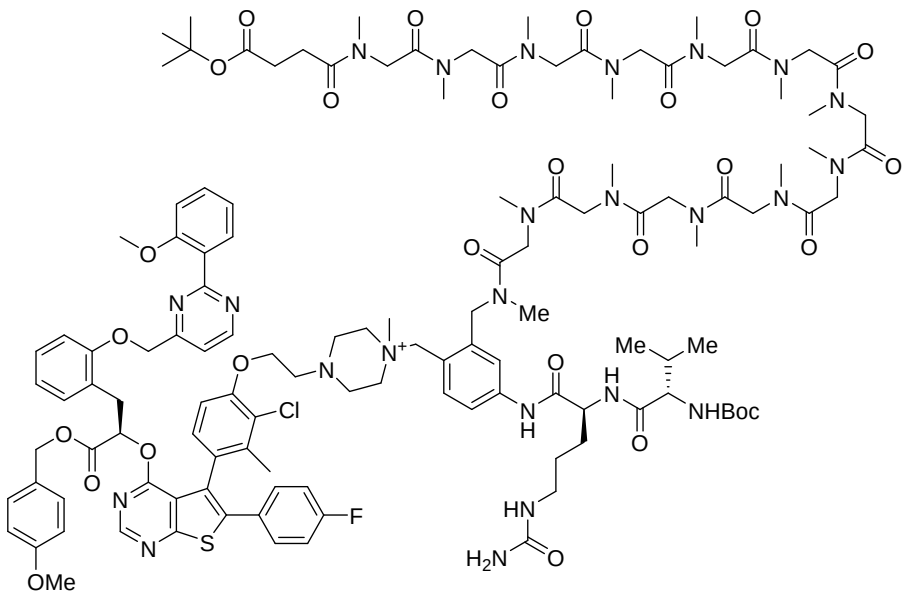
[625] Una mezcla de ácido 3-fosfopropiónico (11 mg, 0,071 mmol), HBTU (27 mg, 0,071 mmol), y DIPEA (0,060 mL, 0,34 mmol) en DMF (0,5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Esta mezcla se agregó a una solución de 1-(2-((3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)-N-metilpropanamido)metil)-4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (40 mg, 0,021 mmol) y DIPEA (0,010 mL, 0,057 mmol) en DMF (0,5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla se diluyó con DMSO (3 mL), y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (MeCN/H_2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3,13-dioxo-15-fosfono-6,9-dioxa-2,12-diazapentadecil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1794,7100, Rt=2,78 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3,13-dioxo-15-fosfono-6,9-dioxa-2,12-diazapentadecil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L41-P1)



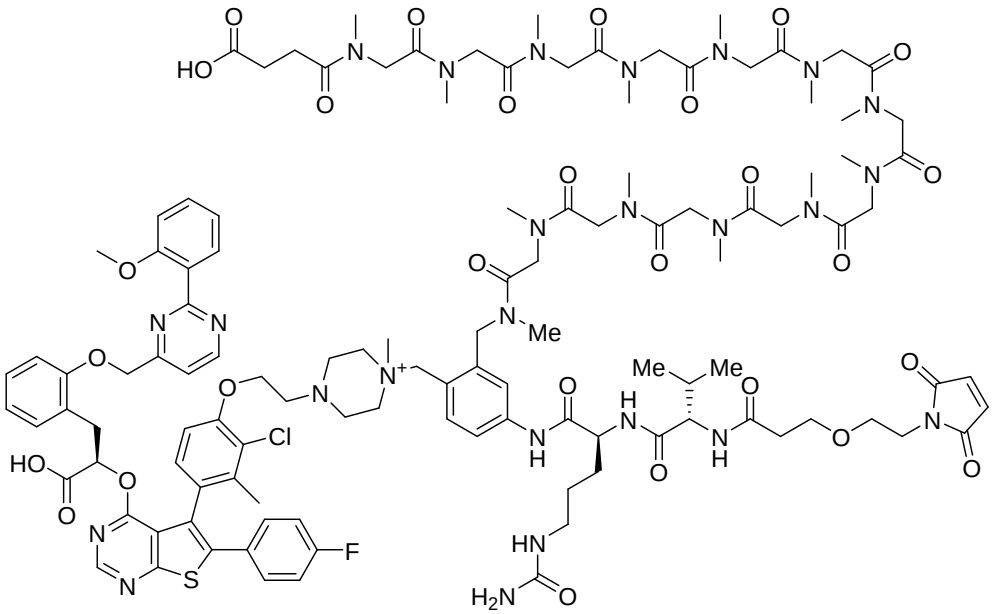
[626] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** (excepto que el producto después del primer paso con TFA/CH_2Cl_2 se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold [MeCN/H_2O, 0,1% de modificador NH_4OH]) con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3,13-dioxo-15-fosfono-6,9-dioxa-2,12-diazapentadecil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io, se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2-metil-3,13-dioxo-15-fosfono-6,9-dioxa-2,12-diazapentadecil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1769,4500, Rt=2,33 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,44,44-pentadecametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42-tetradecaoxo-43-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-tridecaazapentatetracontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



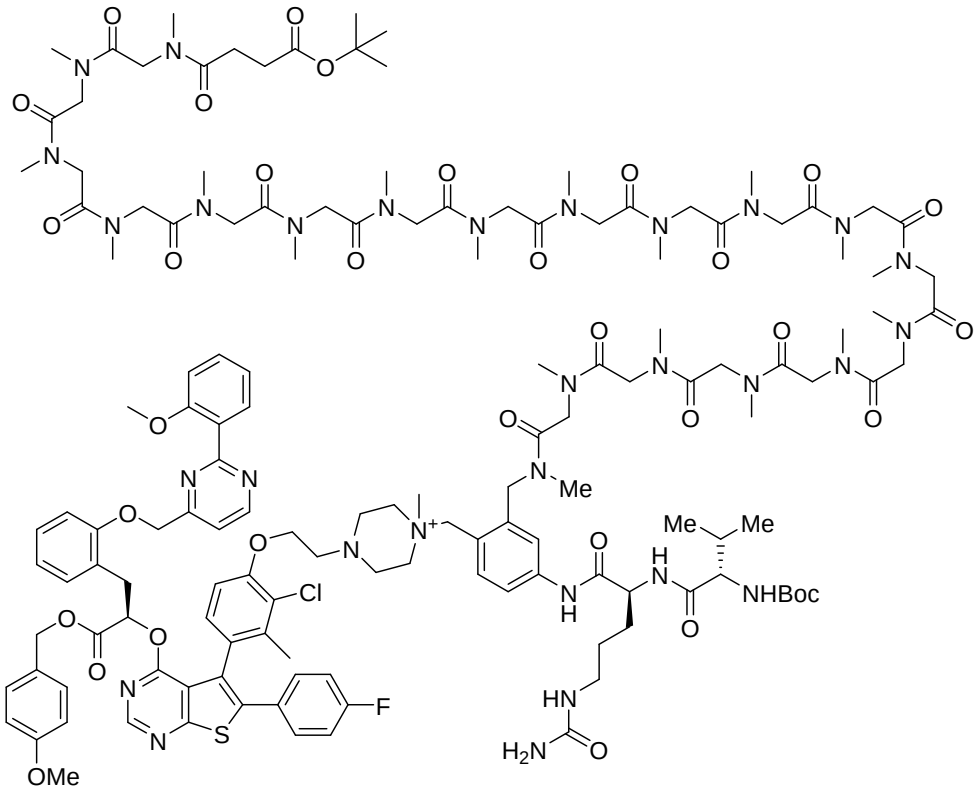
[627] A una solución agitada de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (43,6 mg, 0,025 mmol, 1,0 equiv.), ácido 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,42,42-tetradecametil-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-tridecaoxo-41-oxa-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaazatritetracontanoico (25,9 mg, 0,025 mmol, 1,0 equiv.), y HATU (10,5 mg, 0,028 mmol, 1,1 equiv.) en DMF (0,25 mL) se agregó DIPEA (22 µL, 0,126 mmol, 5,0 equiv.). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se diluyó con 1 mL de DMSO y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H_2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,44,44-pentadecametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42-tetradecaoxo-43-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-tridecaazapentatetracontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS M+ 2508,1499 Rt=2,78 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(2-(41-carboxi-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-tridecametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-tridecaoxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-tridecaazahentetracontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L35-P1)



[628] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,44,44-pentadecametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42-tetradecaoxo-43-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-tridecaazapentatetracontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (50,4 mg, 0,019 mmol, 1,0 equiv.), se obtuvo 1-(2-(41-carboxi-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-tridecametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-tridecaoxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-tridecaazahentetracontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ 2427,0400, Rt = 2,30 min. (5 min, método ácido).

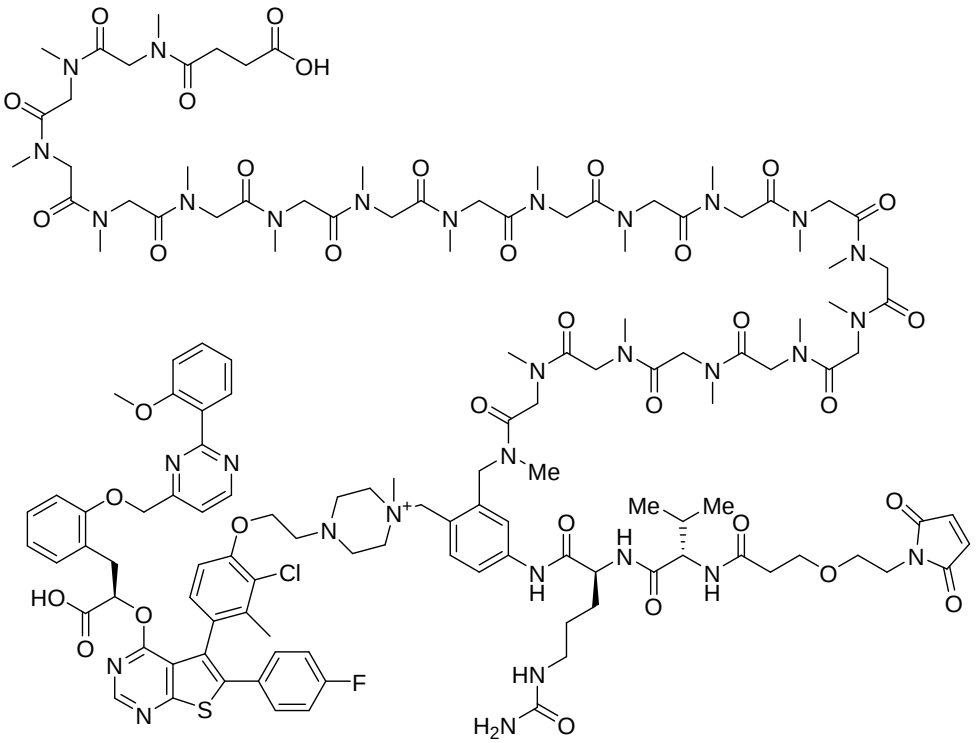
Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,62,62-henicosametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-icosaoxo-61-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-nonadecaazatrihexacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[629] A una solución agitada de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (31,9 mg, 0,018 mmol, 1,0 equiv.), ácido 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,60,60-icosametil-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58-nonadecaoxo-59-oxa-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54-octadecaazahenhexacontanoico (26,8 mg, 0,018 mmol, 1,0 equiv.), y HATU (7,7 mg, 0,020 mmol, 1,1 equiv.) en DMF (0,25 mL) se agregó DIPEA (16 µL, 0,092 mmol, 5,0 equiv.). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se diluyó con 1 mL de DMSO y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,62,62-henicosametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-icosaoxo-61-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-nonadecaazatrihexacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS M+ 2934,3601 Rt=2,73 min (5 min, método ácido).

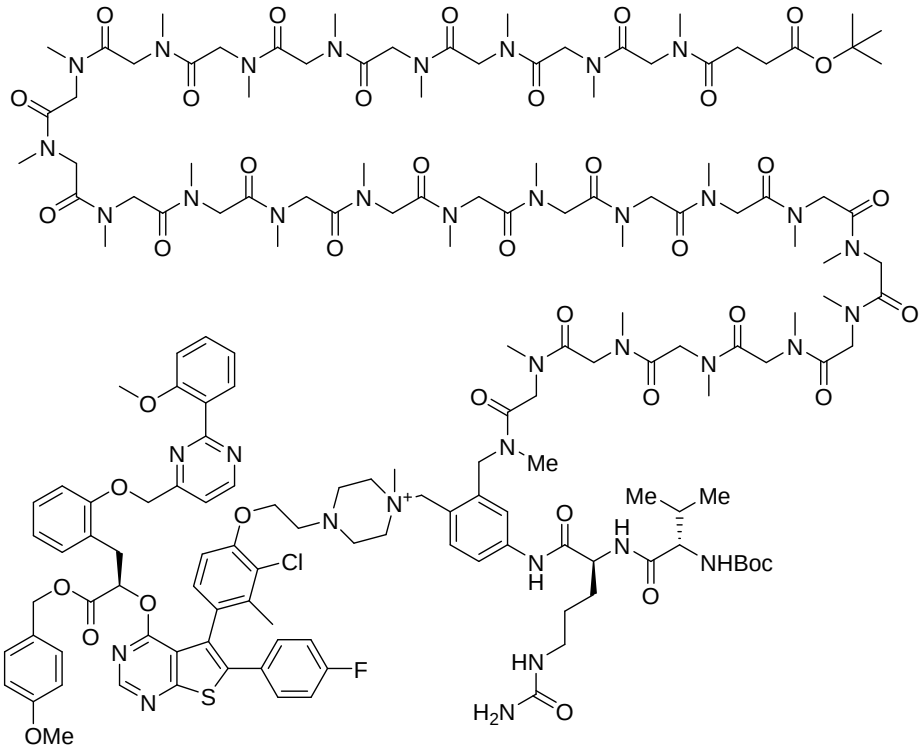
Síntesis de 1-(2-(59-carboxi-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-nonadecametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-nonadecaoxo-

2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-nonadecaazanonapentacontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L36-P1)



[630] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,62,62-henicosametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-icosaoxo-61-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-nonadecaazatrihexacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (45,5 mg, 0,015 mmol, 1,0 equiv.), se obtuvo 1-(2-(59-carboxi-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-nonadecametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-nonadecaoxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-nonadecaazanonapentacontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ 2853,2766, Rt = 2,20 min. (5 min, método ácido).

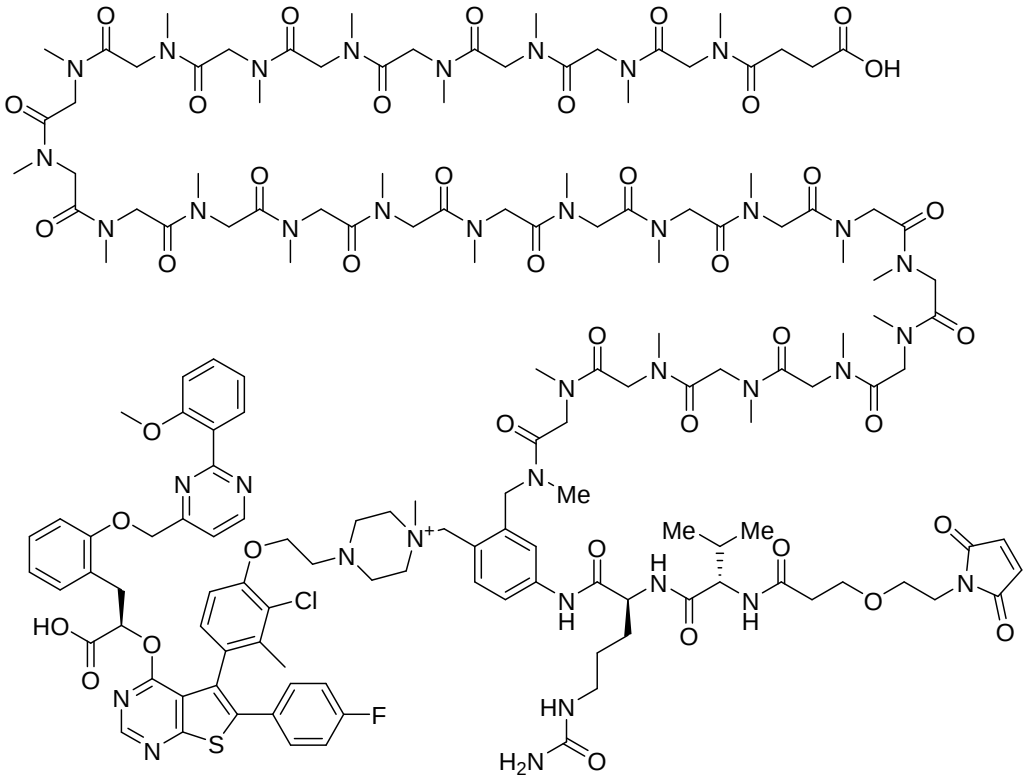
Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,80,80-heptacosametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-hexacosaoxo-79-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-pentacosaazahenoctacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[631] A una solución agitada de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (27,8 mg, 0,016 mmol, 1,0 equiv.), ácido 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,78,78-hexacosametil-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-pentacosaoxo-77-oxa-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-tetracosaazanonaheptacontanoico (30,2 mg, 0,016 mmol, 1,0 equiv.), y HATU (6,7 mg, 0,018 mmol, 1,1 equiv.) en DMF (0,25 mL) se agregó DIPEA (14 µL, 0,080 mmol, 5,0 equiv.). La

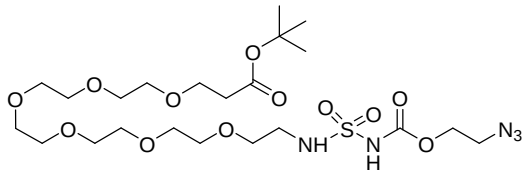
solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se diluyó con 1 mL de DMSO y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,80,80-heptacosametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-hexacosaoxo-79-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-pentacosaazahenoctacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS M+ 3360,5798 Rt=2,68 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(2-(77-carboxi-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-pentacosametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75-pentacosaoxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-pentacosaazaheptaheptacontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L37-P1)



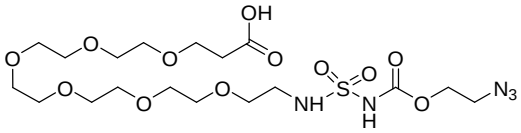
[632] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,80,80-heptacosametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-hexacosaoxo-79-oxa-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-pentacosaazahenoctacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (41,3 mg, 0,012 mmol, 1,0 equiv.), se obtuvo 1-(2-(77-carboxi-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-pentacosametil-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75-pentacosaoxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-pentacosaazaheptaheptacontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+ 3279,4678, Rt = 2,21 min. (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de tert-butilo



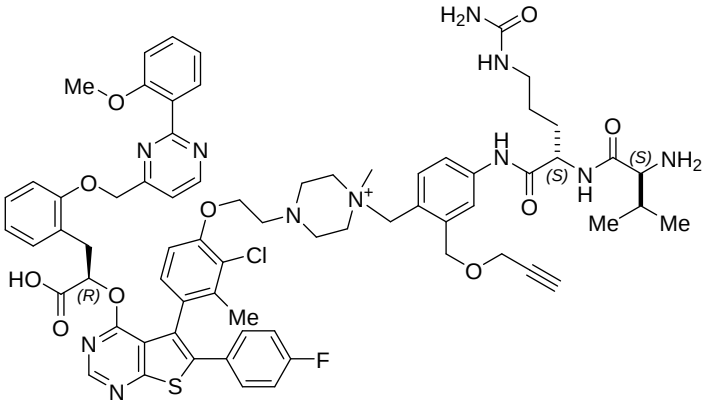
[633] A 2-azidoetan-1-ol (105 mg, 1,21 mmol) en CH_2Cl_2 (15 ml) se agregó cloruro sulfurisocianatídico (0,105 ml, 1,21 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min. Luego se agregó TEA (0,336 ml, 2,41 mmol) y 1-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de tert-butilo (518 mg, 1,27 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 1h y temperatura ambiente durante 2 h, luego se detuvo con NH_4Cl saturado, y HCl 1 N (2,4 mL). La fase acuosa se extrajo con $CH2Cl_2$ (5X). Las fases orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró por evaporación rotativa para dar un aceite traslúcido. La purificación por cromatografía flash (0-15% MeOH en CH_2Cl_2, detección ELSD) dio 1-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de tert-butilo como un aceite traslúcido (474 mg, 0,788 mmol): LCMS: M+NH4+=619,5, Rt=0,94 min (ácido, 2 min). 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,33 (s, 1H), 7,76 (s, 1H), 4,28 – 4,20 (m, 2H), 3,60 (td, J = 5,6, 5,0, 2,9 Hz, 4H), 3,55 – 3,45 (m, 22H), 3,16 – 3,04 (m, 2H), 2,46 – 2,38 (m, 2H), 1,41 (s, 9H).

Síntesis de ácido 1-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oico



[634] A 1-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de tert-butilo (145 mg, 0,241 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) a 0°C se agregó TFA (1 mL, 12,98 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,45 h, luego se concentró por evaporación rotativa en un baño de agua a 25°C y se secó bajo alto vacío durante 30 min. El residuo se secó de manera azeotrópica con tolueno anhidro (3X 2 mL), y se secó al vacío durante la noche para dar ácido 1-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oico como un aceite traslúcido (147 mg, 89% en peso en base al rendimiento teórico): LCMS: M+=546,3, 0,65 min (ácido, 2 min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,30 (s, 1H), 7,77 – 7,71 (m, 1H), 4,25 – 4,19 (m, 2H), 3,63 – 3,55 (m, 4H), 3,54 – 3,45 (m, 22H), 3,07 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,47 – 2,40 (m, 2H).

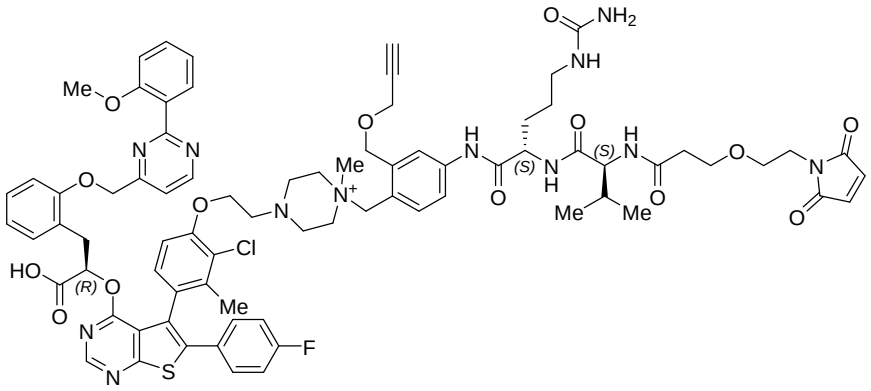
Síntesis de trifluoroacetato de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[635] A trifluoroacetato de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (321 mg, 0,210 mmol) a 0°C se agregó TFA en CH_2Cl_2 25% (12,3 mL, 40,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 1h, luego se concentró bajo alto vacío en un baño de agua a temperatura ambiente. El material crudo se diluyó con DMSO (3 mL) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (150 g, 10-80% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización se obtuvo

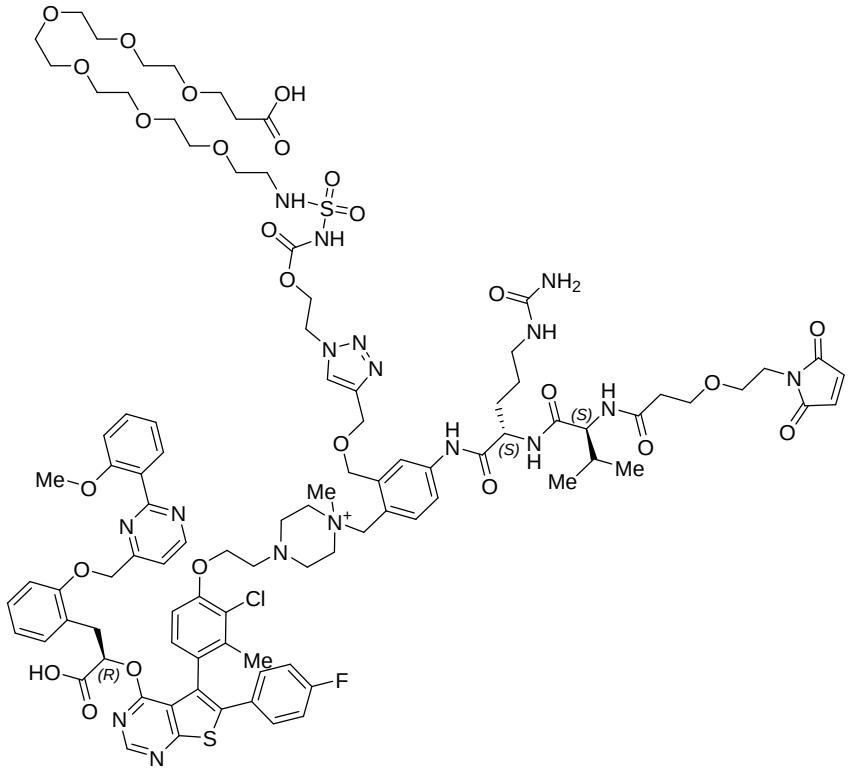
trifluoroacetato de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io como un polvo blanco (224 mg, 0,158 mmol): HRMS: M+=1304,5100, Rt=2,15 min (5 min ácido)

Síntesis de trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io



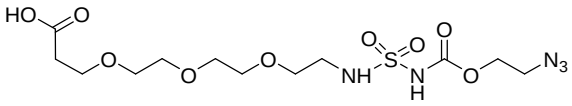
[636] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con trifluoroacetato de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (164 mg, 0,115 mmol) y éster Mal-Peg1-NHS (72 mg, 0,23 mmol), se obtuvo trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io como un polvo blanco (170 mg, 0,105 mmol), HRMS: M+ =1499,5699, Rt=2,45 min (5 min ácido); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 10,16 (s, 1H), 8,81 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,07 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,69 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 7,56 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,45 (dd, J = 7,5, 1,8 Hz, 1H), 7,42 – 7,29 (m, 3H), 7,24 (dd, J = 8,9, 5,4 Hz, 2H), 7,18 – 7,05 (m, 5H), 6,99 – 6,91 (m, 4H), 6,65 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,15 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 5,91 (s, 1H), 5,43 (dd, J = 9,8, 3,5 Hz, 1H), 5,23 – 5,12 (m, 2H), 4,54 (d, J = 11,2 Hz, 4H), 4,33 – 4,09 (m, 7H), 3,69 (s, 3H), 3,42 – 2,78 (m, 32H, superpuesto con DMSO), 2,39 – 2,20 (m, 2H), 1,91 – 1,81 (m, 1H), 1,77 (s, 3H), 1,46 (dd, J = 93,8, 31,3 Hz, 3H), 0,76 (dd, J = 13,8, 6,7 Hz, 6H); 19F RMN (376 MHz, DMSO-d6): -112,18 ppm

Síntesis de trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-(2-(((N-(20-carboxi-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L59-P1)



[637] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 2** con trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (32 mg, 0,021 mmol) y ácido 1-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oico (26,2 mg, 0,043 mmol), se obtuvo trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-(2-(((N-(20-carboxi-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io como un polvo blanco: HRMS: M+ =2044,7700, Rt=2,36 min (5 min ácido).

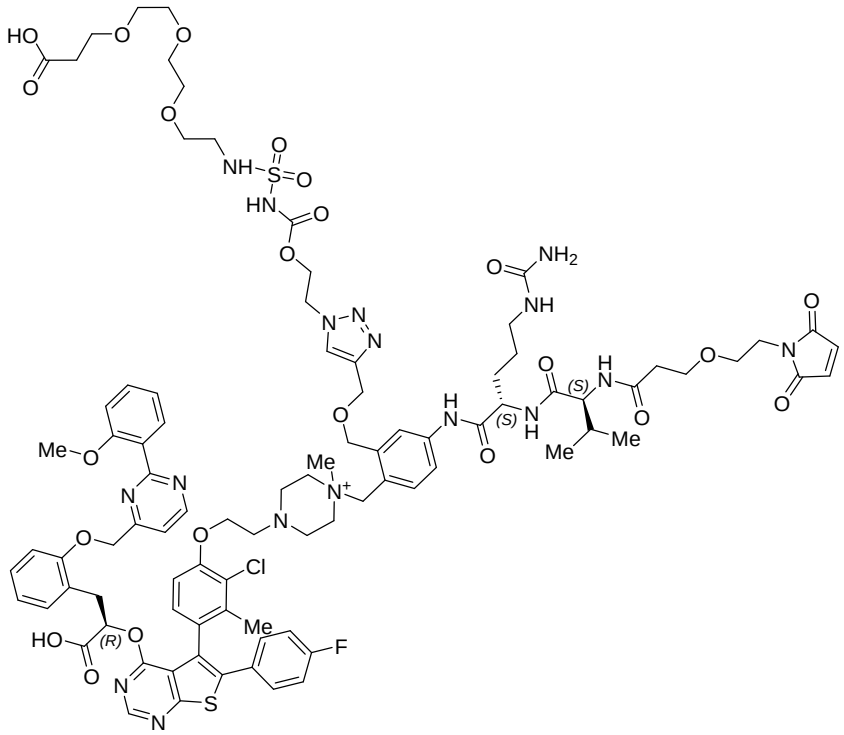
Síntesis de ácido 3-(2-(2-(2-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoico



[638] A 2-azidoetan-1-ol (105 mg, 1,21 mmol) en CH_2Cl_2 (15 ml) se agregó cloruro sulfurisocianatídico (0,105 ml, 1,21 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min. a 0°C y se agregó TEA (0,336 ml, 2,41 mmol), y 3-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)propanoato de tert-butilo (401 mg, >80% de pureza técnica, 1,447 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL). Después de agitar a 0°C durante 1 h, y luego a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla se detuvo con NH_4Cl saturado, y HCl 1 N (2,4 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (5X). Las fases orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró por evaporación rotativa para dar un aceite traslúcido. Después de la purificación mediante cromatografía flash (0-15% MeOH en CH_2Cl_2, detección ELSD) se obtuvo 3-(2-(2-(2-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoato de tert-butilo como un aceite espeso traslúcido (356 mg, 0,910 mmol): LCMS: MS+NH4+=487,4, Rt=0,90 min (ácido, 2 min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,31 (s, 1H), 7,78 – 7,70 (m, 1H), 4,26 – 4,19 (m, 2H), 3,58 (td, J = 5,6, 5,0, 3,7 Hz, 4H), 3,53 – 3,39 (m, 10H), 3,10 – 3,03 (m, 2H), 2,44 – 2,39 (m, 2H), 1,40 (s, 9H).

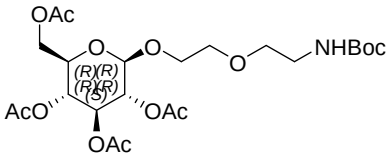
[639] A 3-(2-(2-(2-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoato de tert-butilo (162 mg, 0,345 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) a 0°C se agregó TFA (1 mL, 13,0 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla se concentró por evaporación rotativa con un baño de agua a 25 °C. El residuo se secó bajo alto vacío durante 30 min, por destilación azeotrópica con tolueno anhidro (3X 2 mL), y al vacío durante la noche para dar ácido 3-(2-(2-(2-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoico como un aceite espeso (139 mg, 0,335 mmol): LCMS: MS+NH4+=431,4, Rt=0,62 min (ácido, 2 min, ELSD): 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,32 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 7,78 – 7,69 (m, 1H), 4,27 – 4,15 (m, 2H), 3,67 – 3,54 (m, 8H), 3,49 – 3,42 (m, 4H), 3,07 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,47 – 2,39 (m, 4H).

Síntesis de trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-(2-(((N-(2-(2-(2-(2-carboxietoxi)etoxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L60-P1)



[640] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 2** con trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (15 mg, 10 µmol) y ácido 3-(2-(2-(2-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoico (12 mg, 0,029 mmol), se obtuvo trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-(2-(((N-(2-(2-(2-(2-carboxietoxi)etoxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io como un polvo blanco: HRMS: MS+=1912,7000, Rt=2,38 min (5 min ácido).

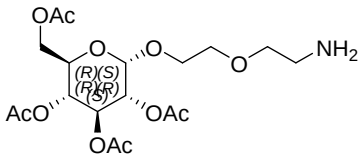
Síntesis de triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-((tert-butoxicarbonil)amino)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo



[641] Una mezcla de (2-(2-hidroxietoxi)etil)carbamato de tert-butilo (1535 mg, 7,48 mmol), Ag_2CO_3 (8248 mg, 14,96 mmol) y una porción de iodo cristalino en CH_2Cl_2 (6 mL) se agitó con tamices moleculares en polvo de 4A (1400 mg) durante 15 min. A la mezcla se agregó triacetato de (*2R,3R,4S,5R,6R*)-2-(acetoximetil)-6-bromotetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (2050

mg, 4,99 mmol) en CH_2Cl_2 (6,00 ml), también se agitó con tamices moleculares en polvo de 4A (1400 mg) durante 15 min antes de la adición. La mezcla resultante se cubrió con papel de aluminio y se agitó a temperatura ambiente durante 60 h, y luego se filtró a través de celite lavando con EtOAc. El material filtrado se concentró para dar un aceite traslúcido que se purificó mediante cromatografía flash (0-10% MeOH en CH_2Cl_2, detección ELSD) para dar, después de concentrar las fracciones apropiadas, un aceite espeso (640 mg) como una mezcla 47/53% de los compuestos deseados triacetato de (*2R,3R,4S,5R,6R*)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-((tert-butoxicarbonil)amino)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo y diacetato de (*2S,3aR,5R,6R,7S,7aR*)-5-(acetoximetil)-2-(2-(2-((tert-butoxicarbonil)amino)etoxi)etoxi)-2-metiltetrahidro-5H-[1,3]dioxolo[4,5-b]piran-6,7-diilo:
LCMS: MS+=536,4, Rt=0,96 min (2 min, acid, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 6,77 (s, 2H), 5,78 (s, 2H), 5,76 (s, 1H), 5,28 (t, J = 9,5 Hz, 1H), 5,04 (t, J = 3,1 Hz, 1H), 4,91 (t, J = 9,7 Hz, 1H), 4,87 – 4,74 (m, 3H), 4,38 (ddd, J = 5,2, 3,1, 0,9 Hz, 1H), 4,24 – 4,10 (m, 3H), 4,07 – 3,96 (m, 2H), 3,92 (dt, J = 8,8, 4,1 Hz, 1H), 3,80 (dt, J = 11,2, 4,4 Hz, 1H), 3,68 – 3,60 (m, 1H), 3,57 – 3,45 (m, 7H), 3,38 (td, J = 6,2, 1,5 Hz, 7H), 3,07 (dt, J = 6,1, 3,0 Hz, 4H), 2,08 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,04 (s, 6H), 2,01 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,65 (s, 3H), 1,39 (s, 19H).

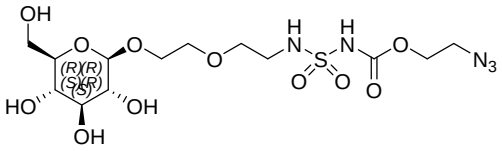
Síntesis de triacetato de (2R,3R,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo



[642] A una mezcla 47/53% de triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-((tert-butoxicarbonil)amino)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo y diacetato de (2S,3aR,5R,6R,7S,7aR)-5-(acetoximetil)-2-(2-(2-((tert-butoxicarbonil)amino)etoxi)etoxi)-2-metiltetrahidro-5H-[1,3]dioxolo[4,5-b]piran-6,7-diilo (622 mg, 1,161 mmol) en CH_2Cl_2 (16 mL) a 0°C se agregó TFA (4,0 mL, 52 mmol). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla se concentró y el residuo se secó bajo vacío durante 60 min para dar un aceite amarillo claro. El producto crudo se diluyó con DMSO (4 mL) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (5-60% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA, detección ELSD). Después de la liofilización de las fracciones apropiadas, se obtuvo triacetato de (2R,3R,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo, como una sal de TFA, como un polvo blanco (195 mg, 0,355 mmol): LCMS: MS+=436,4, Rt=0,58 min (ácido, 2 min); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,72 (s, 3H), 5,27 (t, J = 9,4 Hz, 1H), 4,92 (t, J = 9,6 Hz, 1H), 4,86 – 4,75 (m,

2H), 4,22 – 4,15 (m, 1H), 4,07 – 3,94 (m, 3H), 3,89 – 3,53 (m, 14H, mixed con DMSO), 3,03 – 2,91 (m, 2H), 2,03 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,94 (s, 3H).

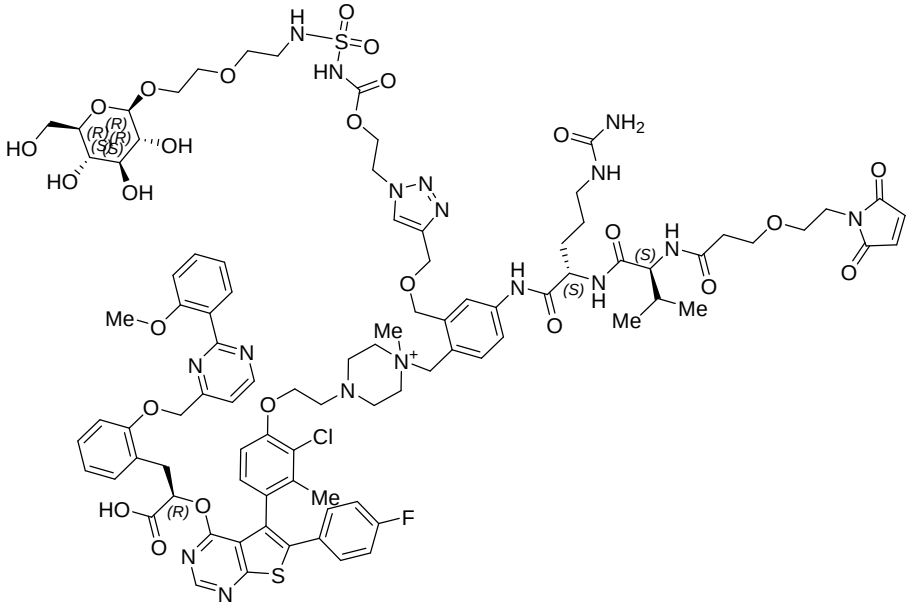
Síntesis de (N-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamato de 2-azidoetilo



[643] A 2-azidoetan-1-ol (16 mg, 0,18 mmol) en CH_2Cl_2 (2,5 ml) se agregó cloruro sulfurisocianatídico (0,016 ml, 0,184 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a 0 C durante 1 h, luego se agregó TEA (0,128 ml, 0,919 mmol) y triacetato de (*2R,3R,4S,5R,6R*)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo, como una sal de TFA (116 mg, 0,211 mmol) en CH_2Cl_2 (1,5 mL). Después de agitar a 0°C durante 1 h, y luego a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla se detuvo con NH_4Cl saturado, y HCl 1 N (0,919 mL, 0,919 mmol). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (5X). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró por evaporación rotativa para dar triacetato de *(2R,3R,4S,5R,6R)-2-*(acetoximetil)-6-(2-(2-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo como un aceite traslúcido (121 mg): LCMS: MS+=628, Rt=0,85 min (ácido, 2min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,32 (s, 1H), 7,79 – 7,71 (m, 1H), 5,26 (t, J = 9,5 Hz, 1H), 4,90 (t, J = 9,7 Hz, 1H), 4,85 – 4,73 (m, 2H), 4,25 – 4,14 (m, 3H), 4,06 – 3,94 (m, 2H), 3,79 (ddd, J = 11,3, 5,3, 3,8 Hz, 1H), 3,68 – 3,40 (m, 8H), 3,16 – 3,00 (m, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,94 (s, 3H).

[644] El producto precedente se disolvió en dioxano (3 ml) y se enfrió a 0°C. Se agregó $LiOH.H_2O$ (0,5 M en agua, 2,94 ml, 1,47 mmol). La solución traslúcida resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y luego se detuvo a 0°C con HCl (5N, 0,147 mL, 0,735 mmol). La mezcla se concentró por evaporación rotativa en un baño de agua a 20 °C para eliminar la mayor parte del dioxano. La solución residual (aprox. 3 mL) se purificó mediante HPLC preparativa (columna Sunfire 5µm 30x50 mm, 2-12% de Acetonitrilo con 0,1% de FA en Agua. Velocidad de flujo: 75 mL/min., MS 459,3, 476,3 detección) para dar, luego de la eliminación del solvente las fracciones apropiadas por liofilización, (N-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamato de 2-azidoetilo como un semisólido (64 mg, 0,14 mmol): LCMS: M+NH4+=477,3, MS-=458 (ácido, 2min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,32 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 4,96 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 4,89 (dd, J = 13,7, 4,8 Hz, 2H), 4,47 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 4,22 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 4,15 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,90 – 3,81 (m, 1H), 3,67 (ddd, J = 12,0, 5,7, 2,0 Hz, 1H), 3,62 – 3,39 (m, 8H), 3,19 – 2,90 (m, 6H).

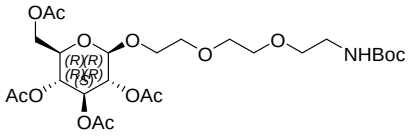
Síntesis de trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-(2-(((N-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L63-P1)



[645] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 2** con trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (36 mg, 0,022 mmol) y (N-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamato de 2-azidoetilo (22 mg, 0,048 mmol), se obtuvo trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-(2-(((N-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io como un polvo blanco: HRMS: MS+=1958,6899, Rt=2,31 min (5 min ácido); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,17 (s, 1H), 10,16 (s, 1H), 8,81 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,07 (d, J = 13,5 Hz, 2H), 7,74 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,68 (q, J = 4,3, 2,7 Hz, 3H), 7,56 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,45 (dd, J = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 7,42 – 7,28 (m, 3H), 7,23 (ddd, J = 8,5, 5,4, 2,6 Hz, 2H), 7,17 – 7,04 (m, 5H), 6,99 – 6,91 (m, 4H), 6,65 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,14 (dd, J

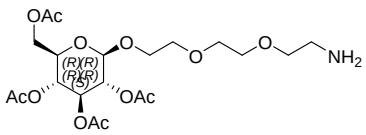
= 7,6, 1,8 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,43 (dd, J = 9,8, 3,6 Hz, 1H), 5,23 – 5,11 (m, 2H), 4,59 (dd, J = 11,3, 7,4 Hz, 8H), 4,42 – 4,06 (m, 12H), 3,53 – 3,17 (m, 27H, superpuesto con DMSO), 3,09 – 2,80 (m, 17H, superpuesto con DMSO), 2,39 – 2,20 (m, 3H), 1,86 (h, J = 6,9 Hz, 1H), 1,77 (s, 3H), 1,68 – 1,21 (m, 5H), 0,76 (dd, J = 13,8, 6,8 Hz, 6H); 19F RMN (376 MHz, DMSO-d6): -112,18 ppm.

Síntesis de triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-((2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatridecan-13-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo



[646] Una mezcla de (2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etil)carbamato de tert-butilo (1046 mg, 4,20 mmol), Ag_2CO_3 (4627 mg, 8,39 mmol) y una porción de iodo cristalino en CH_2Cl_2 (3 mL) se agitó con tamices moleculares en polvo de 4A (700 mg) durante 15 min. A la mezcla se agregó triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-bromotetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (1150 mg, 2,80 mmol) en CH_2Cl_2 (3,00 mL) (también se agitó con tamices moleculares en polvo de 4A (700 mg) durante 15 min). La mezcla resultante se cubrió con papel de aluminio y se agitó a temperatura ambiente durante 60 h, luego se filtró a través de celite lavando con EtOAc. El material filtrado se concentró para dar un aceite traslúcido. La purificación por cromatografía flash (20-100% EtOAc en heptano, detección ELSD) dio una mezcla 28/72% de triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-((2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatridecan-13-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo y diacetato de (*2S,3aR,5R,6R,7S,7aR*)-5-(acetoximetil)-2-((2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatridecan-13-il)oxi)-2-metiltetrahidro-5H-[1,3]dioxolo[4,5-b]piran-6,7-diilo como un aceite espeso traslúcido (307 mg, 0,529 mmol): LCMS: MS+=580,4, Rt=0,96 min (ácido, 2 min, ELSD solamente); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 6,74 (s, 3H), 5,76 (s, 8H), 5,26 (t, J = 9,5 Hz, 1H), 5,02 (t, J = 3,1 Hz, 3H), 4,90 (t, J = 9,7 Hz, 1H), 4,84 – 4,72 (m, 5H), 4,37 (ddd, J = 5,2, 3,1, 0,9 Hz, 3H), 4,18 (dd, J = 12,2, 5,0 Hz, 1H), 4,11 (d, J = 4,5 Hz, 5H), 4,08 – 3,94 (m, 4H), 3,91 (dt, J = 8,6, 4,1 Hz, 3H), 3,85 – 3,75 (m, 1H), 3,66 – 3,58 (m, 1H), 3,58 – 3,51 (m, 7H), 3,42 – 3,31 (m, 14H), 3,06 (q, J = 5,9 Hz, 8H), 2,07 (s, 7H), 2,05 (s, 7H), 2,02 (s, 10H), 1,99 (d, J = 1,0 Hz, 6H), 1,99 (s, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,63 (s, 7H), 1,38 (s, 36H), 1,18 (t, J = 7,1 Hz, 4H).

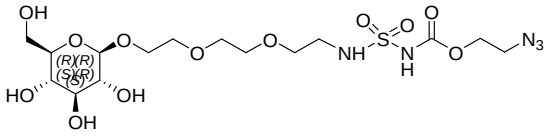
Síntesis de triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo



[647] A una mezcla de triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-((2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatridecan-13-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo y diacetato de

(*2S,3aR,5R,6R,7S,7aR*)-5-(acetoximetil)-2-((2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatridecan-13-il)oxi)-2-metiltetrahidro-5H-[1,3]dioxolo[4,5-b]piran-6,7-diilo (323 mg, 0,557 mmol) en CH_2Cl_2 (8 mL) a 0°C se agregó TFA (1,9 mL, 25 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante durante 45 min, la mezcla se concentró y el residuo se secó bajo vacío durante 60 min para dar un aceite amarillo claro. La purificación por cromatografía flash (0-20% MeOH en CH_2Cl_2, con 0,2% de modificador NH_4OH en MeOH, detección ELSD) dio triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo como un aceite traslúcido (82 mg, 0,171 mmol). LCMS: MS+=480,4, Rt=0,61 min (ácido, 2 min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,76 (s, 2H), 5,28 (t, J = 9,4 Hz, 1H), 4,93 (t, J = 9,7 Hz, 1H), 4,86 – 4,75 (m, 2H), 4,20 (dd, J = 12,2, 5,0 Hz, 1H), 4,08 – 3,95 (m, 2H), 3,88 – 3,79 (m, 1H), 3,67 – 3,53 (m, 11H, superpuesto con DMSO), 3,00 (q, J = 5,5 Hz, 2H), 2,04 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,96 (s, 3H).

Síntesis de (N-(2-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamato de 2-azidoetilo

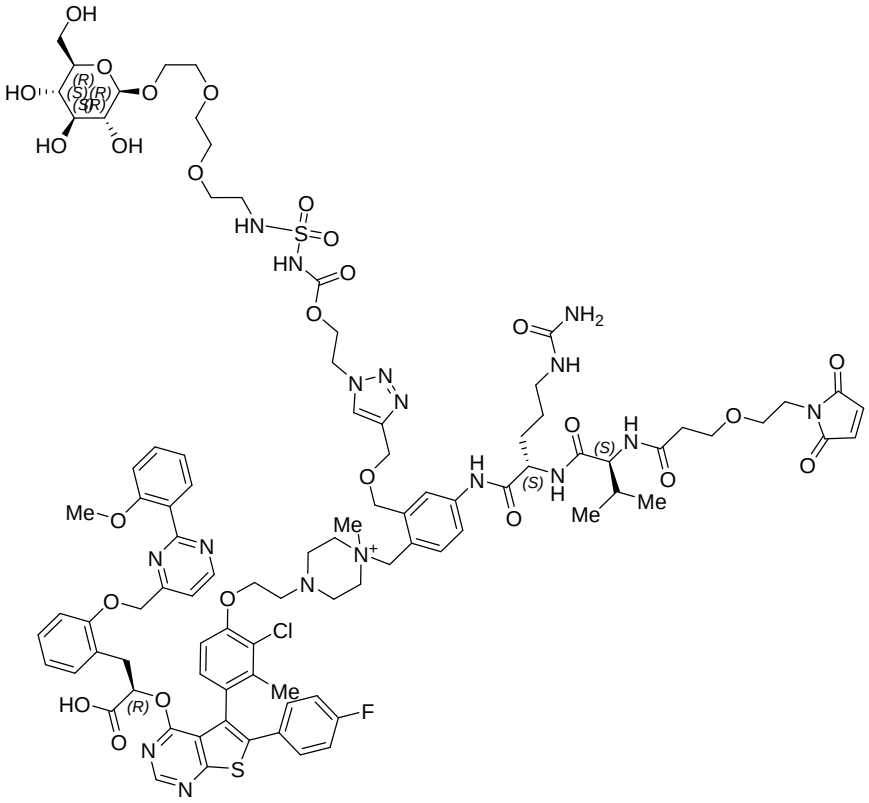


[648] A 2-azidoetan-1-ol (12,5 mg, 0,144 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) se agregó cloruro sulfurisocianatídico (0,012 ml, 0,14 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 45 min, luego se agregó TEA (0,040 ml, 0,29 mmol) y triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (77 mg, 0,16 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL). Después de agitar a 0°C durante 1h, y luego a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla se detuvo con NH_4Cl saturado, y HCl 1 N (0,29 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (5X). Las fases orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró por evaporación rotativa para dar triacetato de (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-(2-(2-(2-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)etoxi)etoxi)etoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo como un aceite traslúcido (75 mg): LCMS: 0,97 min, MS+=672,4, 96, Rt-0,87 min (ácido, 2min, ELSD).

[649] Al producto precedente en dioxano (4 mL) a 0°C se agregó $LiOH.H_2O$ (0,5 M en agua, 3,45 ml, 1,72 mmol). La solución traslúcida resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y luego se concentró por evaporación rotativa con un baño de agua a 20°C. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Sunfire 5µm 30x50 mm, 2-12% de Acetonitrilo con 0,1% de FA en Agua. Velocidad de flujo: 75 mL/min., MS 503,5, 520,3 detección) para dar, después de la liofilización, (N-(2-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamato de 2-azidoetilo como una película delgada traslúcida (22 mg, 0,044 mmol): LCMS: MS+=504,3, Rt=0,52 min (ácido, 2min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,31 (s, 1H), 7,74 (s,

1H), 4,96 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 4,89 (dd, J = 12,5, 4,8 Hz, 2H), 4,47 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 4,22 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 4,15 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,93 – 3,82 (m, 1H), 3,67 (dd, J = 11,2, 5,8 Hz, 1H), 3,62 – 3,40 (m, 12H), 3,17 – 2,90 (m, 6H).

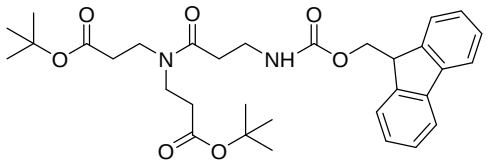
Síntesis de trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-(2-(((N-(2-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L62-P1)



[650] Siguiendo el PROCEDIMIENTO GENERAL 2 con trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (32 mg, 0,020 mmol) y (N-(2-(2-(2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2=il)oxi)etoxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamato de 2-azidoetilo (21 mg, 0,042 mmol), se obtuvo trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-

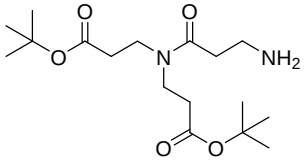
metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-(2-(((N-(2-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etoxi)etoxi)etil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io como un polvo blanco: HRMS: MS+=2002,7100, Rt=2,37 min (5 min ácido).

Síntesis de 3,3'-((3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoil)azandiil)dipropionato de di-tert-butilo



[651] A una mezcla de 3,3'-azandiildipropionato de di-tert-butilo (403 mg, 1,47 mmol), ácido 3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoico (505 mg, 1,62 mmol) y DIPEA (0,309 mL, 1,77 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) se agregó clorhidrato de *N*-(dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimida (367 mg, 1,92 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2h, la mezcla se detuvo con NH_4Cl saturado, y se extrajo con CH_2Cl_2 (3X). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró. El producto resultante crudo se purificó mediante cromatografía flash (0-50% EtOAc en heptano) para dar 3,3'-((3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoil)azandiil)dipropionato de di-tert-butilo como una espuma blanca (290 mg, 0,511 mmol): LCMS: MS+=567,5, Rt=1,32 min (ácido, 2 min); PMR: 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,94 – 7,88 (m, 2H), 7,70 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,47 – 7,40 (m, 2H), 7,40 – 7,31 (m, 2H), 7,22 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,31 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 4,26 – 4,18 (m, 1H), 3,56 – 3,03 (m, 8H), 2,50 – 2,38 (m, 4H), 1,41 (s, 9H), 1,40 (s, 9H).

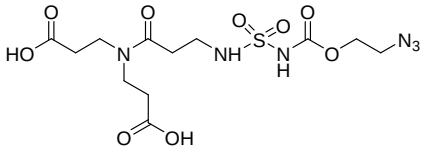
Síntesis de 3,3'-((3-aminopropanoil)azandiil)dipropionato de di-tert-butilo, 1-(9H-fluoren-9-il)-N,N-dimetilmetanamina



[652] A 3,3'-((3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoil)azandiil)dipropionato de di-tert-butilo (288 mg, 0,508 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) se agregó dimetilamina (2 N en THF, 1 mL, 2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregó más dimetilamina (2 N en THF, 1 mL, 2 mmol). Después de agitar durante otras 4 h, la mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía flash (0-25% MeOH en CH_2Cl_2, 37 min, 0,2% de modificador NH_4OH presente en MeOH, detección ELSD) para dar 3,3'-((3-aminopropanoil)azandiil)dipropionato de di-tert-butilo, 1-(9H-fluoren-9-il)-N,N-

dimetilmetanamina como un aceite marrón claro (62 mg, 0,472 mmol): LCMS: MS+=345,4, Rt=0,76 min (acidc, 2 min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 4,05 (s, 2H), 3,51 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,43 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,31 (s, 2H), 2,79 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,55 – 2,45 (m,17H, superpuesto con DMSO), 2,41 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,40 (s, 9H).

Síntesis de ácido 3,3'-((3-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)propanoil)azandiil)dipropiónico

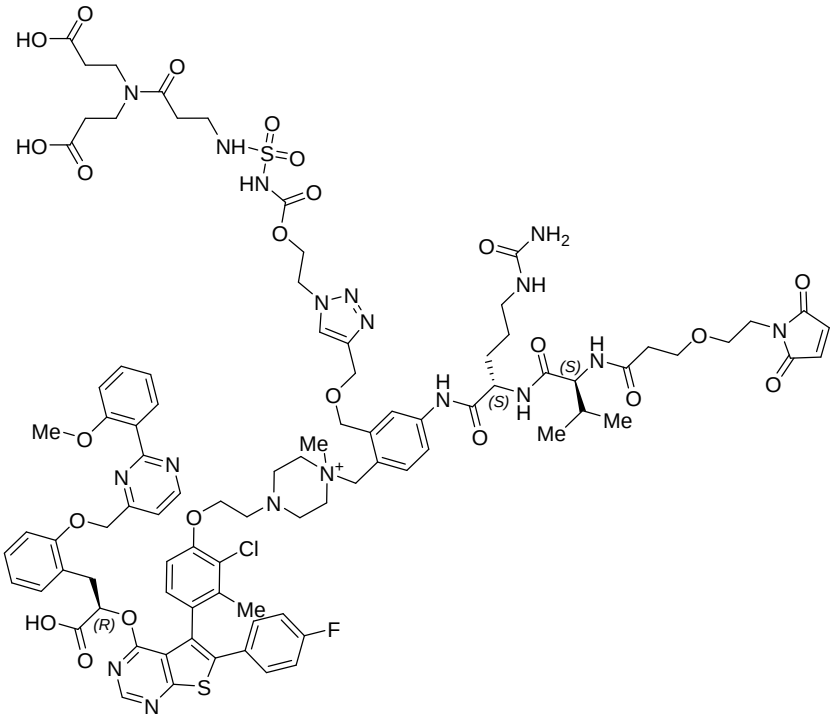


[653] A 2-azidoetan-1-ol (16 mg, 0,18 mmol) en CH_2Cl_2 (2,5 ml) se agregó cloruro sulfurisocianatídico (0,016 ml, 0,18 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min, luego se agregó TEA (0,051 ml, 0,37 mmol) y 3,3'-((3-aminopropanoil)azandiil)dipropionato de di-tert-butilo (73 mg, 0,21 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL). Después de agitar a 0°C durante 1h y luego a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla se detuvo con NH_4Cl saturado, y HCl 1 N (0,37 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (5X). Las fases orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró por evaporación rotativa. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash (0-10% MeOH en CH_2Cl_2 , Detección ELSD y UV214) para dar 3,3'-((3-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)propanoil)azandiil)dipropionato de di-tert-butilo, como un aceite espeso traslúcido (70 mg, 0,13 mmol): LCMS MS+= 537,4 , Rt=1,08 min (ácido, 2 min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,39 (s, 1H), 7,65 – 7,59 (m, 1H), 4,28 – 4,23 (m, 2H), 3,63 – 3,59 (m, 2H), 3,54 – 3,47 (m, 2H), 3,47 – 3,38 (m, 2H), 3,18 – 3,09 (m, 2H), 2,61 – 2,54 (m, 4H), 2,43 (dd, J = 8,5, 6,0 Hz, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,42 (s, 9H).

[654] Al producto precedente en CH_2Cl_2 (2 ml) a 0°C se agregó TFA (2 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 h, la mezcla se concentró por evaporación rotativa en un baño de agua a 25 °C. El residuo se secó bajo alto vacío durante 30 min, luego por destilación azeotrópica con tolueno anhidro (3X 3 mL), y se secó adicionalmente bajo alto vacío durante la noche para dar ácido 3,3'-((3-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)propanoil)azandiil)dipropiónico como un sólido blanco (72 mg, 77% en peso en base al rendimiento teórico. Se usó directamente en el siguiente paso): LCMS MS+=425,3 , Rt=0,52 min (ácido, 2 min, ELSD); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 12,28 (s, 1H), 11,35 (s, 1H), 7,58 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 4,26 – 4,20 (m, 2H), 3,61 – 3,55 (m, 2H), 3,50 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 3,42 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 3,12 (q, J = 6,8 Hz, 2H), 2,56 (dd, J = 15,1, 7,4 Hz, 4H), 2,43 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,08 (s, 1H).

Síntesis de trifluoroacetato de 1-(2-(((1-(2-(((N-(3-(bis(2-carboxietil)amino)-3-oxopropil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-

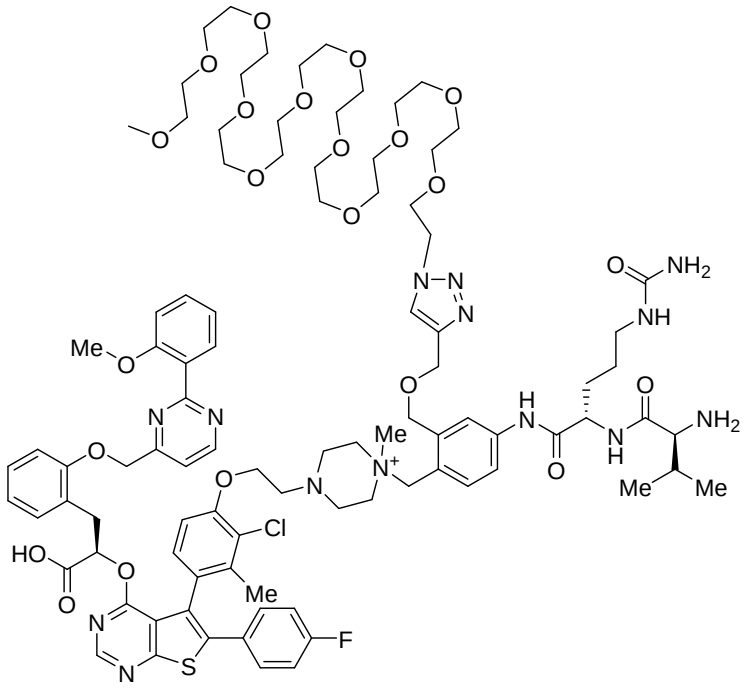
(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L61-P1)



[655] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 2** con trifluoroacetato de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (20 mg, 0,012 mmol) y ácido 3,3'-((3-((N-((2-azidoetoxi)carbonil)sulfamoil)amino)propanoil)azandiil)dipropiónico (15 mg, 0,027 mmol), se obtuvo trifluoroacetato de 1-(2-(((1-(2-(((N-(3-(bis(2-carboxietil)amino)-3-oxopropil)sulfamoil)carbamoil)oxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io como un polvo blanco: HRMS: MS+=1923,6500 Rt=2,34 min (5 min ácido); 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 11,21 (s, 1H), 10,16 (s, 1H), 8,81 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,08 (d, J = 13,7 Hz, 2H), 7,77 – 7,50 (m, 5H), 7,47 – 7,20 (m, 6H), 7,18 – 7,04 (m, 5H), 6,99 – 6,90 (m, 4H), 6,65 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,14 (dd, J = 7,6, 1,7 Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 5,43 (dd, J = 9,8, 3,5 Hz, 1H), 5,24 – 5,11 (m, 3H), 4,65 – 4,51 (m, 9H), 4,45 – 3,81 (m, 52H, superpuesto con DMSO), 3,68 (s, 3H), 3,54 – 2,77 (m, 31H), 2,39 – 2,20 (m, 5H), 1,86 (q, J =

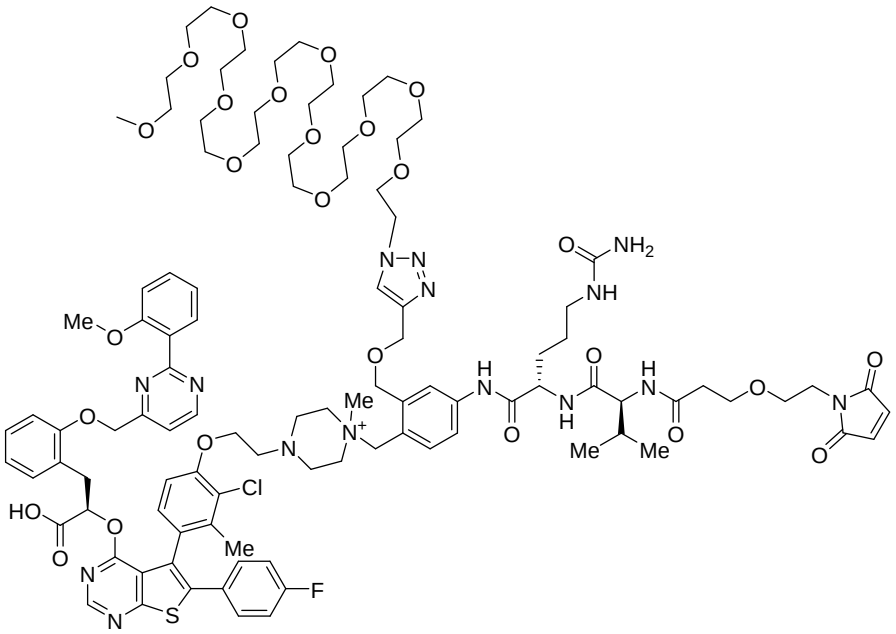
6,8 Hz, 1H), 1,77 (s, 3H), 1,69 – 1,00 (m, 6H), 0,76 (dd, J = 13,9, 6,8 Hz, 6H); 19F RMN (376 MHz, DMSO-d6): -112,16 ppm.

Síntesis de 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaheptatriacontan-37-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



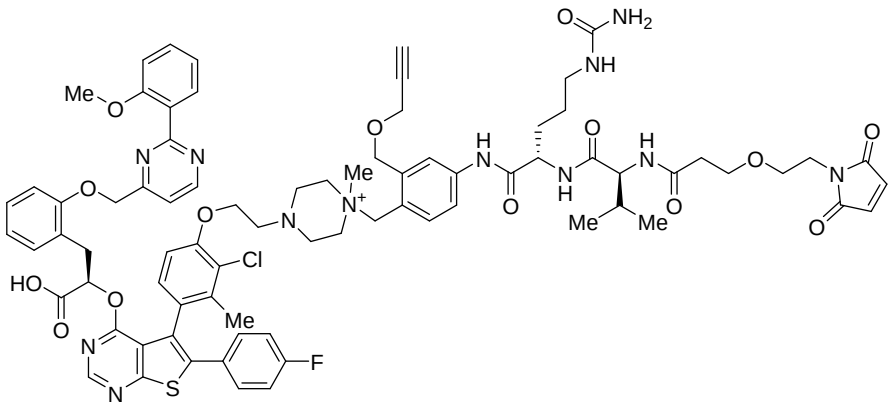
[656] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 2** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (87,5 mg, 0,063 mmoles, 1,0 equiv) y mPEG12-Azida (73,3 mg, 0,125 mmol, 2 equiv), se obtuvo 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaheptatriacontan-37-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1889,8544, Rt=2,19 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaheptatriacontan-37-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L104-P1)



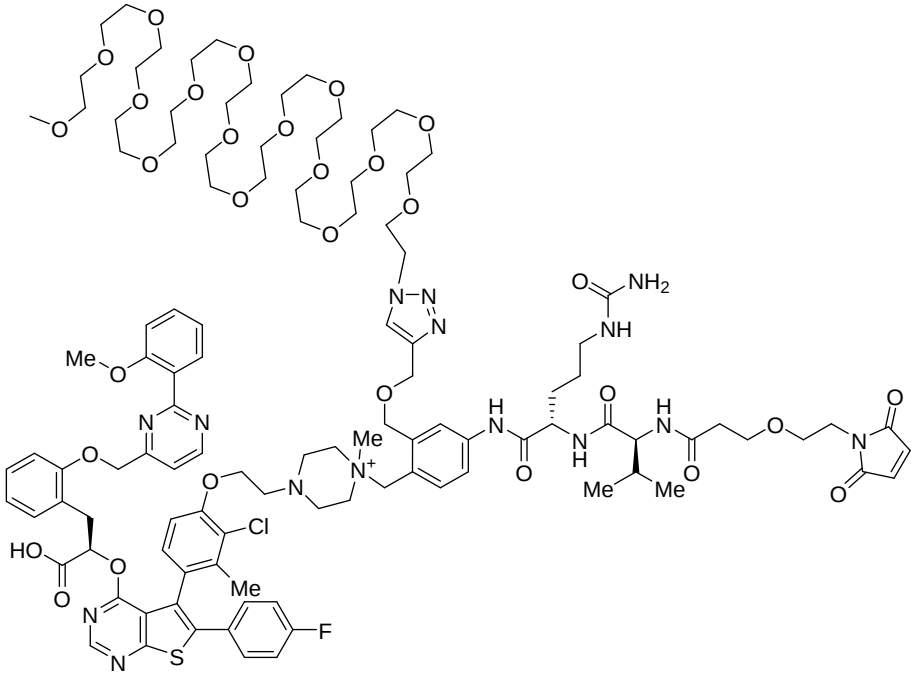
[657] Siguiendo el PROCEDIMIENTO GENERAL 3 con 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaheptatriacontan-37-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (22 mg, 0,011 mmol, 1,0 equiv.), se obtuvo 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaheptatriacontan-37-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2084,9099, Rt=2,45 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io



[658] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (155 mg, 0,119 mmol, 1,0 equiv.), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1499,5699, Rt=2,39 min (5 min, método ácido).

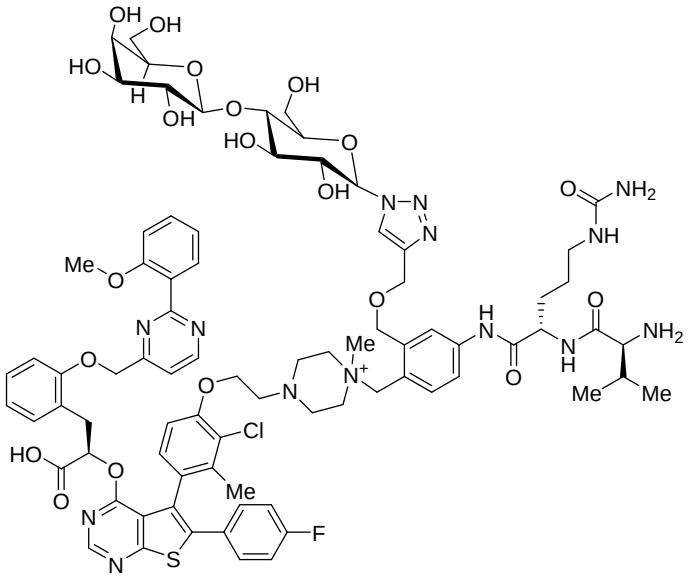
Síntesis de 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-hexadecaoxanonatetracontan-49-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (L34-P1)



[659] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 2** con 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (50 mg, 0,033 mmoles, 1,0 equiv) y m-PEG16-azida (de Anchopharm BP-23558) (50,8 mg, 0,067 mmol, 2 equiv), se obtuvo 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-hexadecaoxanonatetracontan-49-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-

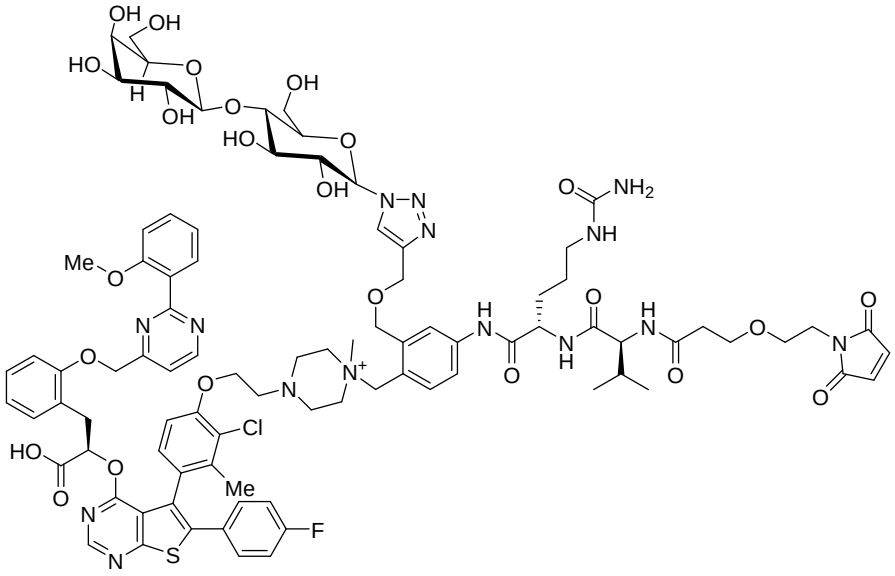
il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+=2261,0196, Rt=2,28 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



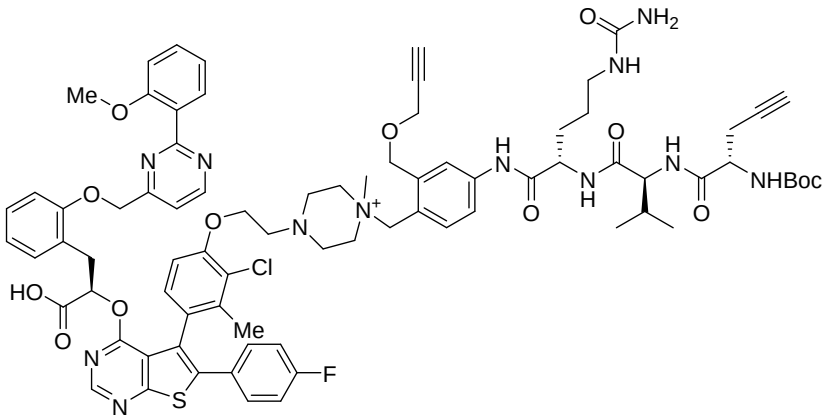
[660] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 2** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (87,5 mg, 0,063 mmoles, 1,0 equiv) y 1-azido-1-deoxi-beta-D-lactopiranosido (22,99 mg, 0,063 mmol, 1 equiv), se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1671,6400, Rt=1,95 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L46-P1)



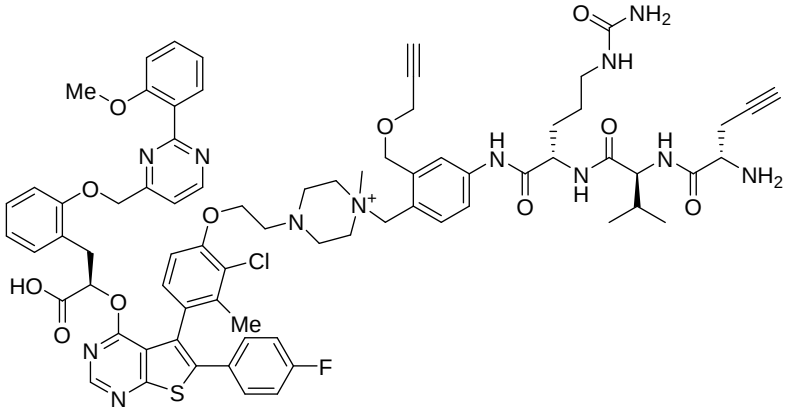
[661] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (35 mg, 0,020 mmol, 1,0 equiv.), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1866,6899, Rt=2,28 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((6S,9S,12S)-9-isopropil-2,2-dimetil-4,7,10-trioxo-6-(prop-2-in-1-il)-12-(3-ureidopropil)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-amido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io



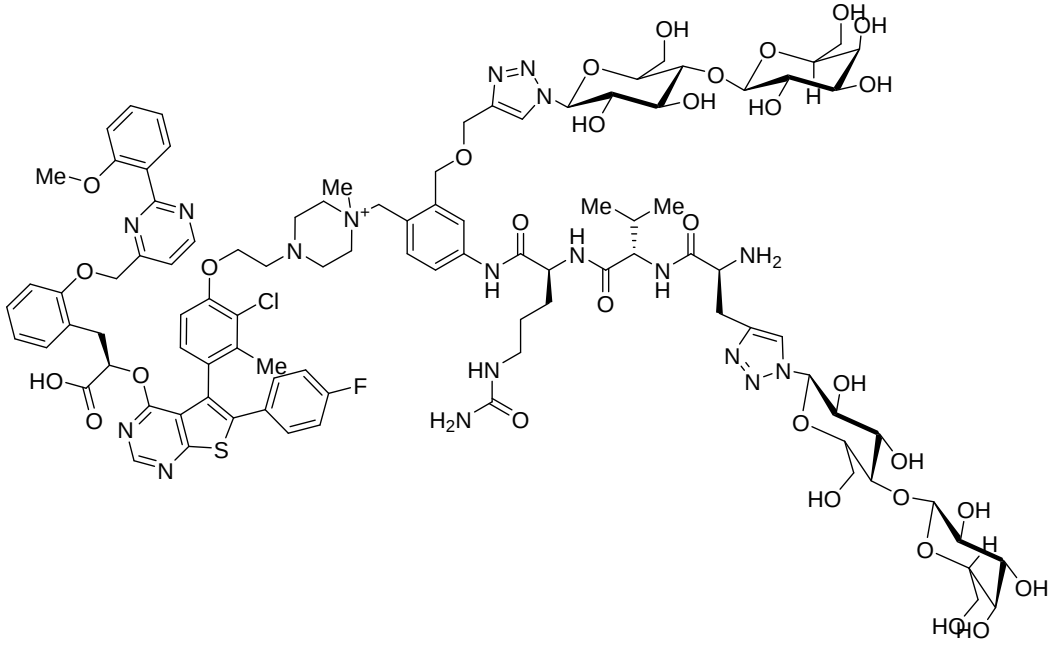
[662] A la mezcla de Boc-Propargil-Gly-OH (40 mg, 0,188 mmol, 1 equiv) y HATU (71,3 mg, 0,188 mmol, 1 equiv) en DMF (0,5 ml) se agregó DIPEA (65,5 µl, 0,375 mmol, 2 equiv). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se agregó una solución de 1-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (245 mg, 0,188 mmol, 1 equiv) en DMF (1 ml) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30min. La mezcla cruda se separó con columna C18 (cartucho de 100g, MeCN/Agua con 0,1% de ácido fórmico, 0-100% a lo largo de 15CV) para obtener 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((6S,9S,12S)-9-isopropil-2,2-dimetil-4,7,10-trioxo-6-(prop-2-in-1-il)-12-(3-ureidopropil)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-amido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io.
HRMS: M+= 1499,6000 , Rt= 2,91 min (5 min, método ácido).

Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-aminopent-4-inamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[663] En un baño de agua-hielo a 0°C, a 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(4-((6S,9S,12S)-9-isopropil-2,2-dimetil-4,7,10-trioxo-6-(prop-2-in-1-il)-12-(3-ureidopropil)-3-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-amido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (56 mg, 0,037 mmol) se agregaron 2 mL de TFA (25% en DCM), luego la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1h. La mezcla cruda se concentró bajo alto vacío. Luego la mezcla se disolvió en MeOH, y se purificó mediante columna C-18 (cartucho de 50 g, MeCN/Agua con 0,1% de ácido fórmico 0-100% a lo largo de 16 CV) para obtener 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-aminopent-4-inamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 1399,5400 , Rt= 2,17 min (5 min, método ácido).

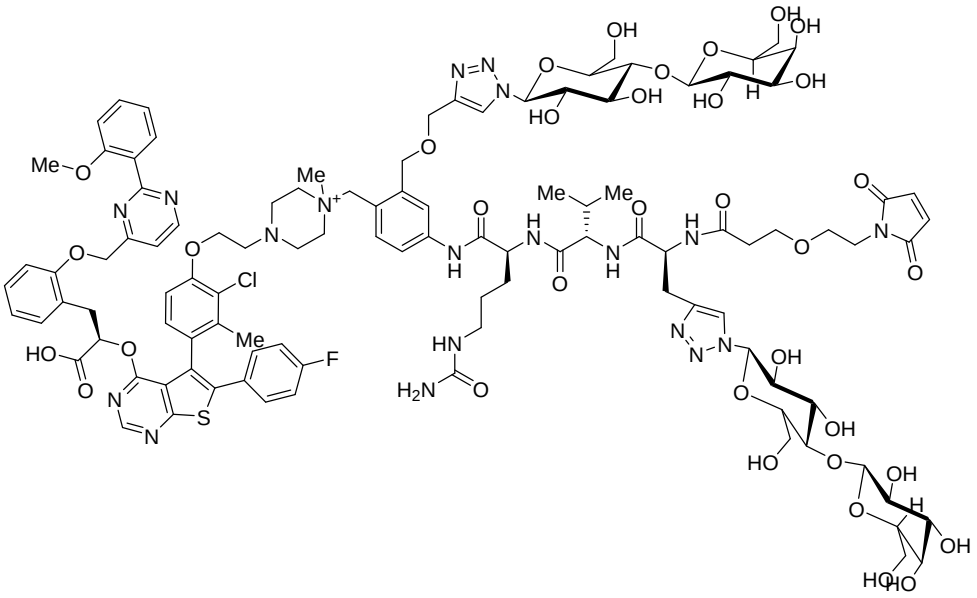
Síntesis de 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-amino-3-(1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[664] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 2** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-aminopent-4-inamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)bencil)-4-(2-

(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (44 mg, 0,031 mmol, 1,0 equiv) y 1-azido-1-deoxi-beta-D-lactopiranosido (69,2 mg, 0,188 mmol, 6 eq), se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-amino-3-(1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2133,7800 , Rt= 1,95 min (5 min, método ácido).

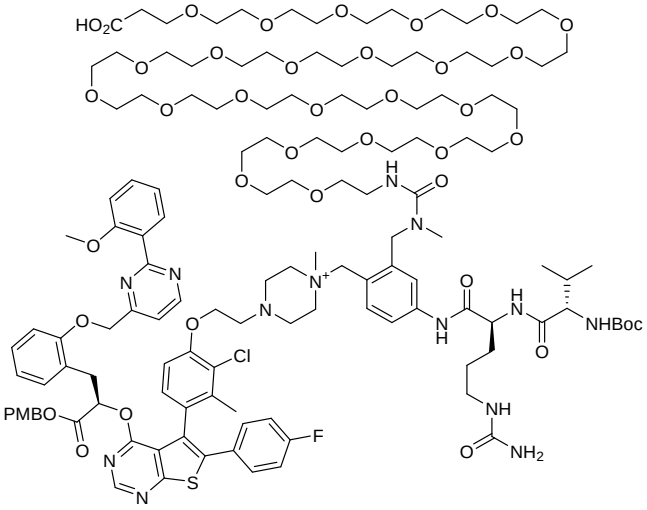
Síntesis de 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((2S,5S,8S)-8-((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-15-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-4,7,10-trioxo-2-(3-ureidopropil)-13-oxa-3,6,9-triazapentadecanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L47-P1)



[665] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-amino-3-(1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-

(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)bencil)-4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (19 mg, 0,009 mmol, 1,0 equiv.), se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)metil)-4-((2S,5S,8S)-8-((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-dihidroxi-6-(hidroximetil)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-15-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-4,7,10-trioxo-2-(3-ureidopropil)-13-oxa-3,6,9-triazapentadecanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2328,8301, Rt=2,15 min (5 min, método ácido).

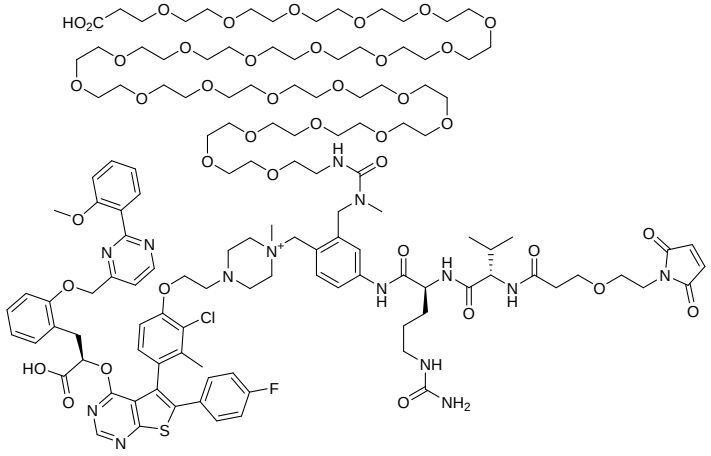
1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(78-carboxi-2-metil-3-oxo-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-tetracosaoxa-2,4-diazaoctaheptacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io



[666] Una mezcla de ácido 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-tetracosaoxapentaheptacontan-75-oico (50 mg, 0,044 mmol), carbonato de bis(4-nitrofenilo) (13 mg, 0,043 mmol), y DIPEA (20 µL, 0,12 mmol) en THF (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró burbujeando gas nitrógeno. El residuo sólido

resultante se colocó en DMF (1 mL). Se agregó 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-((metilamino)metil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io (50 mg, 0,029 mmol) y DIPEA (100 µL, 0,573 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se diluyó con DMSO (2 mL), y la solución se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (MeCN/H_2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización, se obtuvo 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(78-carboxi-2-metil-3-oxo-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-tetracosaoxa-2,4-diazaoctaheptacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io. HRMS: M+= 2671,2700, Rt=2,88 min (5 min, método ácido).

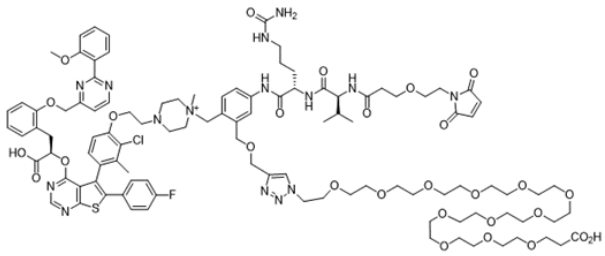
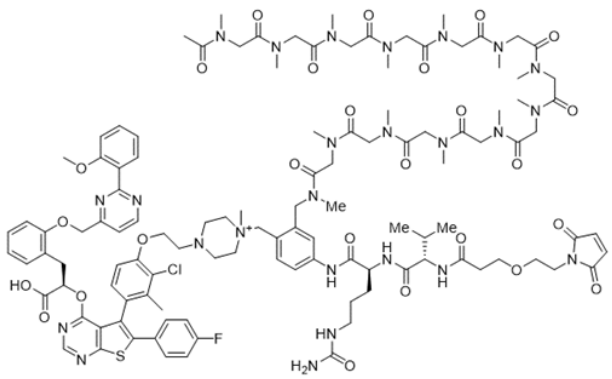
4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(78-carboxi-2-metil-3-oxo-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-tetracosaoxa-2,4-diazaoctaheptacontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io (L42-P1)

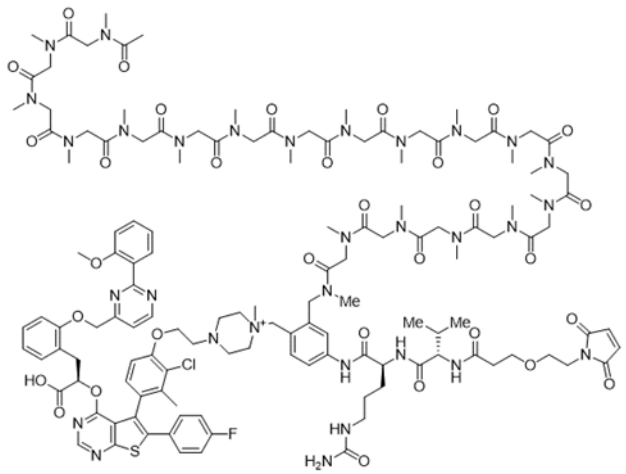
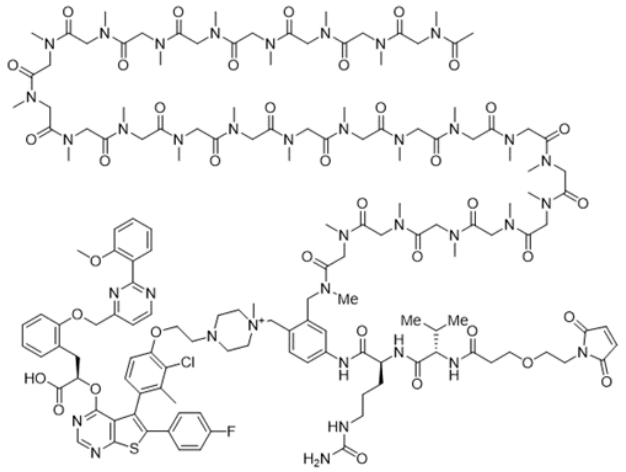
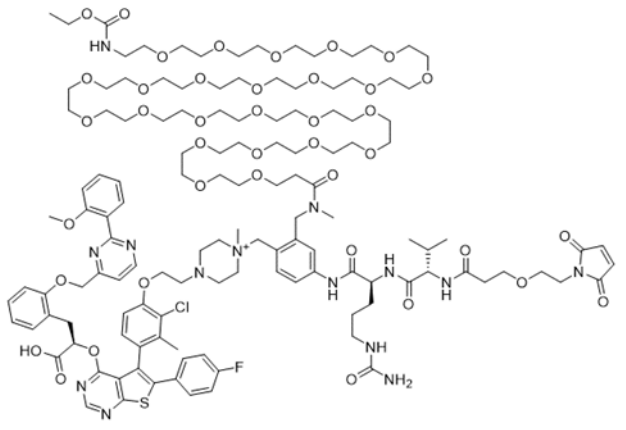


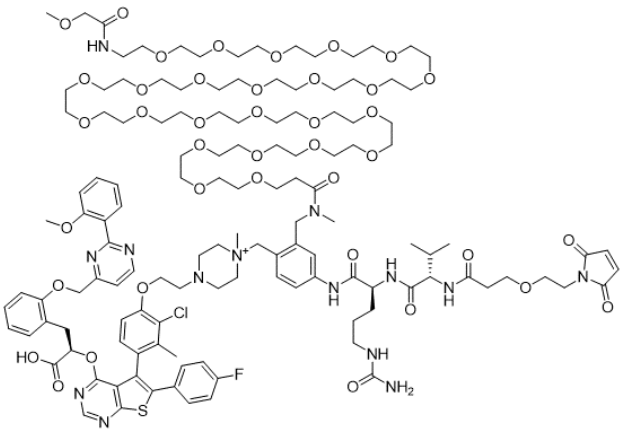
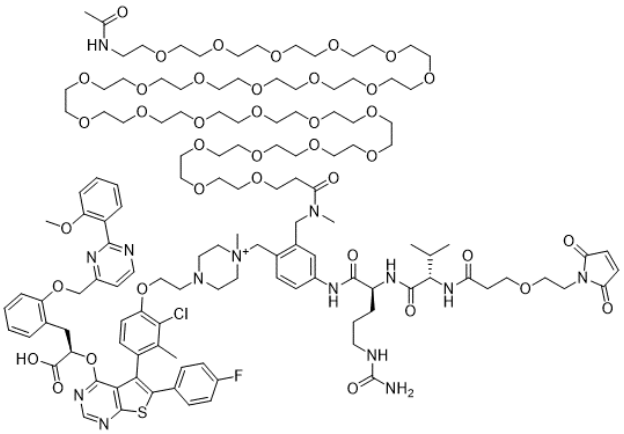
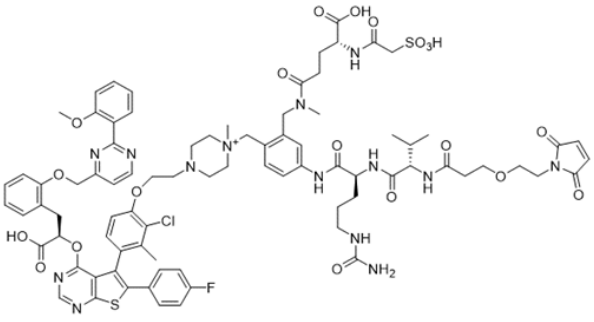
[667] Siguiendo el **PROCEDIMIENTO GENERAL 3** con 1-(4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-2-(78-carboxi-2-metil-3-oxo-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-tetracosaoxa-2,4-diazaoctaheptacontil)bencil)-4-(2-(2-cloro-4-(6-(4-fluorofenil)-4-(((R)-1-((4-metoxibencil)oxi)-3-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)-1-oxopropan-2-il)oxi)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenoxi)etil)-1-metilpiperazin-1-io, se obtuvo 4-(2-(4-(4-((R)-1-carboxi-2-(2-((2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il)metoxi)fenil)etoxi)-6-(4-

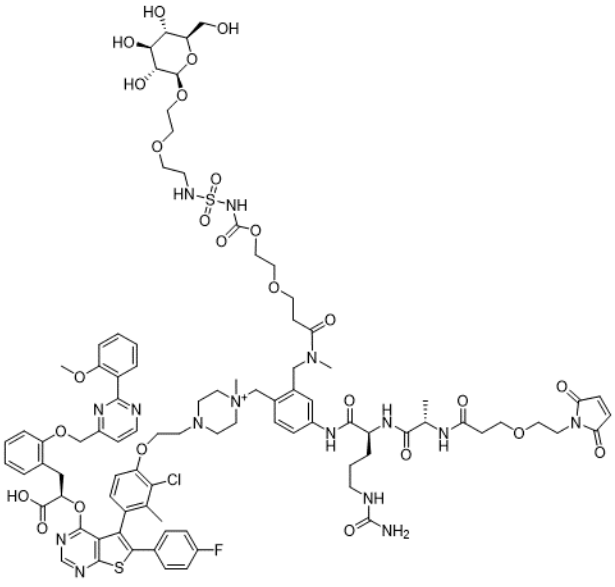
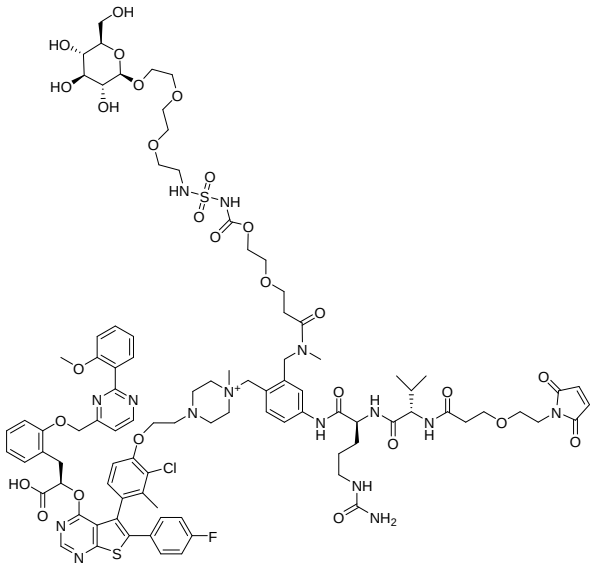
fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-cloro-3-metilfenoxi)etil)-1-(2-(78-carboxi-2- metil-3-oxo-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-tetracosaoxa-2,4-diazaoctaheptacontil)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)-1-metilpiperazin-1-io **(**L42-P1**)**. HRMS: M+= 2646,7700, Rt=2,38 min (5 min, método ácido).

[668] Los siguientes compuestos se prepararon usando procedimientos similares a los descritos precedentemente.

Código	**Estructura de conector- Carga útil**	**Métodos de síntesis**	**Caracterizaciones**
L33-P1		Procedimiento general 2	HRMS: M+ 2142,9099, Rt = 2,39 min. (5 min, método ácido).
L38-P1		Similar a la síntesis de L35-P1 y usando el Procedimiento general 3	HRMS: M+ 2369,0400, Rt = 2,11 min. (5 min, método ácido).

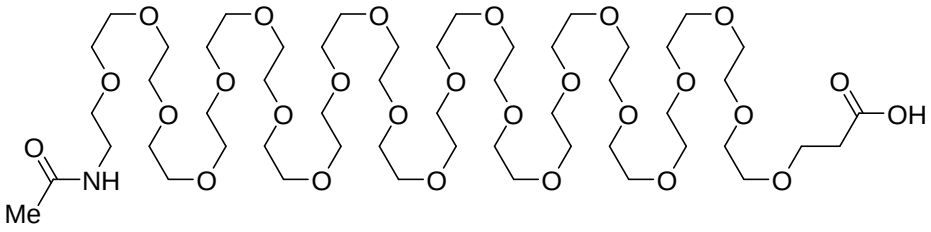
L39-P1		Similar a la síntesis de L35-P1 y usando el Procedimiento general 3	HRMS: M+ 2795,2537, Rt = 2,07 min. (5 min, método ácido).
L40-P1		Similar a la síntesis de L35-P1 y usando el Procedimiento general 3	HRMS: M+ 3221,4653, Rt = 2,05 min. (5 min, método ácido).
L43-P1		Similar a la síntesis de L35-P1 y usando el Procedimiento general 3	HRMS: M+ 2673,7827, Rt = 2,46 min. (5 min, método ácido).

L44-P1		Similar a la síntesis de L35-P1 y usando el Procedimiento general 3	HRMS: M+ 2673,7832, Rt = 2,39 min. (5 min, método ácido).
L45-P1		Similar a la síntesis de L35-P1 y usando el Procedimiento general 3	HRMS: M+ 2644,2253, Rt = 2,50 min. (5 min, método ácido).
L95-P1		Similar a la síntesis de L71-P1	HRMS: M+ 1725,6000 , Rt = 2,32 min. (5 min, método ácido)

L101-P1		Similar a la síntesis de L62-P1	HRMS: M+ 1962,7100, Rt = 2,50 min. (5 min, método ácido).
L105-P1		Similar a la síntesis de L62-P1	HRMS: M+ 1962,7100, Rt = 2,50 min. (5 min, método ácido).

[669] Los métodos de síntesis para preparar los polietilenglicoles en L43-P1, L44-P1 y L45-P1 se describen a continuación.

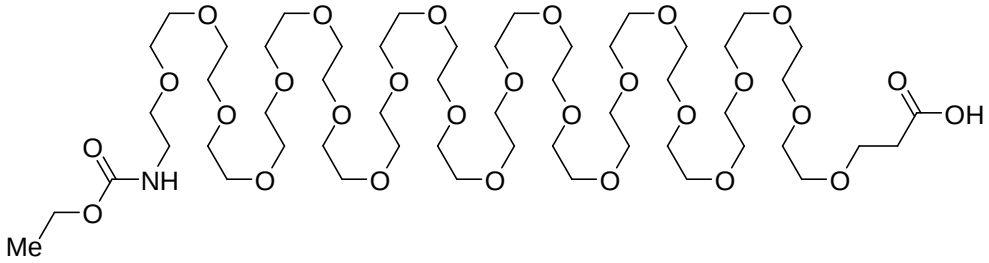
Síntesis de ácido 2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75-tetracosaoxa-3-azaoctaheptacontan-78-oico



[670] A una solución agitada de ácido 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-

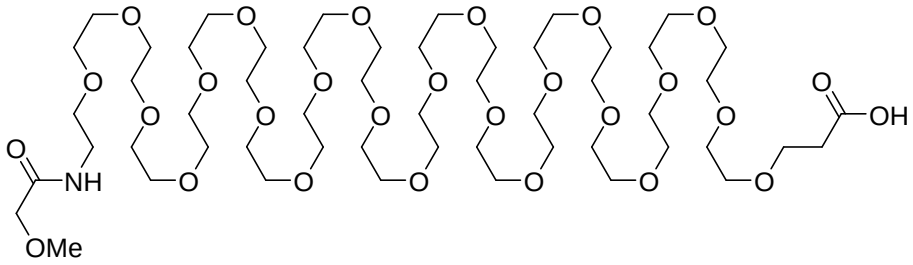
tetracosaoxapentaheptacontan-75-oico (100 mg, 0,087 mmol, 1,0 equiv.) y DIPEA (24,8 mg, 34 µL, 0,192 mmol, 2,2 equiv.) en diclorometano (0,5 mL) se agregó anhídrido acético (8,9 mg, 8,25 µL, 1,0 equiv.). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo resultante se colocó en DMSO (1 mL) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización se obtuvo ácido 2-oxo-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75-tetracosaoxa-3-azaoctaheptacontan-78-oico (62,3 mg, 0,052 mmol, 60% de rendimiento). LC/MS [M-H]- 1187,3 Rt=0,75 min. (2 min, método ácido). 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,86 (s, 1H), 3,60 (t, J = 6,4 Hz, 3H), 3,50 (d, J = 4,9 Hz, 91H), 3,40 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 3,18 (q, J = 5,8 Hz, 2H), 2,44 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 1,80 (s, 3H).

Síntesis de ácido 4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77-pentacosaoxa-5-azaoctacontan-80-oico



[671] A una solución agitada de ácido 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-tetracosaoxapentaheptacontan-75-oico (100 mg, 0,087 mmol, 1,0 equiv.) y DIPEA (24,8 mg, 34 µL, 0,192 mmol, 2,2 equiv.) en diclorometano (0,5 mL) se agregó cloroformiato de etilo (9,5 mg, 8,34 µL, 1,0 equiv.). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo resultante se colocó en DMSO (1 mL) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización se obtuvo ácido 4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77-pentacosaoxa-5-azaoctacontan-80-oico (75 mg, 0,062 mmol, 71% de rendimiento). LC/MS [M-H]- 1217,3 Rt=0,81 min. (2 min, método ácido). 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,03 (s, 1H), 3,97 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,60 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,50 (d, J = 5,0 Hz, 92H), 3,40 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 3,11 (q, J = 5,9 Hz, 2H), 2,45 (q, J = 6,5 Hz, 2H), 1,15 (t, J = 7,1 Hz, 3H,).

Síntesis de ácido 4-oxo-2,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77-pentacosaoxa-5-azaoctacontan-80-oico



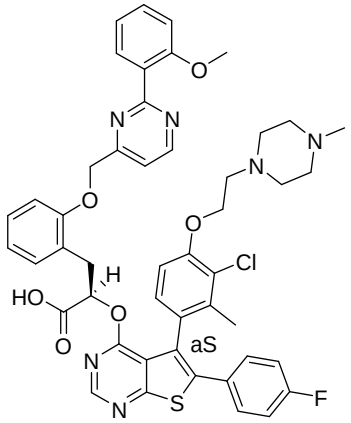
[672] A una solución agitada de ácido 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-tetracosaoxapentaheptacontan-75-oico (100 mg, 0,087 mmol, 1,0 equiv.) y DIPEA (24,8 mg, 34 µL, 0,192 mmol, 2,2 equiv.) en diclorometano (0,5 mL) se agregó cloruro de metoxiacetilo (11,36 mg, 9,57 µL, 1,2 equiv.). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo resultante se colocó en DMSO (1 mL) y se purificó mediante cromatografía RP-HPLC ISCO Gold (10-100% MeCN/H2O, 0,1% de modificador TFA). Después de la liofilización se obtuvo ácido 4-oxo-2,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77-pentacosaoxa-5-azaoctacontan-80-oico (69 mg, 0,057 mmol, 65% de rendimiento). LC/MS [M-H]- 1217,4 Rt=0,75 min. (2 min, método ácido). 1H RMN (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,68 (s, 1H), 3,79 (s, 2H), 3,60 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,51 (s, 92H), 3,43 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,30 (s, 3H), 3,26 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,44 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Ejemplo 3: Síntesis y caracterización de cargas útiles de Mcl-1

[673] Los ejemplos de cargas útiles se sintetizaron usando los ejemplos de métodos que se describen en este ejemplo.

Preparación de C1:

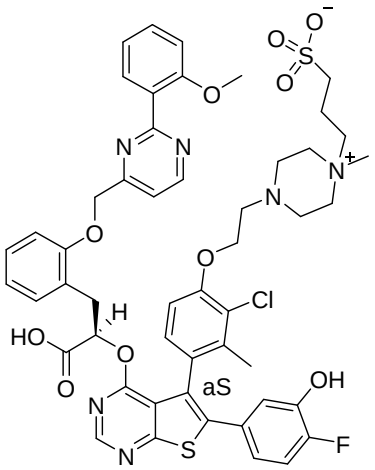
Ácido (*2R*)-2-{[(*5S*$_a$)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico



[674] C1 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 30 en WO 2015/097123.

Preparación de C2:

Ácido (2*R*)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-[4-metil-4-(3-sulfopropil) piperazin-4-io-1-il]etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-hidroxi-fenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



Paso A: 5-bromo-4-cloro-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidina

[675] Se disolvieron 4,49 g de 5-bromo-4-cloro-6-iodo-tieno[2,3-d]pirimidina (11,96 mmol; obtenida de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 1a) y 4,31 g de ácido (4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)borónico (17,94 mmol) en 60 ml de THF, luego se agregaron 134 mg de Pd(Oac)2 (0,60 mmol), 508 mg de tBuXPhos (1,20 mmol), 11,69 g de Cs2CO3 (35,88 mmol) y 60 ml de agua y la mezcla se agitó a 70 °C bajo atmósfera de N2 hasta que no se observaba más conversión. Después se diluyó con agua, se neutralizó con una solución acuosa 2 M HCl y se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash usando heptano y EtOAc como eluyentes para dar 5-bromo-4-cloro-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidina. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 9,02 (s, 1H), 7,64 (dd, *J* = 7,9, 2,1 Hz, 1H), 7,47 (dd, *J* = 11,0, 8,5 Hz, 1H), 7,36 (m, 1H), 5,63 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,61 (m, 1H), 1,94-1,78 (m, 3H), 1,69-1,50 (m, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 166,6, 153,9, 153,1, 152,7, 144,3, 139,2, 127,7, 126,6, 124,2, 119,9, 117,1, 100,7, 97,2, 61,6, 29,5, 24,5, 18,2. HRMS calculada para $C_{17}H_{13}N_2O_2SBrClF$: 441,9554; hallada 442,9624 (M+H).

Paso B: (2R)-2-[5-bromo-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo

[676] Se disolvieron 3,09 g de 5-bromo-4-cloro-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidina (6,97 mmol), 3,28 g de (2R)-2-hidroxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (8,02 mmol; obtenida de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 3bs) en 70 ml de *ter*-butanol, luego se agregaron 6,82 g de Cs_2CO_3 (20,9 mmol) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de N_2 a 70 °C hasta que no se observaba más conversión. Después se diluyó con agua, se neutralizó con una solución

acuosa 2 M de HCl y se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash usando heptano y EtOAc como eluyentes para dar (2R)-2-[5-bromo-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo como una mezcla de diastereoisómeros. HRMS calculada para $C_{40}H_{36}N_4O_7SBrF$: 814,1472; hallada 815,1539 (M+H).

Paso C: (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo

[677] Se disolvieron 3,65 g de (2R)-2-[5-bromo-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (4,47 mmol) y 2,12 g 1-[2-[2-cloro-3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]etil]-4-metil-piperazina (5,36 mmol; obtenida de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 5b) en 22 ml de dioxano, luego se agregaron 315 mg de $PdCl_2$×AtaPhos (0,45 mmol), 4,37 g de Cs_2CO_3 (13,41 mmol) y 22 ml de agua y la mezcla se agitó a 70 °C bajo atmósfera de N_2 hasta lograr una conversión completa. Después se diluyó con agua, se neutralizó con una solución acuosa 2 M de HCl, y se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash usando EtOAc y MeOH, luego DCM y MeOH, como eluyentes para dar (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo como una mezcla de dos pares de diastereoisómeros. HRMS calculada para $C_{54}H_{56}N_6O_8SClF$: 1002,3553; hallada 1003,3614 y 1003,3622 (M+H).

Paso D: Ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

Se disolvieron 3,47 g de (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (3,46 mmol) en 35 ml de dioxano, luego se agregaron 1,45 g de $LiOH×H_2O$ (34,6 mmol) y 35 ml de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta una hidrólisis completa. Después se diluyó con agua, se acidificó hasta pH 4 con una solución acuosa 2 M de HCl, y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. Los atropisómeros se purificaron y separaron mediante cromatografía preparativa de fase reversa usando una solución acuosa 25 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes.

El par de atropisómeros que eluyó después se aisló como ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico. HRMS calculada para $C_{52}H_{52}N_6O_8SClF$: 974,3240; hallada 975,3303 (M+H).

Paso E: (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de (4-metoxifenil)metilo

[678] Se disolvieron 2,39 g de ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (2,45 mmol), 1,13 g de DTBAD (4,91 mmol) y 1,29 g de PPh_3 (4,91 mmol) en 49 ml de tolueno, luego se agregaron 0,61 ml de PMB-OH (4,91 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C hasta observar conversión completa. Después, la mezcla se diluyó con DCM y luego se concentró bajo presión reducida y luego se purificó mediante cromatografía flash, usando heptano y EtOAc como eluyentes para dar (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de (4-metoxifenil)metilo como una mezcla de diastereoisómeros. HRMS calculada para $C_{60}H_{60}N_6O_9SClF$: 1094,3815; hallada 1095,3880 (M+H).

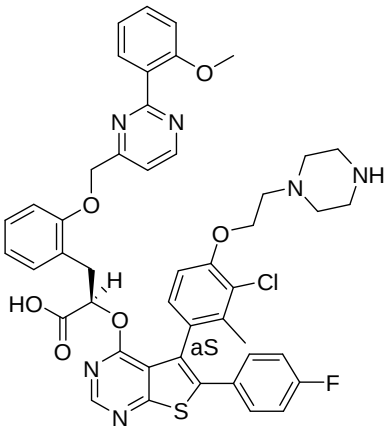
Paso F: Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-[4-metil-4-(3-sulfopropil) piperazin-4-io-1-il]etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-hidroxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico (C2)

[679] Se disolvieron 600 mg de (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluoro-3-tetrahidropiran-2-iloxi-fenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de (4-metoxifenil)metilo (0,548 mmol) en 11 ml de MeCN, luego se agregaron 0,48 ml de 2,2-dióxido de oxatiolano (5,48 mmol), y la mezcla se agitó bajo atmósfera de N_2 a 60 °C hasta observar conversión completa. Después se concentró bajo presión reducida, se disolvió en 8 ml de DCM, luego se agregó 2,2 ml de TFA y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta observar una escisión completa de THP y PMB. Después se concentró (se retiró el baño de calentamiento). Se disolvió en 10 ml de THF y se concentró nuevamente bajo presión reducida en un baño a 30 °C. El producto crudo se purificó mediante cromatografía preparativa de fase reversa usando una solución acuosa 5 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes para obtener C2. $_1$H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 13,19 (br s, 1H), 10,16 (br s, 1H), 8,89 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,68 (br s, 1H), 7,52 (dd, *J* = 7,5, 1,8 Hz, 1H), 7,46 (m, 1H), 7,33 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,22-7,09 (m, 4H), 7,06-7,00 (m, 2H), 6,86 (dd, *J* = 8,3, 2,0 Hz, 1H), 6,74 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,66 (m, 1H), 6,23 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,46 (dd, *J* = 9,8, 3,3 Hz, 1H), 5,27 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H), 5,22 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H), 4,23 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,46 (m, 2H), 3,41-3,23 (m, 5H), 2,97 (s, 3H), 2,94-

2,77 (m, 6H), 2,48 (m, 1H), 2,45 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,00-1,90 (m, 2H), 1,86 (s, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 170,8, 166,2, 165,9, 164,7, 157,7, 157,2, 155,4, 153,6, 152,7, 152,3, 149,9, 145,1, 137,0, 135,9, 131,0, 130,8, 130,3, 129,2, 128,34, 128,32, 128,2, 128,0, 122,0, 120,5, 120,1, 118,8, 118,2, 116,6, 115,6, 112,2, 111,9, 110,6, 73,3, 69,0, 67,3, 59,2, 59,1, 55,71, 55,68, 47,6, 46,1, 31,8, 18,1, 17,6. HRMS calculada para $C_{50}H_{50}N_6O_{10}S_2ClF$: 1012,2703; hallada 1013,2775 (M+H).

Preparación de C3:

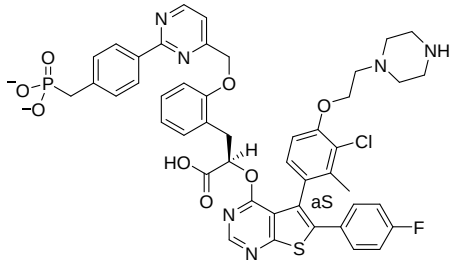
Ácido (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(piperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico



[680] C3 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 744 de WO 2015/097123.

Preparación de C4:

Ácido (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(piperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico



Paso 1: (2R)-2-[5-bromo-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil]propanoato de etilo

[681] A una solución de (2R)-3-[2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil]-2-hidroxi-propanoato de etilo (25 g, 74,2 mmol) en THF (38 ml) se agregó sin inconvenientes 5-bromo-6-(4-fluorofenil)-4-iodo-tieno[2,3-d]pirimidina (23 g, 67,5 mmol) y carbonato de cesio (67 g, 203 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante la noche, y los volátiles se evaporaron. El residuo se diluyó con acetato de etilo y agua (respectivamente, 500 y 400 ml) y la solución se

filtró. La capa orgánica se separó, se lavó con salina, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró bajo vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de acetato de etilo en éter de petróleo para obtener (2R)-2-[5-bromo-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil]propanoato de etilo como un sólido ligeramente anaranjado. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 8,83 (d, 1H), 8,65 (s, 1H), 7,75 (m, 2H), 7,71 (d, 1H), 7,48 (d, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,25 (t, 1H), 7,06 (d, 1H), 6,95 (t, 1H), 5,75 (dd, 1H), 5,28 (2*d, 2H), 4,18 (q, 2H), 3,6/3,3 (2*dd, 2H), 1,12 (t, 3H). Longitud de onda IR (cm^{-1}): 1749.

Paso 2: (4-bromo-2-cloro-3-metil-fenoxi)-triisopropil-silano

[682] A una solución de 4-bromo-2-cloro-3-metil-fenol (100 g, 482 mmol) en diclorometano (1,5 l) se agregaron imidazol (82 g, 1,2 mol) y cloro(triisopropil)silano (102 ml, 482 mmol) por gotas durante 1 h. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se agregó agua (500 ml). Las capas orgánicas se lavaron con salina (200 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron. El residuo se usó sin purificación adicional. $_1$H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,48 (s, 1H), 7,2 (dd, 1H), 6,7 (d, 1H), 1,3 (m, 3H), 1,1 (2s, 18H).

Paso 3: ter-butil-[2-cloro-3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]-dimetil-silano

[683] A una solución de (4-bromo-2-cloro-3-metil-fenoxi)-triisopropil-silano (27,2 g, 71,9 mmol) en THF (350 ml) a -78 °C bajo argón se agregó una solución de n-butilo litio 1,6 M en THF (49,5 ml, 79,9 mmol) por gotas sobre un período de 30 min. La reacción se agitó a -78 °C durante 2 h y se agregó una solución de 2-isopropoxi-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (16,1 g, 86,4 mmol) en THF (50 ml) por gotas sobre un período de 30 min. Después de 2 h de agitación a -78 °C, la mezcla de reacción se neutralizó mediante adición lenta de agua (20 ml) y se calentó a temperatura ambiente, se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron bajo vacío. El residuo se usó sin purificación adicional. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 7,5 (d, 1H), 6,82 (d, 1H), 2,52 (s, 3H), 1,32 (m, 3H), 1,3 (s, 12H), 1,08 (s, 18H).

Paso 4: 2-cloro-3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol

[684] A una solución de ter-butil-[2-cloro-3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]-dimetil-silano (25,4 g, 59,8 mmol) en THF (750 ml) se agregó una solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en THF (90 ml, 90 mmol) por gotas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h, se concentró, se diluyó con acetato de etilo, se particionó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron bajo vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de etanol en

diclorometano) para obtener 2-cloro-3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol. $_1$H RMN (400 MHz, dmso-d6): δ 10,4 (m, 1H), 7,4 (d, 1H), 6,8 (d, 1H), 2,5 (s, 3H), 1,3 (s, 12H). Longitud de onda IR (cm^{-1}): 3580-3185, 1591, 857, 827.

Paso 5: (2R)-2-{[(5S$_a$)-5-(3-cloro-4-hidroxi-2-metilfenil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-{2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil}propanoato de etilo

[685] A una solución de (2R)-2-[5-bromo-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil]propanoato de etilo (43,8 g, 61,2 mmol) y 2-cloro-3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol (19,7 g, 73,5 mmol) en una mezcla de THF/H_2O 1/1 (800 ml) se agregó carbonato de cesio (40 g, 122 mmol). La reacción se desgaseó mediante burbujeo de argón por la solución durante 20 min y se agregó bis(di-ter-butil(4-dimetilaminofenil)fosfina)dicloropaladio(II) (4,35 g, 6,1 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 80 °C bajo argón durante la noche. La reacción se diluyó con agua, se particionó con acetato de etilo y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron bajo vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano) para obtener (2R)-2-[5-(3-cloro-4-hidroxi-2-metil-fenil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil]propanoato de etilo como una mezcla de diastereoisómeros 85/15 (aS/aR o S_a/R_a). La forma *aS* (o S_a) ópticamente pura se obtuvo mediante purificación con SFC preparativa.

Paso 6: 4-(2-{2-cloro-4-[4-{[(2R)-3-{2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil}-1-etoxi-1-oxopropan-2-il]oxi}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metilfenoxi}etil)piperazin-1-carboxilato de ter-butilo

[686] A una solución de trifenilfosfina (2,66 g, 10 mmol) en THF se agregó azodicarboxilato de diisopropilo (2,33 g, 10 mmol) a temperatura ambiente bajo argón. Después de 15 min de agitación, se agregó una solución de 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-carboxilato de ter-butilo (2,33 g, 10 mmol) en THF (8 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, luego se agregó por gotas una solución y ácido (2R)-2-[(5*S$_a$*)-5-(3-cloro-4-hidroxi-2-metil-fenil)-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil]propanoico (3,57 g, 5 mmol) en THF (8 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 96 h y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol (que contiene amoníaco 7 M) en diclorometano) para obtener 4-(2-{2-cloro-4-[4-{[(2R)-3-{2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil}-1-etoxi-1-oxopropan-2-il]oxi}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metilfenoxi}etil)piperazin-1-carboxilato de ter-butilo. $_1$H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,95 (d, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,32 (d, 2H), 7,58 (d, 1H), 7,41 (dd, 2H), 7,32 (d, 1H), 7,29 (dd, 2H), 7,22 (t, 2H), 7,21 (d, 1H), 7,19 (t, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,75 (t, 1H), 6,31 (dd, 1H), 5,53 (dd, 1H), 5,29 (dd, 2H), 4,2 (m, 2H), 4,05 (q, 2H), 3,97 (m, 4H), 3,3 (m, 2H), 3,2 (t, 4H), 3,19/2,59 (m, 2H), 2,72 (t, 2H), 2,4 (t, 4H), 1,87 (s, 3H), 1,37 (s, 9H), 1,18 (t,

6H), 1,05 (t, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, $CDCl_3$): δ 158, 152, 131, 131, 130, 130, 128, 127, 120,5, 116, 116, 112, 110, 73, 68,5, 67, 62, 61, 56, 52, 43, 32, 32, 28, 17, 16, 14.

Paso 7: 4-(2-{2-cloro-4-[4-{[(2R)-3-{2-[(2-{4-[(dietoxifosforil)metil]fenil}pirimidin-4-il)metoxi]fenil}-1-etoxi-1-oxopropan-2-il]oxi}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metilfenoxi}etil)piperazin-1-carboxilato de ter-butilo

[687] A una solución de 4-(2-{2-cloro-4-[4-{[(2R)-3-{2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil}-1-etoxi-1-oxopropan-2-il]oxi}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metilfenoxi}etil)piperazin-1-carboxilato de ter-butilo (337 mg, 0,367 mmol) y ácido [4-(dietoxifosforilmetil)fenil]borónico (200 mg, 0,735 mmol) en dioxano (2,5 ml), se agregaron agua (2,5 ml) y carbonato de cesio (241 mg, 0,735 mmol). La mezcla de reacción se desgaseó mediante burbujeo de argón a través de la solución durante 30 min. Se agregó diclorhidrato de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (2,5 mg, 3,6 µmol) y la mezcla de reacción se calentó mediante irradiación de microondas en un recipiente sellado a 90 °C durante 3 h. La reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salina, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron bajo vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano) para obtener 4-(2-{2-cloro-4-[4-{[(2R)-3-{2-[(2-{4-[(dietoxifosforil)metil]fenil}pirimidin-4-il)metoxi]fenil}-1-etoxi-1-oxopropan-2-il]oxi}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metilfenoxi}etil)piperazin-1-carboxilato de ter-butilo. $_1$H RMN (500 MHz, dmso-d6): δ 8,95 (d, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,32 (d, 2H), 7,58 (d, 1H), 7,41 (dd, 2H), 7,32 (d, 1H), 7,29 (dd, 2H), 7,22 (t, 2H), 7,21 (d, 1H), 7,19 (t, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,75 (t, 1H), 6,31 (dd, 1H), 5,53 (dd, 1H), 5,29 (2*d, 2H), 4,2 (m, 2H), 4,05 (q, 2H), 3,97 (m, 4H), 3,3 (m, 2H), 3,2 (t, 4H), 3,19/2,59 (2*dd, 2H), 2,72 (t, 2H), 2,4 (t, 4H), 1,87 (s, 3H), 1,37 (s, 9H), 1,18 (t, 6H), 1,05 (t, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, dmso-d6) δ 158, 152, 131, 131, 130, 130, 128, 127, 120,5, 116, 116, 112, 110, 73, 68,5, 67, 62, 61, 56, 52, 43, 32, 32, 28, 17, 16, 14

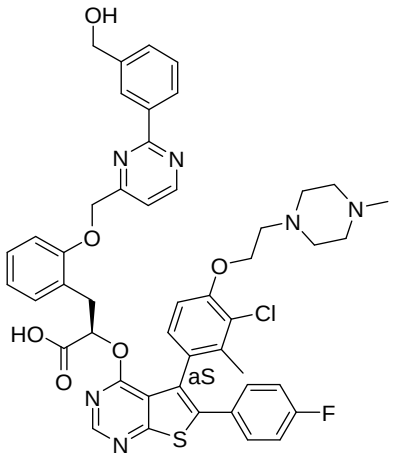
Paso 8: Síntesis de ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-2-metil-4-(2-piperazin-1-iletoxi)fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-[4-(fosfonometil)fenil]pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

[688] A una solución de 4-(2-{2-cloro-4-[4-{[(2R)-3-{2-[(2-{4-[(dietoxifosforil)metil]fenil}pirimidin-4-il)metoxi]fenil}-1-etoxi-1-oxopropan-2-il]oxi}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-5-il]-3-metilfenoxi}etil)piperazin-1-carboxilato de ter-butilo (540 mg, 0,486 mmol) en diclorometano (5 ml) se agregó bromotrimetilsilano (186 µl, 1,46 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante la noche. Se agregó otra porción de bromotrimetilsilano a temperatura ambiente (186 µl, 1,46 mmol) y la reacción se calentó a reflujo durante 20 h y se concentró hasta sequedad. El residuo se tomó en metanol, se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se concentró para obtener un aceite viscoso marrón que se diluyó con dioxano (4 ml) y agua (4 ml). Se agregó hidróxido de litio monohidratado

(100 mg, 24 mmol) por porciones y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se calentó a 45 °C durante 3 h y se concentró. El residuo se diluyó con agua (5 ml), se acidificó a pH 2 mediante adición por gotas de una solución acuosa 2 M de HCl. El precipitado se filtró, se lavó con THF y se purificó mediante prep-HPLC C18 de fase reversa con depósito directo de la mezcla de reacción en la columna Xbridge y de acuerdo con el Método de NH_4HCO_3 para obtener **C4**. $_1$H RMN (500 MHz, dmso-d6): δ 8,88 (br d, 1 H), 8,25 (d, 2 H), 7,75 (t, 1 H), 7,59 (s, 1 H), 7,52 (d, 1 H), 7,35 (d, 2 H), 7,23 (dd, 2 H), 7,18 (d, 1 H), 7,15 (t, 2 H), 7,11 (t, 1 H), 7,02 (d, 1 H), 6,82 (d, 1 H), 6,64 (m, 1 H), 5,51 (d, 1 H), 5,28/5,07 (m, 2 H), 3,82/3,55 (2m, 2 H), 3,35/2,55 (br s, 2 H), 2,81 (d, 2 H), 2,55 (m, 4 H), 2,4/2,27 (2m, 2 H), 2,21 (m, 4 H), 1,65 (br s, 3 H). ^{13}C RMN (125 MHz, dmso-d6): δ 131,5, 130,2, 129,7, 127,4, 127,2, 120,3, 115,9, 115,3, 111,9, 110,3, 75,1, 69,2, 67,3, 56,4, 49,9, 42,4, 40, 38,9, 18,1. ^{31}P RMN (200 MHz, dmso-d6): δ 15 HR-ESI+ : m/z [M+H]+ = 925,2356/925,2346 (medida/teórica)

Preparación de C5:

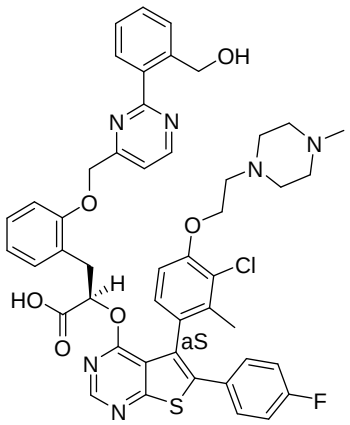
Ácido (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(4-hidroxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico



[689] C5 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 3 de WO 2016/207216.

Preparación de C6:

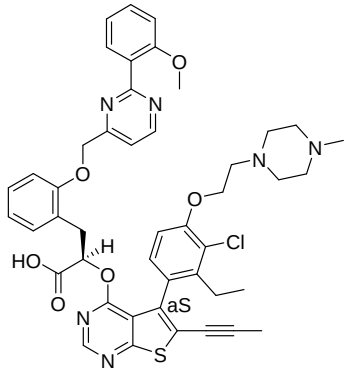
Ácido (*2R*)-2-{[(*5S*$_a$)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-[2-({2-[2-(hidroximetil)fenil]pirimidin-4-il}metoxi)fenil]propanoico



[690] C6 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 728 de WO 2015/097123.

Preparación de C7:

Ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-etil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



Paso A: (2R)-2-(5-iodo-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo

[691] Se disolvieron 5,0 g de 4-cloro-5-iodo-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidina (15,0 mmol; obtenida de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 2f) y 6,10 g de (2R)-2-hidroxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (15,0 mmol; obtenida de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 3bs) en 150 ml de *ter*-butanol, luego se agregaron 14,7 g de Cs_2CO_3 (45,0 mmol) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de N_2 a 50 °C hasta que no se observaba más conversión. Después se agregó agua y salina y la mezcla se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash usando heptano y EtOAc como eluyentes para dar (2R)-2-(5-iodo-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo. $_1$H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 8,89 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,62 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 7,55 (dd, *J* = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,51 (dd, *J* = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,43 (m, 1H), 7,26 (m, 1H), 7,11 (m, 2H), 7,02 (td, *J* = 7,5, 0,9 Hz, 1H), 6,94 (td, *J* = 7,4, 0,8 Hz, 1H), 5,79 (dd, *J*

= 9,1, 4,6 Hz, 1H), 5,31 (d, *J* = 14,9 Hz, 1H), 5,26 (d, *J* = 14,9 Hz, 1H), 4,13 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,60 (dd, *J* = 13,8, 4,5 Hz, 1H), 3,33 (m, 1H), 2,21 (s, 3H), 1,10 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 169,4, 166,5, 165,7, 164,8, 161,3, 157,7, 155,8, 153,6, 132,2, 131,0, 130,8, 128,3, 124,0, 120,9, 120,1, 115,5, 112,2, 112,0, 110,5, 98,9, 79,5, 74,4, 74,3, 69,1, 61,1, 55,7, 13,9, 4,6.

Paso B: 2-cloro-3-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol

[692] Se disolvieron 33,7 g de [2-cloro-3-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]-triisopropil-silano (76,9 mmol; obtenida de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 5e) en 600 ml de THF y se enfrió a 0 °C, luego se agregaron 92,3 ml de TBAF (92,3 mmol, solución 1 M en THF) por gotas y la mezcla se agitó hasta observar conversión completa. Después se diluyó con salina, se acidificó con ácido cítrico, luego se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash usando heptano y EtOAc como eluyentes para dar 2-cloro-3-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol. $_1$H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,63 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,86 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,87 (s, 1H), 3,09 (q, *J* = 7,44 Hz, 2H), 1,33(s, 12H), 1,15 (t, *J* = 7,44 Hz, 3H).

Paso C: (2R)-2-[5-(3-cloro-2-etil-4-hidroxi-fenil)-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo

[693] Se disolvieron 353 mg de (2R)-2-(5-iodo-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il)oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,50 mmol) y 282 mg de 2-cloro-3-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol (0,55 mmol) en 2 ml de dioxano, luego se agregaron 35 mg de $PdCl_2$×AtaPhos (0,05 mmol), 326 mg de Cs_2CO_3 (1,00 mmol) y 1 ml de agua y la mezcla se agitó en un reactor de microondas a 100 °C bajo atmósfera de N_2 durante 20 minutos. Después se diluyó con salina, se acidificó en pH 5 con una solución acuosa 1 M de HCl y se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash usando heptano y EtOAc como eluyentes. Después se purificó adicionalmente mediante cromatografía preparativa de fase reversa usando una solución acuosa 5 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes para dar (2R)-2-[5-(3-cloro-2-etil-4-hidroxi-fenil)-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo como una mezcla 2:1 de los atropisómeros. $_1$H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 10,35/10,29 (s, 1H), 8,93 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 8,59/8,57 (s, 1H), 7,63/7,60 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 7,54-6,93 (m, 8 H), 6,84/6,74 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,43/6,18 (dd, *J* = 7,5, 1,4 Hz, 1H), 5,51/5,40 (m, 1H), 5,30-5,16 (m, 2H), 4,17-3,99 (m, 2H), 3,76/3,75 (s, 3H), 3,34-3,14 (m, 1H), 2,93-2,35 (m, 3H), 2,02/1,98 (s, 3H), 1,08/1,04 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H), 0,94/0,76 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

Paso D: Ácido (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-etil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-prop-1-

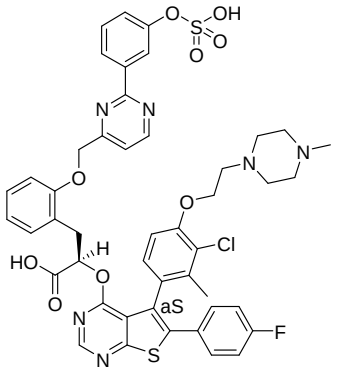
inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico,

C7

[694] Se disolvieron 322 mg de (2R)-2-[5-(3-cloro-2-etil-4-hidroxi-fenil)-6-prop-1-inil-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,44 mmol), 190 mg de 2-(4-metilpiperazin-1-il)etanol (1,32 mmol) y 346 mg de PPh_3 (1,32 mmol) en 10 ml de tolueno seco, luego se agregaron 304 mg de DTBAD (1,32 mmol) y la mezcla se agitó a 50 °C bajo atmósfera de N_2 hasta que no se observaba más conversión. Después la mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía flash usando heptano, EtOAc y MeOH como eluyentes, luego se purificó adicionalmente mediante cromatografía preparativa de fase reversa usando una solución acuosa 5 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes para obtener el intermediario éster. Se disolvió en 2 ml de dioxano, luego se agregaron 84 mg de $LiOH \times H_2O$ (2,00 mmol) y 1 ml de agua. La mezcla se agitó a 50 °C hasta una hidrólisis completa. Después se diluyó con salina, se neutralizó con una solución acuosa 2 M de HCl y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. Los atropoisómeros se purificaron y separaron mediante cromatografía preparativa de fase reversa usando una solución acuosa 5 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes. El atropoisómero que eluyó después se aisló como **C7**. $_1$H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 8,88 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,60 (s, 1H), 7,76 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 7,54 (dd, *J* = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 7,46 (m, 1H), 7,26 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,20-7,13 (m, 3H), 7,04 (td, *J* = 7,5, 0,9 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,78 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,32 (dd, *J* = 7,4, 1,5 Hz, 1H), 5,48 (dd, *J* = 9,7, 2,9 Hz, 1H), 5,27 (d, *J* = 15,0 Hz, 1H), 5,19 (d, *J* = 15,0 Hz, 1H), 4,23 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,31 (m, 1H), 2,75 (m, 2H), 2,47 (m, 1H), 2,64-2,36 (m, 10H), 2,22 (s, 3H), 2,01 (s, 3H), 0,74 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 165,95, 165,89, 164,7, 157,8, 157,2, 155,3, 154,0, 141,6, 135,6, 131,0, 130,8, 130,1, 128,4, 128,0, 127,2, 121,4, 120,1, 117,8, 112,2, 111,7, 97,2, 74,9, 68,9, 67,1, 56,1, 55,7, 54,0, 32,7, 24,4, 13,1, 4,4. HRMS calculada para $C_{45}H_{45}N_6O_6SCl$: 832,2810; hallada 833,2878 (M+H).

Preparación de C8:

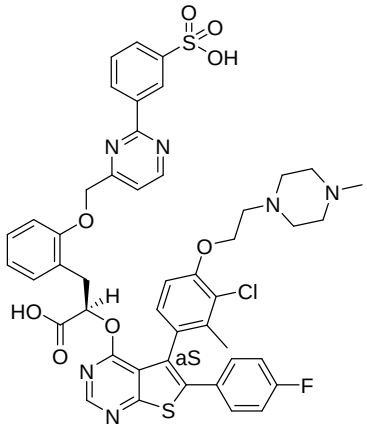
Ácido (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-sulfooxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico



[695] Se disolvieron 210 mg de (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(3-hidroxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,24 mmol; obtenido de acuerdo con WO 2016/207216, Preparación 2) en 9,3 ml de piridina, luego se agregaron 0,38 ml de SO_3×piridina (2,36 mmol) y la mezcla se agitó a 70 °C hasta observar conversión completa. Después la mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo se disolvió en 2 ml de dioxano, luego se agregaron 200 mg de KOH (3,56 mmol) y 1 ml de agua. La mezcla se agitó a 70 °C hasta una hidrólisis completa del éster Et. Después se neutralizó con una solución acuosa 5 M de HCl, y se purificó mediante cromatografía preparativa de fase reversa (inyección directa) usando una solución acuosa 25 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes para dar **C8**. $_1$H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 8,93 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,27 (m, 1H), 8,13 (m, 1H), 7,61 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 7,43 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,32-7,27 (m, 3H), 7,23-7,13 (m, 4H), 7,05 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 6,73 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,31 (dd, *J* = 7,5, 1,3 Hz, 1H), 5,51 (dd, *J* = 9,8, 3,5 Hz, 1H), 5,34 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H), 5,27 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H), 4,24-4,08 (m, 2H), 3,26 (dd, *J* = 14,3, 3,4 Hz, 1H), 3,10-2,52 (m, 14H), 1,82 (s, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 170,8, 166,5, 166,4, 162,8, 162,7, 158,3, 155,3, 154,0, 153,6, 152,9, 137,8, 136,8, 135,9, 131,12, 131,05, 130,4, 130,3, 129,1, 128,5, 128,2, 127,8, 124,4, 123,5, 122,7, 121,9, 120,5, 120,2, 118,8, 116,0, 115,9, 112,0, 110,5, 73,5, 69,1, 67,2, 55,4, 43,1, 31,8, 17,5. HRMS calculada para $C_{46}H_{42}N_6O_9S_2ClF$: 940,2127; hallada 941,2191 (M+H).

Preparación de C9:

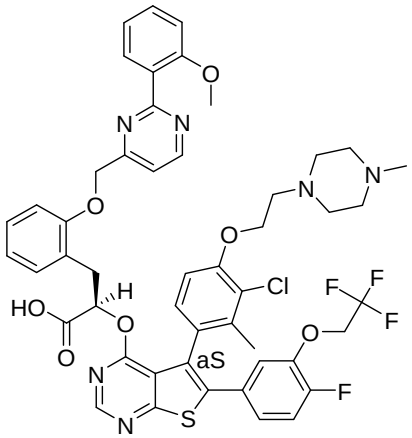
Ácido 2*R*)-2-{[5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(3-sulfofenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico



[696] Se disolvieron 750 mg de (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,89 mmol; obtenido de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 10a) en 9 ml de THF, luego se agregaron 726 mg de ácido [3-(2,2-dimetilpropoxisulfonil)fenil]borónico (2,67 mmol), 62 mg de $Pd(PPh_3)_4$ (0,05 mmol) y 509 mg de tiofen-2-carboniloxi cobre (2,67 mmol) y la mezcla se agitó a 75 °C hasta observar conversión completa. Después se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía flash usando heptano, EtOAc y una solución 0,7 M de NH_3 en MeOH como eluyentes. Luego se disolvió en 20 ml de 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol, se agregaron 4,5 ml de TFA y la mezcla se agitó a 80 °C hasta una hidrólisis completa del éster sulfónico. La mezcla se concentró bajo presión reducida y luego se disolvió en 5 ml de dioxano, después se agregaron 210 mg de $LiOH \times H_2O$ (5,00 mmol) y 2 ml de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta una hidrólisis completa. Luego se diluyó con salina, se neutralizó con una solución acuosa 2 M de HCl, y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. Los atropisómeros formados se purificaron y separaron mediante cromatografía preparativa de fase reversa usando una solución acuosa 25 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes, luego se purificaron adicionalmente usando 0,1% de una solución acuosa de TFA y MeCN como eluyentes para dar C9. $_1$H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 13,19 (br s, 1H), 9,48 (br s, 1H), 8,94 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 8,74 (t, *J* = 1,6 Hz, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,37 (dt, *J* = 7,8, 2,9 Hz, 1H), 7,78 (dt, *J* = 7,6, 1,5 Hz, 1H), 7,60 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 7,51 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,29 (m, 3H), 7,22-7,14 (m, 3H), 7,13-7,05 (m, 2H), 6,74 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,38 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 5,53 (dd, *J* = 9,6, 3,6 Hz, 1H), 5,37 (d, *J* = 15,3 Hz, 1H), 5,31 (d, *J* = 15,3 Hz, 1H), 4,2 (m, 2H), 3,50-2,88 (m, 11H), 2,76 (s, 3H), 2,61 (dd, *J* = 14,2, 9,7 Hz, 1H), 1,79 (s, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 170,8, 166,5, 163,0, 162,7, 161,1, 158,4, 155,4, 153,3, 152,9, 148,6, 136,6, 136,0, 131,1, 130,1, 129,0, 128,5, 128,3, 128,1, 127,9, 125,3, 124,4, 121,9, 120,5, 118,8, 116,2, 116,0, 115,9, 112,1, 110,5, 73,2, 69,1, 66,5, 55,0, 51,7, 49,7, 42,1, 31,5, 17,5. HRMS calculada para $C_{46}H_{42}N_6O_8S_2ClF$: 924,2178; hallada 925,2274 (M+H).

Preparación de C10:

Ácido (2R)-2-[($5S_a$)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-[4-fluoro-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil]tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

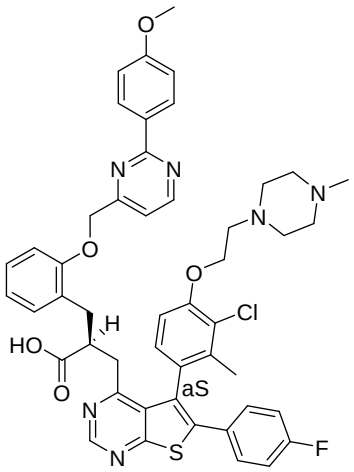


[697] Se disolvieron 250 mg de (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-iodo-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,27 mmol; obtenido de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 30) y 79 mg de ácido [4-fluoro-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil]borónico (0,40 mmol) en 1 ml de THF, luego se agregaron 3,0 mg de $PdOAc_2$ (0,013 mmol), 5,7 mg de tBuXPhos (0,013 mmol), 174 mg de Cs_2CO_3 (0,53 mmol) y 0,27 ml de agua y la mezcla se agitó a 70 °C bajo atmósfera de N_2 durante 2 horas. Después se diluyó con salina y se extrajo con 2-MeTHF. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto crudo de éster se purificó mediante cromatografía flash usando heptano, EtOAc y una solución 0,7 M de NH_3 en MeOH como eluyentes. Después se disolvió en 5,3 ml de dioxano, luego se agregaron 64 mg de $LiOH \times H_2O$ (1,52 mmol) y 1,3 ml de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta una hidrólisis completa. Después se diluyó con salina, se neutralizó con una solución acuosa 2 M de HCl y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. Los atropisómeros se purificaron y separaron mediante cromatografía preparativa de fase reversa usando una solución acuosa 25 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes. El atropisómero que eluyó después se aisló como C10. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 8,91 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,57 (s, 1H), 7,82 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 7,53 (dd, *J* = 7,5, 1,7 Hz, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,27 (dd, *J* = 11,0, 8,6 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,16-7,09 (m, 3H), 7,03 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,98 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,92 (m, 1H), 6,69 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,16 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 5,47 (dd, *J* = 10,3, 2,6 Hz, 1H), 5,25 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 5,19 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 4,75-4,53 (m, 2H), 4,21 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,41 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 2,77-2,30 (m, 12H), 2,24 (s, 3H), 1,81 (s, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 171,3, 166,2, 166,0, 164,6, 163,5, 157,9, 157,2, 155,3, 153,7, 153,1,

152,1, 150,5, 144,6, 135,8, 131,0, ,130,8, 130,7, 129,6, 129,1, 128,4, 128,1, 127,8, 125,4, 123,7, 122,0, 120,4, 120,1, 118,8, 117,0, 116,7, 115,6, 112,2, 111,7, 110,5, 74,8, 68,9, 67,2, 65,6, 56,0, 55,7, 53,8, 52,0, 44,6, 32,7, 17,5. HRMS calculada para $C_{49}H_{45}N_6O_7SClF_4$: 972,2695; hallada 973,2761 (M+H).

Preparación de C11:

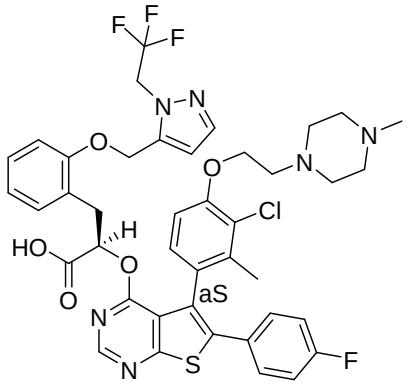
Ácido (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(4-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico



[698] C11 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 107 de WO 2015/097123.

Preparación de C12

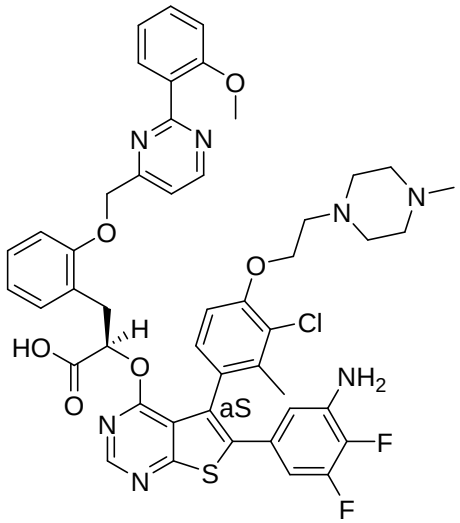
Ácido (*2R*)-2-{[(*5S*$_a$)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-5-il]metoxi}fenil)propanoico



[699] C12 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 77 de WO 2015/097123.

Preparación de C13

Ácido (2R)-2-[(5S$_a$)-6-(3-amino-4,5-difluoro-fenil)-5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoico

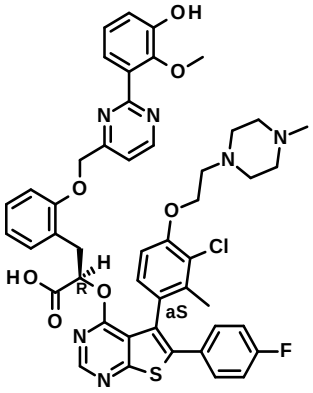


[700] Se disolvieron 250 mg de (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-iodo-tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,27 mmol; obtenido de acuerdo con WO 2015/097123, Preparación 30) y 102 mg de 2,3-difluoro-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina (0,41 mmol) en 1 ml de THF, luego se agregaron 3,0 mg de $PdOAc_2$ (0,013 mmol), 5,7 mg de tBuXPhos (0,013 mmol), 174 mg de Cs_2CO_3 (0,53 mmol) y 0,27 ml de agua y la mezcla se agitó a 70 °C bajo atmósfera de N_2 durante 2 horas. Después se diluyó con salina y se extrajo con 2-MeTHF. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. El producto éster crudo se purificó mediante cromatografía flash usando heptano, EtOAc y una solución 0,7 M de NH_3 en MeOH como eluyentes. Después se disolvió en 0,7 ml de dioxano, luego se agregaron 60 mg de $LiOH \times H_2O$ (1,43 mmol) y 0,18 ml de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta una hidrólisis completa. Después se diluyó con salina, se neutralizó con una solución acuosa 2 M de HCl y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida. Los atropoisómeros se purificaron y separaron mediante cromatografía preparativa de fase reversa usando una solución acuosa 25 mM de NH_4HCO_3 y MeCN como eluyentes. El atropisómero que eluyó después se aisló como C13. $_1$H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 8,89 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,56 (s, 1H), 7,76 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 7,53 (dd, *J* = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,36 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,13 (m, 2H), 7,03 (td, *J* = 7,5, 1,0 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,71 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,62 (m, 1H), 6,21 (d, *J* = 7,5, 1,3 Hz, 1H), 6,12 (m, 1H), 5,73 (s, 2H), 5,46 (dd, *J* = 10,1, 3,1 Hz, 1H), 5,25 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 5,19 (d, *J* = 15,2 Hz, 1H), 4,22 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,35 (m, 1H), 2,73 (m, 2H), 2,65-2,35 (m, 9H), 2,22 (s, 3H), 1,85 (s, 3H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 171,1, 166,0, 165,3, 163,3, 157,8, 157,2, 155,3, 153,7, 152,9, 149,0, 138,9, 137,1, 135,8, 131,0, 130,8, 130,4, 128,7, 128,4, 128,1, 127,8, 125,2, 122,0, 120,4, 120,1, 118,9, 115,6, 112,2, 111,9, 110,6, 103,2, 74,5, 68,9, 67,1, 56,0, 55,7, 53,9, 52,1, 44,7,

32,6, 17,6. HRMS calculada para $C_{47}H_{44}N_7O_6SClF_2$: 907,2730; hallada 908,2803 (M+H).

Preparación de C14

Ácido (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(3-hidroxi-2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico

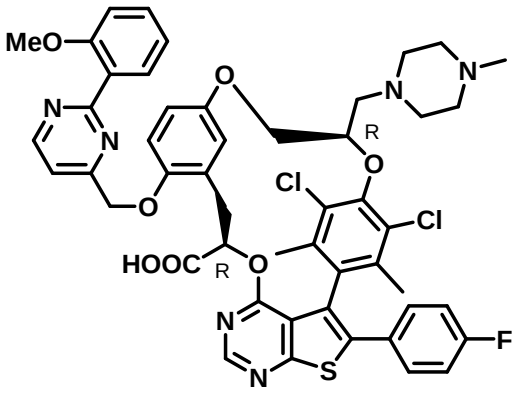


[701] Se disolvieron 210 mg de (2R)-2-[5-[3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil]-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi-3-[2-[(2-cloropirimidin-4-il)metoxi]fenil]propanoato de etilo (0,25 mmol, **WO2016/207216, Preparación 1**) y 84 mg de ácido (3-hidroxi-2-metoxi-fenil)borónico (0,50 mmol) en 3,8 ml de 1,4-dioxano, luego se agregaron 18 mg de $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (0,025 mmol), 240 mg de Cs_2CO_3 (0,75 mmol) y 3,8 ml de agua y la mezcla se agitó bajo atmósfera N_2 a 70°C hasta conversión completa. Después se diluyó con agua, se neutralizó con una solución acuosa 2 M de HCl, y se extrajo con DCM. La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y el material filtrado se concentró bajo presión reducida. El éster crudo se purificó mediante cromatografía flash usando heptano, EtOAc y 0,7 M de una solución de NH_3 en MeOH como eluyentes para obtener una mezcla de diastereoisómeros. Se disolvió en 2 ml dioxano, luego se agregaron 245 mg de $LiOH \times H_2O$ (5,85 mmol) y 1 ml de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta una hidrólisis completa. Después se neutralizó con solución acuosa 2 M de HCl, e inyectó directamente en RP-HPLC-prep, usando 0,1% de una solución acuosa de TFA y MeCN como eluyentes. El diastereoisómero que se eluyó más tarde se recogió como **C14**. ^{1}H RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 9,53 (brs, 1H), 8,91 (d, 1H), 8,56 (s, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,42 (d, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,19 (d, 1H), 7,18 (m, 2H), 7,12 (t, 1H), 7,06 (dd, 1H), 6,98 (m, 1H), 6,98 (m, 1H), 6,97 (d, 1H), 6,68 (t, 1H), 6,16 (d, 1H), 5,47 (m, 1H), 5,27/5,20 (d+d, 2H), 4,26/4,19 (m+m, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,38/2,42 (dd+dd, 2H), 2,74 (m, 2H), 2,55 (br., 4H), 2,47 (br., 4H), 2,25 (s, 3H), 1,80 (s,3 H). HRMS calculada para $C_{47}H_{44}N_6O_7SClF$: 890,2665; hallada 891,2721 (M+H).

Preparación de P15

ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-3-(4-fluorofenil)-14-[[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi]-24,25-dimetil-20-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-

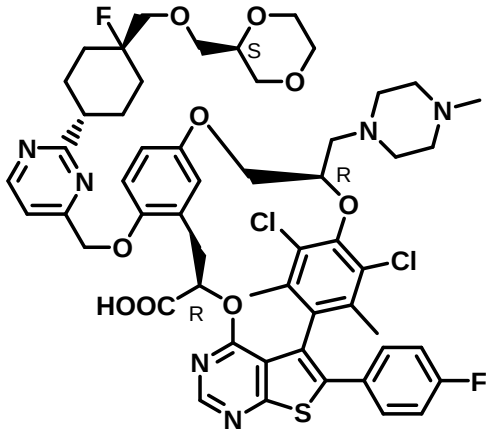
diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28] octacosa-1(25),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22(26),23-decaen-11-carboxílico



[702] Se preparó P15de acuerdo con el Ejemplo 116 en WO 2019/035914.

Preparación de P16

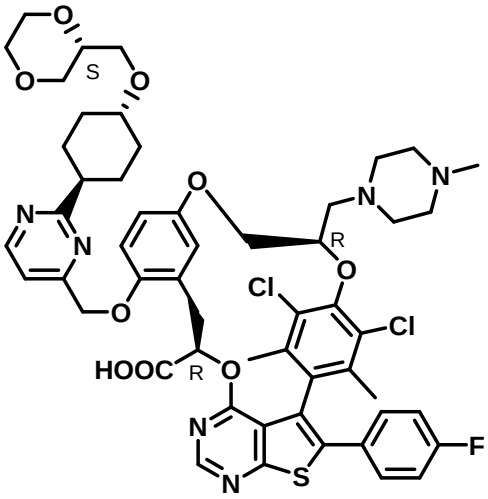
ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-14-[[2-[4-[[(2S)-1,4-dioxan-2-il]metoximetil]-4-fluoro-ciclohexil]pirimidin-4-il]metoxi]-3-(4-fluorofenil)-24,25-dimetil-20-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28]octacosa-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-decaen-11-carboxílico



[703] Se preparó P16 de acuerdo con el Ejemplo 28 en WO 2019/035911.

Preparación de P17

ácido (11R,20R)-23,26-dicloro-14-[[2-[4-[[(2S)-1,4-dioxan-2-il]metoxi]ciclohexil]pirimidin-4-il]metoxi]-3-(4-fluorofenil)-24,25-dimetil-20-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-10,18,21-trioxa-4-tia-6,8-diazapentaciclo[20,2,2,12,5,113,17,09,28]octacosa-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-decaen-11-carboxílico



[704] Se preparó P17de acuerdo con Ejemplo 44 en WO 2019/035911.

Ejemplo 4: Conjugación y caracterización analítica de los ADC anti-CD74

[705] Se sintetizaron ejemplos de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) usando los ejemplos de métodos que se describen más adelante. Los anticuerpos anti-CD74 (Milatuzumab) usados para la preparación de los ejemplos de ADC se definen mediante la abreviatura Ab M, CD74 o CD74_CysmAb (Tabla 6). El término "CysmAb" se refiere a mutaciones de cisteína en la cadena pesada del anticuerpo que se usan para conjugar el conector-cargas útiles al anticuerpo por medio de un grupo maleimida. Todos los Abs anti-CD74 conjugados, de longitud completa, usados en la presente contienen las mutaciones modificadas de cisteína E152C y S375C (numeradas de acuerdo con el sistema EU).

Tabla 6: Anticuerpos usados para la síntesis de los ejemplos de ADC

Abreviatura del anticuerpo	Anticuerpo	Mutación Fc	Secuencia (Cadena pesada/Cadena liviana)
Ab M o CD74	milatuzumab	Tipo salvaje	SEQ ID Nº: 12, 25
Anti-CD74-CysmAb Fc silente o CD74 Fc silente	milatuzumab	DANAPA Fc silente	SEQ ID Nº: 15, 25

Conjugación

[706] **Método C1:** El anticuerpo se unió a la resina RMP Proteína A (GE Healthcare) a una relación de 10 mg de Ab a 1 ml de resina en PBS durante 30 minutos mediante mezclado en una columna descartable de tamaño adecuado Biorad. Para desbloquear las cisteínas reactivas, se agregó clorhidrato de cisteína monohidratado hasta una concentración final de 20 mM. La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido por 5 lavados de la resina con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío. Luego la resina se resuspendió en un volumen igual de PBS que contiene $CuCl_2$ 250 nM y se incubó durante 1 hora y 30 min. El anticuerpo reoxidado se lavó 5 veces con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío y se resuspendió en un volumen igual de PBS. A esta mezcla se agregó un exceso molar 10X de una solución 20 mM de conector-carga útil y un volumen

igual de DMSO. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Para monitorear la conjugación, se retiraron 20 µl de lechada de resina, se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y luego se eluyó con 40 µl de solución amortiguadora de elución de anticuerpo (Thermo Fisher Scientific). El sobrenadante se analizó mediante cromatografía de fase inversa usando una columna Agilent PLRP-S 4000A de 5 um, 4,6 x 50 mm (solución amortiguadora A es agua, 0,1% de TFA, solución amortiguadora B acetonitrilo, 0,1% de TFA, la columna se mantuvo a 80 °C, velocidad de flujo 1,5 ml/min). Después de eliminar el exceso de conector-carga útil mediante lavado de la resina, 5 veces con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío, el ADC se eluyó de la proteína A con solución amortiguadora de elución de anticuerpo y se neutralizó con 1/10 volumen de Tris 1 M, pH 9,0. Se intercambió la solución amortiguadora de todos los ejemplos de ADC mediante diálisis en PBS 1X, pH 7,4 (Sigma Life Science, P3813, 10PAK), se concentró usando Vivaspin 20, 50KD, PES (Sartorius Stedim, VS2031), se filtró con esterilidad a través de un filtro PES estéril de 0,2 µm, 25 mm (Whatmann, G896-2502) y se guardó a 4 °C. Las conjugaciones se realizaron en un rango de 5 mg de anticuerpo. Todos los ejemplos de ADC fueron caracterizados mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare, 28990945) para determinar el porcentaje de monómeros y mediante LC-MS para la determinación de DAR (Tabla 16).

[707] **Método C2**: el anticuerpo se incubó con la resina RMP Proteína A (GE) a una relación de 10 mg de Ab a 1 ml de resina en PBS durante 15 minutos con mezclado en una columna descartable del tamaño apropiado. Se agregó cisteína HCl hasta una concentración final de 20 mM y se incubó con agitación durante 30 min a temperatura ambiente para permitir el desbloqueo de las cisteínas reactivas. La resina se lavó rápidamente con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío. La resina se volvió a suspender luego en un volumen igual de PBS que contiene 250 nM CuCl2 250 nM. La reformación de los disulfuros intercatenarios de los anticuerpos se monitoreó en puntos de tiempo. En cada punto de tiempo, se eliminaron 25 µl de suspensión de resina, se agregó 1 µl de MC-valcit-MMAE 20 mM y el tubo se agitó varias veces. La resina se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y luego se eluyó con 50 µl de solución amortiguadora de elución de anticuerpos (Thermo). La resina se peleteó y el sobrenadante se analizó mediante cromatografía de fase inversa usando una columna Agilent PLRP-S 4000A de 4 um, 4,6 x 50 mm (solución amortiguadora A es agua, 0,1% de TFA, solución amortiguadora B acetonitrilo, 0,1% de TFA, la columna se mantuvo a 80 °C, velocidad de flujo 1,5 ml/min). Una vez que se haya determinado si el anticuerpo ha reformado sus enlaces disulfuro intercatenarios, la resina se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y la resina se volvió a suspender en un volumen igual de PBS y se agregaron 8-12 equivalentes de conector-carga útil en DMSO, con una concentración final de 10% de DMSO en la reacción y luego se incubó a temperatura ambiente durante 3

horas. A continuación, la resina se lavó con 50 volúmenes de columna de PBS. El ADC se eluyó de la resina de proteína A con solución amortiguadora de elución de anticuerpo. Luego se intercambió la solución amortiguadora del ADC por PBS un otra solución amortiguadora adecuada y se condujo una cromatografía de exclusión por tamaño preparativa para eliminar los agregados (S200 Increase; GE), si fuera necesario eliminar agregados. Se condujeron los siguientes análisis: SEC analítica para determinar el porcentaje de monómeros, espectroscopía de masa para determinar el valor de DAR, una prueba LAL para determinar la carga de endotoxina y la concentración de proteínas se determinó mediante A280 utilizando el coeficiente de extinción y peso molecular del anticuerpo.

[708] Método C3 (Preparación de intermediarios de fármaco (DSi)). Se incubaron 200 mg de anticuerpo (1,36 mM) a 10 mg/ml con 20 ml de resina RMP de Proteína A asentada (GE Lifesciences, 17513803) y se agitó durante 15 minutos. Se agregó cisteína HCl monohidratada hasta una concentración final de 20 mM y se incubó con agitación durante 30 min a temperatura ambiente para permitir el desbloqueo de las cisteínas reactivas. La resina se lavó rápidamente con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío. La resina se volvió a suspender después en un volumen igual de PBS que contiene $CuCl_2$ 250 nM. La reformación de los disulfuros intercatenarios de los anticuerpos se monitoreó en puntos de tiempo. En cada punto de tiempo, se eliminaron 25 µl de suspensión de resina, se agregó 1 µl de MC-valcit-MMAE 20 mM y el tubo se agitó varias veces. La resina se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y luego se eluyó con 50 µl de solución amortiguadora de elución de anticuerpos (Thermo). La resina se peleteó y el sobrenadante se analizó mediante cromatografía de fase inversa usando una columna Agilent PLRP-S 4000A de 4 um, 4,6 x 50 mm (solución amortiguadora A es agua, 0,1% de TFA, solución amortiguadora B acetonitrilo, 0,1% de TFA, la columna se mantuvo a 80 °C, velocidad de flujo 1,5 ml/min); gradiente: 0 minutos: 30% de B, 5 minutos: 45% de B, 6,5 min: 100% de B, 8 minutos: 100% de B, 10 minutos: 30% de B). A los 60 minutos después de la adición de $CuCl_2$, se eliminó mediante lavado con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío y luego se agregaron 20 ml de PBS para su resuspensión y se drenó por gravedad. El anticuerpo se eluyó con 100 ml de solución amortiguadora de elución de anticuerpos (Thermo Scientific, 21004) y luego se intercambió la solución amortiguadora por PBS 1X, pH 7,2. Luego se concentró el material usando una centrífuga concentradora usando un equipo Amicon Ultra-15, 50KDa, se agregó celulosa regenerada (Millipore, UFC0905024), a 6,6 mg/ml, se separó en alícuotas de 5 mg y se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80 ºC hasta el momento del uso.

[709] (CD74-L5-P1): Se incubaron 120 mg de anticuerpo (0,816 µmoles) a 10 mg/ml con 12 ml de resina RMP de Proteína A asentada (GE Lifesciences, 17513803) y se agitó durante 15 minutos. Se agregó cisteína HCl monohidratada hasta una concentración final de 20 mM

y se incubó con agitación durante 30 min a temperatura ambiente para permitir el desbloqueo de las cisteínas reactivas. La resina se lavó rápidamente con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío. La resina se volvió a suspender luego en un volumen igual de PBS que contiene $CuCl_2$ 250 nM. La reformación de los disulfuros intercatenarios de los anticuerpos se monitoreó en puntos de tiempo. En cada punto de tiempo, se eliminaron 25 µl de suspensión de resina, se agregó 1 µl de MC-valcit-MMAE 20 mM y el tubo se agitó varias veces. La resina se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y luego se eluyó con 50 µl de solución amortiguadora de elución de anticuerpos (Thermo, 24001). La resina se peleteó y el sobrenadante se analizó mediante cromatografía de fase inversa usando una columna Agilent PLRP-S 4000A de 4 um, 4,6 x 50 mm (solución amortiguadora A es agua, 0,1% de TFA, solución amortiguadora B acetonitrilo, 0,1% de TFA, la columna se mantuvo a 80 °C, velocidad de flujo 1,5 ml/min); gradiente: 0 minutos: 30% de B, 5 minutos: 45% de B, 6,5 min: 100% de B, 8 minutos: 100% de B, 10 minutos: 30% de B). A los 60 minutos después de la adición de $CuCl_2$, se eliminó mediante lavado con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío y luego se agregaron 12 ml de PBS para su resuspensión. A esta lechada de resina, se agregó el anticuerpo L5-P1 (365 µl de una solución 20 mM en DMSO, 6,528 µmoles, 8 equiv.). La mezcla resultante se incubó luego a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, la resina se lavó con 50 volúmenes de columna de PBS. El ADC se eluyó de la resina con solución amortiguadora de elución de anticuerpos (Thermo Scientific, 21004). Luego se intercambió la solución amortiguadora del ADC por PBS 1X (PBS 20X, TeknovaP0191) mediante diálisis y se condujo una cromatografía de exclusión por tamaño preparativa eluída con PBS de Dulbecco, pH 7,2 (Hyclone SH30028.03) para eliminar los agregados con un equipo HiLoad 26/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare, 28989336). Después se concentró el material usando una centrífuga concentradora usando un equipo Amicon Ultra-15, 50KDa, se agregó celulosa regenerada (Millipore, UFC0905024), a 8 mg/ml y se filtró con esterilidad a través de un filtro PVDF estéril de 0,22 µm, 25 mm (Millapore, SLGV013SL) y se guardó a 4 °C. El rendimiento final era de 74,1 mg (0,504 mmol). Se condujeron los siguientes análisis: cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica para determinar el porcentaje de monómeros, espectroscopía de masa (MS) para determinar el valor de DAR, una prueba LAL para determinar la carga de endotoxina y la concentración de proteínas se determinó mediante A280 utilizando el coeficiente de extinción y peso molecular del anticuerpo. Los datos de HRMS (método con proteínas) indicaron una masa dominante de la cadena pesada de 54294 da, con un valor de DAR de 4,4 calculado por comparación de las intensidades MS de los picos para las especies DAR1, DAR2 y DAR3. La SEC indicó </= 1% de agregación, determinada por comparación del área de la absorbancia del pico de alto peso molecular a 210 y 280 nm con el área de la absorbancia del pico del ADC monomérico.

[710] (CD74-L7-P1): Se incubaron 20 mg de anticuerpo (0,136 µmoles) a 10 mg/ml con 2 ml de resina RMP de Proteína A asentada (GE Lifesciences, 17513803) y se agitó durante 15 minutos. Se agregó cisteína HCl monohidratada hasta una concentración final de 20 mM y se incubó con agitación durante 30 min a temperatura ambiente para permitir el desbloqueo de las cisteínas reactivas. La resina se lavó rápidamente con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío. La resina se volvió a suspender luego en un volumen igual de PBS que contiene $CuCl_2$ 250 nM. La reformación de los disulfuros intercatenarios de los anticuerpos se monitoreó en puntos de tiempo. En cada punto de tiempo, se eliminaron 25 µl de suspensión de resina, se agregó 1 µl de MC-valcit-MMAE 20 mM y el tubo se agitó varias veces. La resina se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y luego se eluyó con 50 µl de solución amortiguadora de elución de anticuerpos (Thermo). La resina se peleteó y el sobrenadante se analizó mediante cromatografía de fase inversa usando una columna Agilent PLRP-S 4000A de 4 um, 4,6 x 50 mm (solución amortiguadora A es agua, 0,1% de TFA, solución amortiguadora B acetonitrilo, 0,1% de TFA, la columna se mantuvo a 80 °C, velocidad de flujo 1,5 ml/min); gradiente: 0 minutos: 30% de B, 5 minutos: 45% de B, 6,5 min: 100% de B, 8 minutos: 100% de B, 10 minutos: 30% de B). A los 60 minutos después de la adición de $CuCl_2$, se eliminó mediante lavado con 50 volúmenes de columna de PBS en un colector de vacío y luego se agregaron 2 ml de PBS para su resuspensión. A esta lechada de resina, se agregó el anticuerpo L7-P1 (55 µl de una solución 20 mM en DMSO, 1,088 µmoles, 8 equiv.). La mezcla resultante se incubó luego a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, la resina se lavó con 50 volúmenes de columna de PBS. El ADC se eluyó de la resina con solución amortiguadora de elución de anticuerpos (Thermo Scientific, 21004). Luego se intercambió la solución amortiguadora del ADC por PBS 1X (PBS 20X, TeknovaP0191) mediante diálisis y se condujo una cromatografía de exclusión por tamaño preparativa eluída con PBS de Dulbecco, pH 7,2 (Hyclone SH30028.03) para eliminar los agregados con un equipo HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare, 28989335). Después se concentró el material usando una centrífuga concentradora usando un equipo Amicon Ultra-15, 50KDa, se agregó celulosa regenerada (Millipore, UFC0905024), a 4,5 mg/ml y se filtró con esterilidad a través de un filtro PVDF estéril de 0,22 µm, 25 mm (Millapore, SLGV013SL) y se guardó a 4 °C. El rendimiento final era de 1,6 mg (0,00681 mmol). Se condujeron los siguientes análisis: cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica para determinar el porcentaje de monómeros, espectroscopía de masa (MS) para determinar el valor de DAR, una prueba LAL para determinar la carga de endotoxina y la concentración de proteínas se determinó mediante A280 utilizando el coeficiente de extinción y peso molecular del anticuerpo. Los datos de HRMS (método con proteínas) indicaron una masa dominante de la cadena pesada de 54562 da, con un valor de DAR de 3,8, que se calculó por comparación de las intensidades MS de los picos para las especies DAR1, DAR2 y DAR3.

La SEC indicó un 1,8% de agregación, determinada por comparación del área de la absorbancia del pico de alto peso molecular a 210 y 280 nm con el área de la absorbancia del pico del ADC monomérico.

Métodos analíticos

Cromatografía líquida-Espectrometría de masa (LC/MS) I

[711] Metodología general: La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) de los ejemplos de ADC se determinó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC/MS) de acuerdo con uno de los siguientes métodos (es decir, LC-I, LCII y LC-III). En todos los métodos LC, la fase móvil A era agua de grado MS purificada (Biosolve, Dieuze, Francia, 00232141B1BS), la fase móvil B era acetonitrilo de grado MS purificado (Biosolve, Dieuze, Francia, 0001204101BS) y la fase móvil D era agua de grado MS purificada suplementada con 1% de ácido fórmico (FA) (Honeywell/Fluka, Bucarest, Rumania, 56302). La fase móvil D se fijó al 10% con el fin de mantener una composición de fase móvil de 0,1% de FA y la temperatura de la columna se ajustó en 80 °C. Se optimizó un método de MS general para todos los ADC sintetizados, excepto para un ADC donde se usó una MS nativa con el fin de determinar la DAR promedio (véase MS-I y la Tabla 16 más adelante).

[712] Metodología general (1): Se determinó la relación de fármaco a anticuerpo (DAR) de ejemplos de ADC mediante cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC/MS) de acuerdo con el siguiente método. En todos los métodos de LC, la fase móvil A era agua de grado MS purificada (Honeywell, LC015-1), la fase móvil B era 80% de isopropanol de grado MS (Honeywell LC323-1): 20% de acetonitrilo (Honeywell, LC015-1), LC323-1), suplementado con 1% de ácido fórmico (FA) (Thermo Scientific, 85178). La temperatura de la columna se definió en 80 °C. Se optimizó un método MS general para todos los ADC sintetizados. La columna usada para el análisis era una Agilent PLRP-S 4000 A; 2,1 x 150 mm, 8 um (Agilent, PL1912-3803). La velocidad de flujo utilizada era de 0,3 ml/min. El gradiente usado era: 0-0,75 minutos con 95% de A, 0,76 -1,9 minutos con 75% de A, 1,91-11,0 minuto con 50% de A, 11,01-11,50 con 10% de A, 11,51-13,50 minutos con 95% de A,13,51-18 minutos con 95% de A con un equipo Acquity Bio H-Class Quarternary UPLC (Waters). El sistema MS era un espectrómetro de masa Xevo G2-XS QToF ESI (Waters) y los datos se adquirieron de 1,5-11 minutos y las masas se analizaron entre 15000-80000 daltons. La DAR se determinó a partir de los espectros desarrollados o del cromatograma UV sumando el área de pico de MS (corriente iónica total) o UV (280 nm) integrada de las especies dadas conjugadas y no conjugadas (mAb o fragmento asociado), ponderada mediante multiplicación de cada área por la cantidad de fármaco adjunta. Las áreas ponderadas sumadas se dividieron por la suma del área total y los resultados produjeron un valor DAR promedio final para el ADC completo.

[713] **LC-I:** El ADC se cargó en una columna de desalado MassPREP Micro (2,1 x 5,0 mm, Waters, Saint- Quentin-en-Yvelines, Francia, 186004032). Para el análisis de masa intacta, se condujo un paso de desalado durante 0,5 min a un 5% de fase móvil B con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. El paso de elución se realizó con un gradiente entre 0,51 min de 5% de B y 2,0 min de 90 % de B con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se establecieron dos pasos de lavado de 2,1 min a 2,7 min y de 2,8 min a 3,4 min con 5% de B a 90% de B con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Finalmente, se usó una etapa de acondicionamiento de 3,5 min durante 0,5 min con 5% de B (0,5 ml/min).

[714] Para el análisis de ADC en condiciones reductoras, se empleó una etapa de desalación durante 0,5 min a 5% de B con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Luego, comenzó la etapa de elución con un gradiente de 0,51 min de 10% de B a 7,61 min de 80% de B con una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se establecieron dos etapas de lavado de 8,1 min a 8,6 min y de 8,7 min a 9,2 min de 5% de B a 90% de B (0,5 ml/min). Finalmente, se realizó una etapa de acondicionamiento de 9,3 min por 0,5 min de 5% de B con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

[715] **LC-II:** El ADC se cargó en una columna MabPac RP (2,1 x 100 mm, 4 µm, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, 088647). Para análisis en condiciones tanto intactas como reductoras, se empleó una etapa de desalación durante 1,4 minutos de 20% de B con una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. Luego, se llevó a cabo la etapa de elución con un gradiente de 1,5 min de 20% de B a 11,5 min de 70% de B con una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Se estableció un paso de lavado de entre 11,75 min y 13,75 min de 90% de B con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Finalmente, se usó un paso de acondicionamiento de 14,0 min durante 1,0 min de 20 % de B con una velocidad de flujo de 0,4 ml/min.

[716] **LC-III:** El ADC se cargó en una columna de mAb Polifenilo Bioresolve RP, 450A, 2,7 µm, 2,1 x 150 mm (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, Francia, 186008946). Para el análisis en condiciones tanto intactas como reductoras, se empleó un paso de desalado durante 1,4 min de 20% de B con una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. El paso de elución se realizó con un gradiente entre 1,5 min de 20% de B y 11,5 min de 70% de B con una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Se estableció un paso de lavado de entre 11,75 min y 13,75 min de 90% de B con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Finalmente, se usó un paso de acondicionamiento de 14,0 min durante 1,0 min de 20 % de B con una velocidad de flujo de 0,4 ml/min.

[717] **LC-IV:** El ADC se cargó en una columna de mAb Polifenilo Bioresolve RP, 450A, 2,7 µm, 2,1 x 150 mm (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, Francia, 186008946). Para análisis en condiciones tanto intactas como reductoras, se empleó una etapa de desalación durante 1,5 minutos de 20% de B con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. El paso de elución se realizó con un gradiente entre 1,5 min de 20% de B y 16,5 min de 50 % de B con una velocidad de

flujo de 0,6 ml/min. Se estableció un paso de lavado de entre 16,8 min y 18,8 min de 90% de B con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. Finalmente, se usó un paso de acondicionamiento de 19,1 min durante 1,9 min de 20% de B con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min (tiempo de corrida total = 21 minutos).

[718] **MS-I:** Se intercambió la solución amortiguadora del ADC por una solución amortiguadora compatible con MS y inyectó directamente en un instrumento Q-TOF MS híbrido (Synapt G2-S HDMS, Waters, Manchester, RU) equipado con una fuente automática nanoESI basada en chips (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY, EEUU) que funciona en modo de ion positivo. Los parámetros del instrumento de MS se ajustaron a fin de conservar la estructura 3D nativa en la fase gaseosa y de asegurar una desolvatación y transmisión eficiente de iones.

[719] El análisis de LC-MS se realizó usando un sistema de cromatografía Waters UPLC H-Class Bio compuesto por un espectrómetro de masa Xevo G2 XS Q-TOF ESI (Waters, Manchester, RU). El ADC se analizó ya sea en condiciones intactas (sin tratamiento preliminar) o después de una reducción con DTT 5 mM (concentración final) (Thermo Scientific, Rockford, IL, 20291). Subsiguientemente, se analizó el ADC tratado usando la LC-IV mencionada precedentemente (Tabla 16). Los espectros de masa por electroatomización-ionización con tiempo de vuelo de los analitos se adquirieron usando el software de adquisición MassLynx™ (Waters, Manchester, RU). Luego, se desarrolló la intensidad extraída versus el espectro m/z utilizando el método de Entropía Máxima (MaxEnt) del software MassLynx™ para determinar la masa de cada especie de anticuerpo intacto o de cada fragmento de anticuerpo reducido dependiendo del tratamiento utilizado. Finalmente, se determinó la DAR a partir de los espectros desarrollados o del cromatograma UV sumando el área de pico de MS (corriente iónica total) o UV (280 nm) integrada de las especies dadas conjugadas y no conjugadas (mAb o fragmento asociado). La determinación de la DAR con un cromatograma UV, se multiplicó el porcentaje de área relativa de cada especie por el número de fármacos unido. Las áreas ponderadas sumadas de cada especie se dividieron por la suma del porcentaje de área relativa total y los resultados produjeron una estimación del valor DAR promedio final para el ADC completo. Para la determinación de DAR mediante espectros desarrollados, se calculó el porcentaje de cada especie identificada según el valor de intensidad del pico a partir de los espectros desarrollados. El porcentaje obtenido, se multiplicó por el número de fármacos unido. Los resultados sumados produjeron una estimación del valor promedio final de DAR para el ADC completo.

Cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC/MS) II

[720] Los datos de LC/MS se adquirieron usando un instrumento con los siguientes parámetros (Tabla 7):

Tabla 7: Parámetros

Bomba	Inyector de solvente binario Waters AcQuity UPLC
Controlador de muestras	Inyector de muestras Waters AcQuity UPLC
Compartimento de columna	Controlador de columna Waters AcQuity UPLC
Detector	Waters AcQuity UPLC PDA
ELSD	Shimadzu ELSD-LTII
Espec de masa	Waters SQD
Columnas	AcQuity UPLC BEH C18 1,7 µm 2,1 x 50 mm
Eluyente A1	0,1% de ácido fórmico en agua
Eluyente B1	0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo
Eluyente A2	Hidróxido de amonio 5 mM en agua
Eluyente B2	Hidróxido de amonio 5 mM en acetonitrilo

[721] Los métodos usados para generar los datos de LC/MS se detallan a continuación (Tablas 8-10):

Tabla 8: Método ácido de 2 minutos

Método ácido de 2 min			
Eluyente A1	0,1% de ácido fórmico en agua		
Eluyente B1	0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo		
Flujo	1,0 ml/min		
Tiempo de parada	3,00 min		
pH	2,6		
Gradiente	Tiempo	% de A (Eluyente A1)	% de B (Eluyente B1)
	0,00	95	5
	0,20	95	5
	2,00	5	95
	2,50	5	95
	2,60	95	5
	3,00	95	5
Columna	AcQuity UPLC BEH C18 1,7 µm 2,1 x 50 mm		
Temp. de la columna	50 ºC		
TAC	210-400 nm		
Rango de masa	120-1500 Da		
Tiempo de barrido	0,3 seg		

Tabla 9: Método básico de 2 minutos

Método básico de 2 min	
Eluyente A2	Hidróxido de amonio 5 mM en agua
Eluyente B2	Hidróxido de amonio 5 mM en acetonitrilo
Flujo	1,0 ml/min

Tiempo de parada	3,00 min		
pH	10,2		
Gradiente	Tiempo	% de A (Eluyente A2)	% de B (Eluyente B2)
	0,00	95	5
	0,20	95	5
	2,00	5	95
	2,50	5	95
	2,60	95	5
	3,00	95	5
Columna	AcQuity UPLC BEH C18 1,7 µm 2,1 x 50 mm		
Temp. de la columna	50 ºC		
TAC	210-400 nm		
Rango de masa	120-1500 Da		
Tiempo de barrido	0,3 seg		

Tabla 10: Método ácido de 5 minutos

Método ácido de 5 min			
Flujo	1,0 ml/min		
Tiempo de parada	5,20 min		
pH	2,6		
Gradiente	Tiempo	% de A (Eluyente A1)	% de B (Eluyente B1)
	0,00	98	2
	4,40	2	98
	5,15	2	98
	5,19	98	2
Columna	AcQuity UPLC BEH C18 1,7 µm 2,1 x 50 mm		
Temp. de la columna	50 ºC		
TAC	210-400 nm		
Rango de masa	120-1500 Da		
Tiempo de barrido	0,3 seg		

Espectrometría de masa de gran resolución (HRMS)

[722] Los datos de HRMS se adquirieron usando un instrumento con los siguientes parámetros (Tabla 11):

Tabla 11: Parámetros

Bomba	Inyector de solvente binario Waters AcQuity UPLC
Controlador de muestras	Inyector de muestras Waters AcQuity UPLC
Compartimento de columna	Controlador de columna Waters AcQuity UPLC
Detector	Waters AcQuity UPLC PDA

ELSD	n/d
Espec de masa	Waters Xevo G2 Qtof
Columnas	AcQuity UPLC PrST C4 300 Å 1,7 µm 2,1 x 100 mm
	AcQuity UPLC CSH C18 1,7 um 2,1 x 50 mm
	ProSwift RP-3U 4,6 x 50 mm SS
Eluyente A1	0,1% de ácido fórmico en agua
Eluyente B1	0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo
Eluyente A2	0,05% de ácido trifluoroacético en agua
Eluyente B2	0,05% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo

[723] Los métodos usados para generar los datos de HRMS para conectores/cargas útiles y los intermediarios de síntesis se detallan a continuación (Tablas 7 y 8):

Tabla 12: Método ácido de 5 minutos

Método ácido de 5 min:			
Flujo	1,0 ml/min		
Tiempo de parada	5,2 min		
pH	2,6		
Gradiente	Tiempo	% de A (Eluyente A2)	% de B (Eluyente B2)
	0,00	98	2
	4,40	2	98
	5,15	2	98
	5,19	98	2
Columna	AcQuity UPLC BEH C18 1,7 µm 2,1 x 50 mm		
Temp. de la columna	50 ºC		
TAC	210-400 nm		
Rango de masa	300-4000 Da		
Rango de procesamiento	n/d		
Tiempo de barrido	0,5 seg		

Tabla 13: Método ácido de 2 minutos

Método ácido de 2 min:			
Flujo	1,0 ml/min		
Tiempo de parada	2,20 min		
pH	2,6		
Gradiente	Tiempo	% de A (Eluyente A2)	% de B (Eluyente B2)
	0,00	98	2
	0,06	98	2
	1,76	2	98
	2,00	2	98
	2,16	98	2
Columna	AcQuity UPLC CSH C18 1,7 µm 2,1 x 50 mm		

Temperatura de la columna	50 ºC
UV	210-400 nm
Rango de masa	100-2050 Da
Tiempo de barrido	0,2 seg

[724] El método usado para generar los datos de HRMS para los ADC se detalla a continuación (Tabla 14):

Tabla 14: Método con proteínas

Método con proteínas:			
Flujo	1,0 ml/min		
Tiempo de parada	3,30 min		
pH	2,6		
Gradiente	Tiempo	% de A (Eluyente) A1)	% de B (Eluyente) B1)
	0,00	98	2
	0,70	98	2
	2,00	2	98
	2,10	2	98
	2,30	98	2
	3,30	98	2
Columna	ProSwift RP-3U 4,6 x 50 mm SS		
Temp. de la columna	50 ºC		
TAC	210-400 nm		
Rango de masa	600-3900 Da		
Rango de procesamiento	14000-170000 Da		
Tiempo de barrido	1,5 seg		

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) I

[725] Se condujo una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para determinar la calidad y el porcentaje de agregación (%) de los ADC después de la purificación. El análisis se realizó con una columna analítica Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare, 28990945) en condiciones isocráticas de 100% de PBS pH 7,4 (Sigma, P3813, 10PAK), flujo de 0,45 ml/min durante 12 minutos. El % de fracción agregada de la muestra de ADC se cuantificó en base a la absorbancia del área pico a 280 nm. El cálculo se basó en la relación entre el eluyente de alto peso molecular a 280 nm dividido por la suma de absorbancias de las áreas pico a la misma longitud de onda que los eluyentes de alto peso molecular y monoméricos multiplicado por el 100%.

Se condujo una **Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (1)** para determinar la calidad y el porcentaje de agregación (%) de los ADC después de la purificación. El análisis se realizó con una columna analítica Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare, 28990945) en condiciones isocráticas de PBS a pH 7,2 (Hyclone SH30028.03), suplementado

con NaCl 150 mM y EDTA 1 mM, flujo de 0,45 ml/min durante 8 minutos. El % de fracción agregada de la muestra de ADC se cuantificó en base a la absorbancia del área pico a 280 nm. El cálculo se basó en la relación entre el eluyente de alto peso molecular a 280 nm dividido por la suma de absorbancias de las áreas pico a la misma longitud de onda que los eluyentes de alto peso molecular y monoméricos multiplicado por el 100%. Los datos se adquirieron con un equipo Agilent Bio-Inert 1260 HPLC equipado con detectores de dispersión de luz Wyatt miniDAWN y del índice de refracción Treos (Wyatt Technologies, Santa Bárbara, CA).

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) II

[726] Los datos de SEC se adquirieron usando un instrumento con los siguientes parámetros (Tabla 15) y una extensión de corrida de 12 minutos:

Tabla 15: Parámetros

Bomba	Inyector de solvente cuaternario Waters bioAcQuity UPLC
Controlador de muestras	Inyector de muestras FTN Waters bioAcQuity UPLC
Compartimento de columna	Calentador de columna Waters AcQuity UPLC 30 cm
Detector	Waters AcQuity UPLC PDA
ELSD	n/d
Espec de masa	n/d
Columnas	Superdex 200 Increase 5/150 GL
Eluyente A1	PBS 1X (salina amortiguada con fosfato) + NaCl 0,1 M + 5% de isopropanol
Eluyente B1	n/d

Resultados

[727] La caracterización de los ejemplos de ADC se resume en la Tabla 16, 16ª y 16b (método de acoplamiento y LC/MS, estado de agregación y DAR). Los valores DAR promedio se determinaron usando los métodos de LC/MS precedentes (LC/MS I) y el porcentaje de agregación se determinó usando el método SEC precedente (SEC I).

Tabla 16: Caracterización analítica y metodología de conjugación de ADC

ADS	Método de conjugación	Método LC-MS	DAR	% de agr. (por SEC I)
Ab M – L9-P16	C1	LC-IV	2,8	0,2
Ab M – L9-P17	C1	LC-IV	3,2	0,2
Ab M – L9-P15	C1	LC-IV	2,7	0,2
Ab M – L9-C1	C1	LC-IV	2,7	3,8

Tabla 16a. Caracterización analítica y metodología de conjugación de ADC

ADC	Método de conjugación	Método LC-MS	DAR (por LC-MS I)	% de ag. (por SEC I)
CD74_Fc Silente-L5-P1	C2	1	4,4	0,9

ADC	Método de conjugación	Método LC-MS	DAR (por LC-MS I)	% de ag. (por SEC I)
CD74_Fc Silente-L7-P1	C2	1	3,8	1,8

Tabla 16b. Caracterización analítica y metodología de conjugación de ADC

ADC	Método de conjugación	Método HRMS	DAR (por HRMS)	% de ag. por SEC II)
CD74-L5-P1	C3	Proteína	3.9	6.0
CD74-L30-P1	C3	Proteína	3.8	5.7
CD74-L31-P1	C3	Proteína	3,7	5,3
CD74-L32-P1	C3	Proteína	3,6	10,3
CD74-L33-P1	C3	Proteína	3,5	10,7
CD74-L34-P1	C3	Proteína	3,9	10,1
CD74-L35-P1	C3	Proteína	3,8	10,0
CD74-L36-P1	C3	Proteína	3,8	8,0
CD74-L37-P1	C3	Proteína	3,8	11,0
CD74-L60-P1	C3	Proteína	3,7	8,0
CD74-L61-P1	C3	Proteína	3,8	3,4
CD74-L62-P1	C3	Proteína	3,8	5,5
CD74-L63-P1	C3	Proteína	3,7	12,0
CD74-L67-P1	C3	Proteína	3,7	9,1
CD74-L68-P1	C3	Proteína	3,8	17
CD74-L69-P1	C3	Proteína	3,8	5,7
CD74-L71-P1	C3	Proteína	3,8	12,3
CD74-L72-P1	C3	Proteína	3,5	6,0
CD74-L77-P1	C3	Proteína	3,5	11,0
CD74-L78-P1	C3	Proteína	3,6	18,0
CD74-L79-P1	C3	Proteína	3,7	21,0
CD74-L86-P1	C3	Proteína	3,7	9,0

Ejemplo 5: Evaluación in vitro I

Inhibición de Mcl-1 mediante polarización fluorescente (FP)

[728] La potencia de unión relativa de cada compuesto se determinó mediante polarización fluorescente (FP). El método utilizó un ligando marcado con fluoresceína (fluorescein-βAla-Ahx-A-REIGAQLRRMADDLNAQY-OH (SEQ ID NO: 72); PM 2.765) que se une a la proteína Mcl-1 (UniProt, secuencia de referencia: Q07820; SEQ ID Nº: 48), lo cual conduce a un aumento de la anisotropía medida en unidades de milipolarización (mP) utilizando un lector. La adición de un compuesto que se une competitivamente al mismo sitio que el ligando da como resultado una mayor proporción de ligando no unido en el sistema, como lo indica la disminución de las unidades mP.

[729] Se preparó una dilución en serie de 11 puntos para cada compuesto en DMSO y se transfirieron 2 µl a una placa de fondo plano de baja unión de 384 pocillos, (5% de concentración final de DMSO). Luego se agregaron 38 µl de solución amortiguadora (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico [HEPES] 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 7,4), que contiene el ligando marcado con fluoresceína (concentración final 1 nM) y proteína Mcl-1 (concentración final 5 nM).

[730] Las placas de ensayo se incubaron por ~ 2 horas a temperatura ambiente antes de medir la FP en un lector Biomek Synergy2 (Ex. 528 nm, Em. 640 nm, Corte 510 nm) y se calcularon las unidades mP. La unión de dosis crecientes de compuesto de prueba se expresó como una reducción porcentual de mP en comparación con una ventana establecida entre controles de "5% de DMSO solamente" y "100% de inhibición". Se trazaron curvas de dosis-respuesta de 11 puntos con el software XL-Fit usando un modelo logístico de 4 parámetros (modelo de dosis-respuesta sigmoideo) y se determinaron las concentraciones inhibidoras que dieron una reducción del 50% de mP (IC_{50}). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 17. Los resultados sugieren que los compuestos evaluados inhiben la interacción entre la proteína Mcl-1 y el péptido marcado con fluoresceína.

Citotoxicidad in vitro

[731] Se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad en la línea celular de mieloma múltiple NCI-H929. Las células se distribuyeron en microplacas y se expusieron a los compuestos de prueba durante 48 horas. La viabilidad celular se cuantificó luego mediante un ensayo colorimétrico, el ensayo de microcultivo de tetrazolio (Carmichael et al., (1987) Cancer Res. 47:936-42).

[732] Los resultados se expresan como la IC_{50} (la concentración de compuesto que inhibe la viabilidad celular en un 50%) y se muestran en la siguiente Tabla 17. Los resultados muestran que los compuestos evaluados son citotóxicos para las células NCI-H929.

Tabla 17: IC_{50} de inhibición de Mcl-1 y citotoxicidad en células NCI-H929

Carga útil	IC_{50} (M) de Mcl-1 FP	IC_{50} (M) de MTT H929	Carga útil	IC_{50} (M) de Mcl-1 FP	IC_{50} (M) de MTT H929
C1	2,8E-09	3,0E-09	C8	3,0E-09	5,74E-07
C2	2,6E-09	8,51E-06	C9	2,5E-09	2,27E-06
C3	9,48E-10	4,2E-08	C10	3,4E-09	1,35E-08
C4	2,6E-09	3,21E-06	C11	5,3E-09	7,0E-09
C5	4,05E-09	4,08E-09	C12	5,9E-09	4,2E-08
C6	1,18E-09	3,0E-09	C13	2,2E-09	3,76E-09
C7	2,6E-09	1,88E-09	C14	8,4E-10	2,61E-09

Ejemplo 6: Evaluación in Vitro II: Actividad in vitro de CD74-L7-P1 y la carga útil de P1 en líneas celulares DLBCL (CTG 72 h).

[733] Se cultivaron líneas celulares DLBCL (Karpas422, SUDHL4, NUDHL1, SUDHL6, SUDHL10, DOHHL2 y SUDHL5) en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mM). Las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda que contiene 5% de CO_2. Las células se sembraron en placas de 96 micropocillos y luego fueron expuestas a los ADC o la carga útil correspondiente durante 72 h (diluidas en serie; 9 concentraciones cada una, por triplicado). Los efectos de los ADC o de las cargas útiles sobre la viabilidad celular se evaluaron después de 3 días de incubación a 37 °C/5% de CO_2 mediante cuantificación de los niveles de ATP celular usando el reactivo CellTiterGlo a razón de 75 µl de reactivo/pocillo. Todas las condiciones se evaluaron por triplicado. La luminiscencia se cuantificó con un lector de placas multipropósito. Los valores de IC_{50} se calcularon usando un ajuste de curva estándar de cuatro parámetros. La IC_{50} se definió como la concentración medida del compuesto a la cual se reduce un 50% la señal de CTG con respecto al control. Cada experimento se realizó por lo menos dos veces, siendo reproducibles los resultados. Según se muestra en la Tabla 18 y en las Figuras 1A y 1B, la carga útil P1 y el ADC CD74-L7-P1 indujeron una disminución dependiente de la dosis de la viabilidad de las células DLBCL en el ensayo CTG.

Tabla 18: IC_{50} para la citotoxicidad de los ADC y la carga útil en varias líneas celulares

IC_{50} M (CTG 72 h)	Karpas422	SUDHL4	NUDHL1	SUDHL6	SUDHL10	DOHHL2	SUDHL5
IgG-L7-P1	No analizado	No analizado	No analizado	No analizado	>3,0e-007	>3,0e-007	>3,0e-007
CD74-L7-P1	1,054e-009	4,793e-010	1,033e-008	1,453e-009	9,417e-011	1,195e-009	3,139e-011
P1	1,921e-009	9,373e-010	1,849e-008	3,087e-009	2,164e-010	1,824e-009	2,164e-010

Ejemplo 7: Evaluación in vitro III: Actividad in vitro de ADC CD74-Mcl-1 y cargas útiles en la línea celular Monomac1 AML (CTG 72 h)

[734] Se cultivaron células Monomac1 en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mM). Las líneas celulares se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda que contiene 5% de CO_2. Las células se sembraron en placas de 96 micropocillos y luego fueron expuestas a las cargas útiles o los ADC durante 72 h (diluidas en serie; 9 concentraciones cada una, por triplicado). Los efectos de las cargas útiles o los ADC sobre la viabilidad celular se evaluaron después de 3 días de incubación a 37 °C/5% de CO_2 mediante cuantificación de los niveles de ATP celular usando el reactivo CellTiterGlo a razón de 75 µl de reactivo/pocillo. Todas las condiciones se evaluaron por triplicado. La luminiscencia se cuantificó con un lector de placas multipropósito. Los valores de IC_{50} se calcularon usando un ajuste de curva estándar de cuatro parámetros. La IC_{50} se definió como la concentración medida del compuesto a la cual se reduce un 50% la señal de CTG con respecto al control. Cada experimento se realizó por

lo menos dos veces, siendo reproducibles los resultados. Según se muestra en la Tabla 19 y en la Figura 2, las cargas útiles y los ADC anti-CD74-Mcl-1 indujeron una disminución dependiente de la dosis de la viabilidad de células Monomac1 en el ensayo CTG.

Tabla 19: IC_{50} para la citotoxicidad de los ADC y la carga útil en células Monomac-1

ADC o cargas útiles	IC_{50} M (CTG 72 h) Monomac1
CD74-L7-P1	9,217e-011
P1	1,294e-009
CD74-L9-P1	4,815e-010
P1	1,322e-009
CD74-L9-P17	2,367e-011
P17	6,201e-010
CD74-L9-P16	2,064e-011
P16	2,812e-010
CD74-L9-P15	3,996e-011
P15	3,86e-010

Ejemplo 8: Evaluación in vitro IV: Actividad in vitro de ADC CD74 en varias líneas celulares cancerosas

Líneas celulares

[735] El conjugado de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1, CD74-L7-P1, isotipo de ADC IgG-L7-P1 y carga útil libre MCL-1, P1, fueron evaluados contra seis líneas celulares cancerosas endógenas. Las líneas KMS-21BM (JCRB Nº JCRB1185 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS), KMS-20 (JCRB Nº JCRB1196 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS), MONO-MAC-1 (DSMZ Nº ACC-252 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS + aminoácidos no esenciales 1x + piruvato de sodio 1 mM), NOMO-1 (DSMZ Nº ACC-542 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS), Kasumi-6 (ATCC Nº CRL-2775 cultivada en RPMI-1640 + 20% de FBS + bicarbonato de sodio 1,5 g/l + glucosa 4,5 g/l + HEPES 10 mM, + piruvato de sodio 1 mM suplementado con factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos recombinante humano 2 ng/ml (GM-CSF) y EOL-1 (DSMZ Nº ACC-386 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS)

Inhibición de la proliferación y supervivencia celular.

[736] Se evaluó la capacidad del conjugado de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1 (CD74-L7-P1), isotipo de ADC IgG-L7-P1 y carga útil libre MCL-1, P1, para inhibir la proliferación y supervivencia celulares usando el ensayo de proliferación Promega CellTiter-Glo®. Las líneas celulares se cultivaron en un medio que fuera óptimo para su crecimiento con 5% de CO_2, a 37 °C en incubadora de cultivo tisular. Antes de la siembra para el ensayo de proliferación,

las células se dividieron por lo menos 2 días antes del ensayo para garantizar una densidad de crecimiento óptima. El día de la siembra, se cosecharon las células en suspensión. La viabilidad celular y la densidad celular se determinaron usando un contador de células (analizador de la viabilidad celular Vi-Cell XR Cell Viability *Analyzer*, Beckman Coulter). Las células con una viabilidad mayor al 85% se sembraron en placas de fondo blanco transparente de 384 pocillos tratadas con TC (Corning, Nº Cat. 3765). Las células se sembraron a una densidad de 1,000 células por pocillo en 45 µl de medio de crecimiento estándar. Las placas se incubaron con 5% de CO_2, a 37 ° C durante la noche en una incubadora de cultivo tisular. Al día siguiente, se prepararon cargas útiles de MCL-1 libre (P1), ADC MCL-1 direccionadores e isotipos de ADC no direccionadores 10X en medio de crecimiento estándar. Los tratamientos de fármacos preparados se agregaron luego a las células dando como resultado concentraciones finales de 0,0005 – 500 nM y un volumen final de 50 µl por pocillo. Cada concentración de fármaco se evaluó por cuadruplicados. Las placas se incubaron en 5% de CO_2, a 37 °C, durante 5 días en una incubadora de cultivo tisular, después de lo cual se evaluó la viabilidad celular mediante la adición de 25 µl de CellTiter Glo® (Promega, Cat. Nº G7573), un reactivo que lisa las células y mide el contenido total de adenosina trifosfato (ATP). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar las señales luminiscentes antes de su lectura usando un lector de luminiscencia (lector de placas EnVision Multilabel, PerkinElmer). Para evaluar el efecto de los tratamientos con fármacos, se usaron las cuentas de luminiscencia de los pocillos que contienen células no tratadas (100% de viabilidad) para normalizar las muestras tratadas. Se aplicó un modelo de pendiente variable para ajustar una curva de regresión no lineal a los datos en el software GraphPad PRISM versión 7.02. Los valores de IC_{50} y Amáx se extrapolaron a partir de las curvas resultantes.

Resultado

[737] Las curvas de dosis-respuesta de líneas celulares cancerosas representativas que expresan la CD74 blanco de interés se muestran en la Figura 3 (cuadrados = CD74-L7-P1, círculos IgG-L7-P1, triángulos = carga útil MCL1 libre P1). Las concentraciones de tratamiento requeridas para inhibir un 50% de del crecimiento o la supervivencia celulares (IC_{50}) se calcularon con los valores de IC_{50} representativos de las líneas celulares evaluadas que se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20: ADC CD74 MCL1

	CD74-L7-P1		IgG-L7-P1		P1	
	IC_{50} (nM)	Amáx	IC_{50} (nM)	Amáx	IC_{50} (nM)	Amáx
KMS-21BM	0,948	98,75	>200	--	0,941	85,27
KMS-20	0,814	101,3	>200	--	4,946	94,34

MONO-MAC-1	**	**	>200	--	1,151	82,41
Kasumi-6	2,947	127,8	>200	--	9,266	88,12
NOMO-1	1,433	95,88	>200	--	5,015	110,9
EOL-1	0,118	124,0	>200	--	1,095	67,97

** evaluado pero sin convergencia de la curva

Ejemplo 9: Evaluación in vitro V: Actividad in vitro de los ADC CD74 como agentes individuales y en combinación con inhibidores de Bcl-2

Líneas celulares

[738] Los conjugados de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1 se evaluaron contra tres líneas celulares cancerosas endógenas. Las líneas MONO-MAC-1 (DSMZ Nº ACC-252 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS + aminoácidos no esenciales 1x + piruvato de sodio 1 mM), NOMO-1 (DSMZ Nº ACC-542 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS) y EOL-1 (DSMZ Nº ACC-386 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS).

Inhibición de la proliferación y supervivencia celular

[739] La capacidad de los conjugados de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1 para inhibir la proliferación celular en combinación con un inhibidor BCL-2 y la supervivencia celular se evaluaron usando el ensayo de proliferación Promega CellTiter-Glo®. Las líneas celulares se cultivaron en un medio que fuera óptimo para su crecimiento con 5% de CO_2, a 37 °C en incubadora de cultivo tisular. Antes de la siembra para el ensayo de proliferación, las células se dividieron por lo menos 2 días antes del ensayo para garantizar una densidad de crecimiento óptima. El día de la siembra, se cosecharon las células en suspensión. La viabilidad celular y la densidad celular se determinaron usando un contador de células (analizador de la viabilidad celular Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter). Las células con una viabilidad mayor al 85% se sembraron en placas de fondo blanco transparente de 384 pocillos tratadas con TC (Corning, Nº Cat. 3765). Las células se sembraron a una densidad de 1,000 células por pocillo en 45 µl de medio de crecimiento estándar. Las placas se incubaron con 5% de CO_2, a 37 ° C durante la noche en una incubadora de cultivo tisular. Al día siguiente, se prepararon cargas útiles de MCL-1 libre (P1), ADC MCL-1 direccionadores e isotipos de ADC no direccionadores 10X en medio de crecimiento estándar. Los tratamientos de fármacos preparados se agregaron luego a las células dando como resultado concentraciones finales de 0,0005 – 300 nM y un volumen final de 50 µl por pocillo. Cada concentración de fármaco se evaluó por cuadruplicados. Se evaluaron tres condiciones para cada compuesto. Los compuestos se evaluaron como agentes individuales y en combinación con Venetoclax y en combinación con el Compuesto A1. Tanto Venetoclax como el Compuesto A1 se dosificaron a una concentración final de ya sea 5 nM o 50 nM. Las placas se incubaron en 5% de CO_2, a 37 °C, durante 5 días en una

incubadora de cultivo tisular, después de lo cual se evaluó la viabilidad celular mediante la adición de 25 µl de CellTiter Glo® (Promega, Cat. Nº G7573), un reactivo que lisa las células y mide el contenido total de adenosina trifosfato (ATP). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar las señales luminiscentes antes de su lectura usando un lector de luminiscencia (lector de placas EnVision Multilabel, PerkinElmer). Para evaluar el efecto de los tratamientos con fármacos, se usaron las cuentas de luminiscencia de los pocillos que contienen células no tratadas (100% de viabilidad) para normalizar las muestras tratadas. Se aplicó un modelo de pendiente variable para ajustar una curva de regresión no lineal a los datos en el software GraphPad PRISM versión 7.02. Los valores de IC_{50} y Amáx se extrapolaron a partir de las curvas resultantes.

Resultado

[740] Las curvas de dosis-respuesta de líneas celulares cancerosas representativas que expresan los blancos de CD74 de interés se muestran en la Figura 4 y la Figura 5. Las concentraciones de tratamiento requeridas para inhibir un 50% de del crecimiento o la supervivencia celulares (IC_{50}) se calcularon con los valores de IC_{50} representativos de las líneas celulares evaluadas que se resumen en la Tabla 21.

Tabla 21: ADC CD74-Mcl-1 en combinación con Venetoclax y el Compuesto A1

	NOMO-1		**MONO-MAC-1**		**EOL-1**	
	IC_{50} (nM)	**Amáx (Disp.)**	**IC_{50} (nM)**	**Amáx (Disp.)**	**IC_{50} (nM)**	**Amáx (Disp.)**
CD74-L5-P1	3,70	74,45	7,95	84,9	1,419	91,25
CD74-L5-P1 + Venetoclax 5 nM	1,03	89,68	1,31	115,5	0,164	113,4
CD74-L5-P1 + Venetoclax 50 nM	0,278	92,24	0,409	88,73	n/d	n/d
CD74-L5-P1 + Compuesto A1 5 nM	0,457	91,5	0,636	113,5	0,1364	99,58
CD74-L5-P1 + Compuesto A1 50 nM	0,138	100,6	0,156	115,4	n/d	n/d
P1	1,45	94,01	0,800	94,52	1,069	94,92
P1 + Venetoclax 5 nM	1,59	70,4	0,183	110,2	0,365	87,42
P1 + Venetoclax 50 nM	0,567	69,95	0,122	84,64	n/d	n/d
P1 + Compuesto A1 5 nM	0,640	60,65	0,100	121,5	0,2294	89,37
P1 + Compuesto A1 50 nM	0,222	97,61	0,052	102,9	n/d	n/d
IgG1-L5-P1	>50	--	107,9	73,83	>50	--
IgG1-L5-P1 + Venetoclax 5 nM	>50	--	>50	107,1	>50	--
IgG1-L5-P1 + Venetoclax 50 nM	>50	--	47,57	108,7	n/d	n/d
IgG1-L5-P1 + Compuesto A1 5 nM	137,6	123,2	57,93	122,4	92,33	122,1
IgG1-L5-P1 + Compuesto A1 50	>50	--	30,8	114,8	n/d	n/d

nM						

Ejemplo 10: Evaluación in vitro VI: Actividad in vitro de los ADC CD74 MCL-1

Líneas celulares

[741] Los conjugados de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1 se evaluaron contra tres líneas celulares cancerosas endógenas. Las líneas MONO-MAC-1 (DSMZ Nº ACC-252 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS + aminoácidos no esenciales 1x + piruvato de sodio 1 mM), NOMO-1 (DSMZ Nº ACC-542 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS) y EOL-1 (DSMZ Nº ACC-386 cultivada en RPMI-1640 + 10% de FBS).

Inhibición de la proliferación y supervivencia celular

[742] La capacidad de los conjugados de anticuerpo-fármaco CD74 MCL-1 para inhibir la proliferación celular y la supervivencia celular se evaluaron usando el ensayo de proliferación Promega CellTiter-Glo®. Las líneas celulares se cultivaron en un medio que fuera óptimo para su crecimiento con 5% de CO_2, a 37 °C en incubadora de cultivo tisular. Antes de la siembra para el ensayo de proliferación, las células se dividieron por lo menos 2 días antes del ensayo para garantizar una densidad de crecimiento óptima. El día de la siembra, se cosecharon las células en suspensión. La viabilidad celular y la densidad celular se determinaron usando un contador de células (analizador de la viabilidad celular Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter). Las células con una viabilidad mayor al 85% se sembraron en placas de fondo blanco transparente de 384 pocillos tratadas con TC (Corning, Nº Cat. 3765). Las células se sembraron a una densidad de 1,000 células por pocillo en 45 µl de medio de crecimiento estándar. Las placas se incubaron con 5% de CO_2, a 37 ° C durante la noche en una incubadora de cultivo tisular. Al día siguiente se prepararon los ADC de direccionamiento a 10X en medio de crecimiento estándar. Los tratamientos de fármacos preparados se agregaron luego a las células dando como resultado concentraciones finales de 0,01 – 200 nM y un volumen final de 50 µl por pocillo. Cada concentración de fármaco se evaluó por cuadruplicados. Las placas se incubaron en 5% de CO_2, a 37 °C, durante 5 días en una incubadora de cultivo tisular, después de lo cual se evaluó la viabilidad celular mediante la adición de 25 µl de CellTiter Glo® (Promega, Cat. Nº G7573), un reactivo que lisa las células y mide el contenido total de adenosina trifosfato (ATP). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar las señales luminiscentes antes de su lectura usando un lector de luminiscencia (lector de placas EnVision Multilabel, PerkinElmer). Para evaluar el efecto de los tratamientos con fármacos, se usaron las cuentas de luminiscencia de los pocillos que contienen células no tratadas (100% de viabilidad) para normalizar las muestras tratadas. Se aplicó un modelo de pendiente variable para ajustar una curva de regresión no lineal a los datos en el software GraphPad PRISM versión 7.02. Los valores de IC_{50} y Amáx se extrapolaron a partir de las curvas resultantes y se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Valores de IC_{50}

Conector-Carga útil en el ADC	Carga útil liberada	MONO-MAC-1, IC_{50} (nM)	MONO-MAC-1, Amáx	NOMO-1, IC_{50} (nM)	NOMO-1, Amáx	EOL-1, IC_{50} (nM)	EOL-1, Amáx
L5-P1	P1	7,95	84,9	2,221	55,58	1,018	75,06
L30-P1	P1	5,451	86,78	1,617	78,95	0,2508	197,6
L31-P1	P1	3,959	110,3	1,195	73,4	0,466	83,98
L32-P1	P1	6,721	97,57	1,504	62,58	0,1604	125
L33-P1	P1	6,716	89,18	2,584	58,95	0,6202	66,96
L34-P1	P1	6,275	104,4	2,961	66,95	0,736	70,92
L35-P1	P1	**	**	6,904	62,73	0,8938	75,56
L36-P1	P1	0,519	66,3	4,578	63,34	0,6856	100,8
L37-P1	P1	**	**	5,141	83,05	0,0425	243
L60-P1	P1	**	**	2,625	76,94	0,5348	79,04
L61-P1	P1	**	**	0,5457	45,63	0,03283	63,76
L62-P1	P1	**	**	3,411	65,18	0,7708	83,03
L63-P1	P1	**	**	0,7138	61,25	**	**
L67-P1	P1	**	**	2,493	79,39	0,2614	119,3
L68-P1	P1	**	**	6,912	91,25	0,788	127,3
L69-P1	P1	**	**	14,75	95,03	0,7043	159,6
L71-P1	P1	**	**	9,825	53,62	0,3409	93,09
L72-P1	P1	**	**	**	57,68	0,3857	109,8
L77-P1	P1	0,9865	108,2	3,185	48,53	0,3832	102,6
L78-P1	P1	**	**	3,735	53,4	0,4304	87,22
L79-P1	P1	**	**	3,136	56,07	0,4916	91,3
L86-P1	P1	**	**	7,475	74,52	0,7212	105,5

** evaluado pero sin convergencia de la curva

Ejemplo 11: Actividad in vivo de los ADC CD74 en el modelo de leucemia mieloide aguda Nomo1 después de una administración intravenosa (IV)

[743] El efecto terapéutico in vivo de un ADC dirigido a CD74 formulado en solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) se determina en el modelo de leucemia mieloide aguda Nomo1 después de una administración intravenosa (IV). Se evaluaron los siguientes compuestos: anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1, anti-CD74_CysmAb Fc silente e IgG1-Conector-Carga útil Fc silente.

Materiales y métodos

[744] Se cultivaron células Nomo1, obtenidas de DSMZ, en RPMI suplementado con 10% de FBS. Se inocularon 0,1 ml que contienen 5 x 10^6 células por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones SCID hembra, provistos por Charles River. Cuando los tumores alcanzaron el volumen apropiado, los ratones fueron asignados aleatoriamente a razón de 6

animales por grupo, usando el software Easy stat. Se inyectaron los compuestos IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg) una vez por vía IV en PBS. El compuesto Venetoclax (sintetizado en el *Servier Research Institute - IdRS*) se formuló en PEG/EtOH/Fosal (polietilenglicol/etanol/fosal, 30/10/60) y se administró per os (PO) diariamente los días de semana (50 mpk, 4SÍ/3NO/4SÍ). El peso corporal de los ratones se monitoreó tres veces por semana y el tamaño tumoral se midió usando calibres electrónicos. El volumen tumoral se estimó mediante medición de los diámetros tumorales mínimo y máximo usando la siguiente fórmula: (diámetro mínimo)2(diámetro máximo)/2. El último día con por lo menos la mitad de los animales de todos los grupos aún presentes en el estudio (d9), se calculó la inhibición del crecimiento tumoral usando la siguiente fórmula:

$$\left(1-\frac{\text{Mediana (DTV a Dx en grupo tratado)}}{\text{Mediana (DTV a Dx en grupo control)}}\right)\times 100$$

con DTV (Delta del volumen tumoral) a Dx, calculado como TV a Dx - TV en la randomización. Los ratones fueron sacrificados luego de la primera medición en la cual el volumen tumoral excediera 2000 mm^3 o con los primeros signos de deterioro de la salud del animal. Todos los experimentos se condujeron de acuerdo con las normas de Francia vigentes en el año 2018 después de su aprobación por el Comité de Ética IdRS. Los ratones SCID se mantuvieron de acuerdo con los lineamientos institucionales.

Resultados

[745] La eficacia del anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 en xenoinjertos Nomo1 se ilustra en la Figura 3. El tratamiento comenzó 10 días después de la inoculación de células tumorales (tamaño mediano: 191,6 mm3). Los compuestos IgG1-Conector-Carga útil Fc silente (ADC FS no dirigido), anti-CD74_CysmAb Fc silente (anticuerpo FS desnudo) y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (ADC FS dirigido a CD74) fueron administrados una vez por vía IV a razón de 30 mg/kg. El ADC FS no dirigido y el ADC FS dirigido a CD74 también se combinaron con venetoclax, que se administró PO 4SÍ/3NO/4SÍ a razón de 50 mg/kg. El día 9, el anticuerpo FS desnudo, el ADC FS dirigido a CD74 o el ADC FS no dirigido correspondiente a 30 mg/kg (TGI = 32,7%, -5,6% y -12,2 respectivamente) no indujo o indujo una inhibición muy ligera del crecimiento tumoral (% de TGI), como se muestra en la Figura 6 y en la Tabla 23. Sin embargo, en combinación con venetoclax, la actividad antitumoral inducida por el ADC FS dirigido a CD74 era mucho mayor que el ADC FS no dirigido correspondiente (TGI = 98,6% versus 5,5% respectivamente, p<0,001). Cabe destacar que el venetoclax solo tuvo tan solo un efecto escaso sobre el crecimiento tumoral (TGI = 26,2%). No se observó una pérdida de peso corporal clínicamente relevante ni otros signos clínicos debidos al tratamiento (Figura 7).

Tabla 23: Inhibición del crecimiento de tumores Nomo1

Tratamiento	Dosis/Programa	% de TGI (d9)
IgG1-conector-carga útil Fc silente	30MK QD, IV	-12,2
anti-CD74_CysmAb Fc silente	30MK QD, IV	32,7
anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1	30MK QD, IV	-5,6
Venetoclax	50MK 4SÍ/3NO/4SÍ, PO	26,2
IgG1-conector-carga útil Fc silente + venetoclax	30MK QD, IV+50MK 4SÍ/3NO/4SÍ, PO	5,5
anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 + venetoclax	30MK QD, IV+50MK 4SÍ/3NO/4SÍ, PO	98,6***

*** p <= 0,001 en comparación con el grupo control.

Ejemplo 12: Evaluación in vivo II: Actividad in vivo de los ADC CD74 en el modelo de linfoma difuso de células B grandes Karpas422 después de una administración intravenosa (IV)

[746] El efecto terapéutico in vivo de un ADC dirigido a CD74 formulado en solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) se determinó en el modelo de linfoma difuso de células B grandes Karpas422 después de una administración intravenosa (IV). Se evaluaron los siguientes compuestos: el ADC dirigido a CD74 es anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1, IgG1-Conector-Carga útil Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente.

Materiales y métodos

[747] Se cultivaron células Karpas422, obtenidas de ATCC, en RPMI suplementado con 20% de FBS. Las células se resuspendieron en 100% de Matrigel (BD Biosciences) y se inocularon 0,1 ml que contiene 11 x 10^6 células por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSG hembra, provistas por Charles River. Cuando los tumores alcanzaron el volumen apropiado, los ratones fueron asignados aleatoriamente a razón de 6 animales por grupo, usando el software Easy stat. Se inyectaron los compuestos IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg) una vez por vía IV en PBS. El compuesto Venetoclax (sintetizado en el *Servier Research Institute - IdRS*) se formuló en PEG/EtOH/Fosal (polietilenglicol/etanol/fosal, 30/10/60) y se administró per os (PO) diariamente los días de semana (50 mpk, 4SÍ/3NO/4SÍ). El peso corporal de los ratones se monitoreó tres veces por semana y el tamaño tumoral se midió usando calibres electrónicos. El volumen tumoral se estimó mediante medición de los diámetros tumorales mínimo y máximo usando la siguiente fórmula: (diámetro mínimo)2(diámetro máximo)/2. El último día con por lo menos la mitad de los animales control aún presente en el estudio (d23), se calculó la inhibición del crecimiento tumoral usando la siguiente fórmula:

$$\left(1-\frac{\text{Mediana (DTV a Dx en grupo tratado)}}{\text{Mediana (DTV a Dx en grupo control)}}\right)\times 100$$

con DTV (Delta del volumen tumoral) a Dx, calculado como TV a Dx - TV en la randomización.

La respuesta se evaluó como sigue: CR (Respuesta completa) si el tamaño del tumor era ≤ 25 mm^3 en por lo menos tres mediciones, PR (Respuesta parcial) si el tamaño del tumor comprendía entre 25 mm^3 y 168,3 mm^3 (la mitad del tamaño de partida) en por lo menos tres mediciones. Los ratones fueron sacrificados luego de la primera medición en la cual el volumen tumoral excediera 2000 mm^3 o con los primeros signos de deterioro de la salud del animal. Todos los experimentos se condujeron de acuerdo con las normas de Francia vigentes en el año 2018 después de su aprobación por el Comité de Ética IdRS. Los ratones SCID se mantuvieron de acuerdo con los lineamientos institucionales.

Resultados

[748] La eficacia del anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 en xenoinjertos Karpas422 se ilustra en la Figura 8. El tratamiento comenzó 17 días después de la inoculación de células tumorales (tamaño mediano: 336,6 mm3). Los compuestos IgG1-Conector-Carga útil Fc silente (ADC FS no dirigido), anti-CD74_CysmAb Fc silente (anticuerpo FS desnudo) y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (ADC FS dirigido a CD74) fueron administrados una vez por vía IV a razón de 30 mg/kg. El ADC FS no dirigido y el ADC FS dirigido a CD74 también se combinaron con venetoclax, que se administró PO 4SÍ/3NO/4SÍ a razón de 50 mg/kg.

El día 23, el anticuerpo FS desnudo, el ADC FS dirigido a CD74 o el ADC FS no dirigido correspondiente a 30 mg/kg (TGI = -1%, -61,8% y -76,2% respectivamente) no indujo inhibición del crecimiento tumoral (% de TGI), como se muestra en la Figura 6 y en la Tabla 24. Sin embargo, en combinación con venetoclax, la actividad antitumoral inducida por el ADC FS dirigido a CD74 era mucho mayor que el ADC FS no dirigido correspondiente (TGI = 98,6% versus 5,5% respectivamente, $p<0,001$), y la regresión completa (CR) se alcanzó exclusivamente en este grupo de tratamiento (Tabla 24). Cabe destacar que el venetoclax solo tuvo tan solo un efecto escaso sobre el crecimiento tumoral (TGI = 31,1%). No se observaron signos clínicos debidos al tratamiento, además de una pérdida moderada del peso corporal (aún no relevante clínicamente) en los grupos dosificados con venetoclax (Figura 9).

Tabla 24: Inhibición del crecimiento de tumores Karpas422

Tratamiento	Dosis/Programa	% de TGI (d23)	% de CR	% de PR
IgG1-conector-carga útil Fc silente	30MK QD, IV	-76,2	0	0
anti-CD74_CysmAb Fc silente	30MK QD, IV	-1	0	0
anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1	30MK QD, IV	-61,8	0	0
Venetoclax	50MK 4SÍ/3NO/4SÍ, PO	31,1	0	0
IgG1-conector-carga útil Fc silente +	30MK QD, IV+50MK 4SÍ/3NO/4SÍ, PO	-9	0	0

venetoclax				
anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1+ venetoclax	30MK QD, IV+50MK 4SÍ/3NO/4SÍ, PO	154,9***	33	67

*** p <= 0,001 en comparación con el grupo control

Ejemplo 13: Evaluación in vivo III: Actividad in vivo de los ADC CD74 en el modelo de leucemia mieloide aguda Monomac1 después de una administración intravenosa (IV)

[749] El efecto terapéutico in vivo de un ADC dirigido a CD74 formulado en solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) se determinó en el modelo de leucemia mieloide aguda Monomac1 después de una administración intravenosa (IV). Se evaluaron los siguientes compuestos: el ADC dirigido a CD74 es anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1, IgG1-Conector-Carga útil Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente.

Materiales y métodos

[750] Se cultivaron células Monomac1, obtenidas de DSMZ, en RPMI suplementado con 10% de FBS. Se inocularon 0,1 ml que contienen 5 x 10^6 células por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones SCID hembra, provistos por Charles River. Cuando los tumores alcanzaron el volumen apropiado, los ratones fueron asignados aleatoriamente a razón de 6 animales por grupo, usando el software Easy stat. Se inyectaron los compuestos IgG1-Conector-Carga útil Fc silente, anti-CD74_CysmAb Fc silente y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (30 mg/kg) una vez por vía IV en PBS. El compuesto Venetoclax (sintetizado en el *Servier Research Institute - IdRS*) se formuló en PEG/EtOH/Fosal (polietilenglicol/etanol/fosal, 30/10/60) y se administró per os (PO) diariamente los días de semana (50 mpk, 2SÍ/2NO/5SÍ/2NO/4SÍ). El peso corporal de los ratones se monitoreó tres veces por semana y el tamaño tumoral se midió usando calibres electrónicos. El volumen tumoral se estimó mediante medición de los diámetros tumorales mínimo y máximo usando la siguiente fórmula: (diámetro mínimo)2(diámetro máximo)/2. El último día con por lo menos la mitad de los animales control aún presente en el estudio (d16), se calculó la inhibición del crecimiento tumoral usando la siguiente fórmula:

$$\left(1-\frac{\text{Mediana (DTV a Dx en grupo tratado)}}{\text{Mediana (DTV a Dx en grupo control)}}\right)\times 100$$

con DTV (Delta del volumen tumoral) a Dx, calculado como TV a Dx - TV en la randomización. La respuesta se evaluó como sigue: CR (Respuesta completa) si el tamaño del tumor era ≤ 25 mm^3 en por lo menos tres mediciones, PR (Respuesta parcial) si el tamaño del tumor comprendía entre 25 mm^3 y 60,1 mm^3 (la mitad del tamaño de partida) en por lo menos tres mediciones. Los ratones fueron sacrificados luego de la primera medición en la cual el volumen tumoral excediera 2000 mm^3 o con los primeros signos de deterioro de la salud del animal. Todos los experimentos se condujeron de acuerdo con las normas de Francia

vigentes en el año 2018 después de su aprobación por el Comité de Ética IdRS. Los ratones SCID se mantuvieron de acuerdo con los lineamientos institucionales.

Resultados

[751] La eficacia del anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 en xenoinjertos Monomac1 se ilustra en la Figura 10. El tratamiento comenzó 7 días después de la inoculación de células tumorales (tamaño mediano: 120,2 mm3). Los compuestos IgG1-Conector-Carga útil Fc silente (ADC FS no dirigido), anti-CD74_CysmAb Fc silente (anticuerpo FS desnudo) y anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1 (ADC FS dirigido a CD74) fueron administrados una vez por vía IV a razón de 30 mg/kg. El ADC FS no dirigido y el ADC FS dirigido a CD74 también se combinaron con venetoclax, que se administró PO 2SÍ/2NO/5SÍ/2NO/4SÍ a razón de 50 mg/kg. El día 16, la inhibición del crecimiento tumoral (% de TGI) inducida por el ADC FS direccionado a CD74 a razón de 30 mg/kg fue mayor que para el anticuerpo FS desnudo (TGI = 33,8% versus -23%, respectivamente, $p<0,05$) y el correspondiente ADC FS no direccionado (TGI = -14,6%, $p<0,0001$), como se muestra en la Figura 10 y la Tabla 25. Cuando se combinaba con venetoclax, el ADC FS no dirigido presentó algo de actividad antitumoral (TGI = 34,4%, $p<0,05$), pero solo se observó una regresión tumoral completa y duradera con la combinación con el ADC FS dirigido a CD74 (TGI = 108,5%, $p<0,001$). No se observó una pérdida de peso corporal clínicamente relevante ni otros signos clínicos debidos al tratamiento (Figura 11).

Tabla 25: Inhibición del crecimiento de tumores Monomac1

Tratamiento	**Dosis/Programa**	**% de TGI (d16)**	**% de CR**	**% de PR**
IgG1-conector-carga útil Fc silente	30MK QD, IV	-14,6	0	0
anti-CD74_CysmAb Fc silente	30MK QD, IV	-23	0	0
anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1	30MK QD, IV	33,8*	0	0
Venetoclax	50MK 2SÍ/2NO/5SÍ/2NO/4SÍ, PO	4,5	0	0
IgG1-conector-carga útil Fc silente	30MK QD, IV+50MK 2SÍ/2NO/5SÍ/2NO/4SÍ, PO	34,4*	0	0
anti-CD74_CysmAb Fc silente_L5-P1+	30MK QD, IV+50MK 2SÍ/2NO/5SÍ/2NO/4SÍ, PO	108,5***	100	0

venetoclax				

* p <= 0,05, ** p <= 0,01, *** p <= 0,001 en comparación con el grupo control

Ejemplo 14: Eficacia in vivo de CD74-L5-P1 Fc silente contra el modelo de xenoinjerto de leucemia (eosinofílica) mieloide aguda humana EOL1 en ratones

[752] Dado que los estudios in vitro habían demostrado una inhibición de crecimiento celular potente y dependiente del blanco en la línea celular EOL1 mediante una combinación de CD74-L5-P1 Fc silente con venetoclax, se evaluó la actividad antitumoral de este tratamiento combinado in vivo en este modelo de AML.

Métodos

[753] Se cultivaron células transfectadas con EOL1 luciferasa a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire en RPMI1640 (BioConcept Ltd. Amimed) suplementado con 10% de FCS (BioConcept Ltd. Amimed, Nº 2-01F30-I), L-glutamina 2 mM (BioConcept Ltd. Amimed, Nº 5-10K00-H) y piruvato de sodio 1 mM (BioConcept Ltd. Amimed, Nº 5-60F00-H), HEPES 10 mM (Gibco Nº 11560496). A fin de establecer los xenoinjertos de EOL1, las células se cosecharon y se resuspendieron en HBSS (Gibco, Nº 14175) antes de inyectar 100 µl que contienen 5 x 10^6 células por vía subcutánea en los flancos de ratones SCID beige hembra (Charles River, Alemania). El crecimiento tumoral se monitoreó de manera regular después de inocular las células y los animales fueron asignados aleatoriamente en grupos de tratamiento (n = 6) con un volumen tumoral promedio de aproximadamente 130 mm^3. Los grupos control y varios grupos de tratamiento recibieron las dosis indicadas en la Figura 12. Se administraron los anticuerpos CD74-L5-P1 Fc silente, isotipo de IgG1 ADC Fc silente y CD74 Fc silente por vía intravenosa (iv) una vez al comienzo del tratamiento a las dosis indicadas en la Figura 12, ya sea solos o en combinación con venetoclax que fue administrado por vía oral (po) diariamente (qd) a 50 mg/kg. Las dosis se ajustaron a los pesos corporales de cada ratón. El volumen de dosis iv era de 10 ml/kg y cada ADC se disolvió en 0,9% (p/v) de NaCl en agua. Los datos de volumen tumoral el día 10 de postratamiento fueron analizados estadísticamente usando la prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis (Indigo Software). Cuando fuera aplicable, los resultados se expresan como la media ± EEM. Como una medida de la eficacia se calcula el valor del % T/C el día 10 de acuerdo con:

$$(\Delta\text{volumen tumoral}^{\text{tratado}}/\Delta\text{volumen tumoral}^{\text{control}})*100$$

La regresión tumoral se calculó de acuerdo con:

$$-(\Delta\text{volumen tumoral}^{\text{tratado}}/\text{volumen tumoral}^{\text{tratado al comienzo}})*100$$

Donde Δvolúmenes tumorales representan la media del volumen tumoral el día de la evaluación menos la media del volumen tumoral al comienzo del experimento.

Resultados: Eficacia y tolerabilidad

[754] Los efectos antitumorales de CD74-L5-P1 Fc silente en combinación con venetoclax junto con varios grupos control se resumen en la Figura 12 y en la Tabla 26. Se observó una

eficacia limitada con venetoclax (50 mg/kg po qd) solo y con la combinación del anticuerpo CD74 Fc silente más venetoclax. Se observó un ligero retardo del crecimiento tumoral (TGD) con la combinación de isotipo IgG1 ADC (30 mg/kg) más venetoclax (50 mg/kg) y también con el CD74-L5-P1 Fc silente solamente (30 mg/kg) pero ninguno era estadísticamente diferente del grupo control de vehículo. Por el contrario, se observaron regresiones completas (CR) con CD74-L5-P1 Fc silente administrado a una dosis de 10 ó 30 mg/kg iv una vez en combinación con venetoclax 50 mg/kg po qdx21 ($p<0,05$ del grupo de vehículo y del grupo de isotipo IgG1 ADC más venetoclax). Todos los tratamientos fueron bien tolerados en base a cambios del peso corporal (Figura 13).

Tabla 26: Efectos antitumorales de CD74-L5-P1 Fc silente en combinación con venetoclax

Agente de prueba, programa y ruta de las dosis	Día	ΔVolumen tumoral (mm^3)	T/C (%)	Regresión (%)
Vehículo p.o. + vehículo i.v.	10	1082	100	
Vehículo po + CD74-L5-P1 Fc silente 30 mg/kg i.v.	10	817	76	
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + vehículo para ADC	10	977	90	
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74-L5-P1 Fc silente 30 mg/kg i.v.	10	-128		-100*$
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74-L5-P1 Fc silente 10 mg/kg i.v.	10	-127		-100*$
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + isotipo-IgG1 ADC Fc silente 30 mg/kg i.v.	10	963	88,99	
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74 Fc silente 30 mg/kg i.v.	10	1028	95,03	

Los volúmenes tumorales delta y los valores de % de T/C se calcularon para el día 10 y se expresan como promedios. El * indica diferencia estadística ($p<0,05$) en comparación con el control de vehículo y $ indica diferencia estadística (<0,05) en comparación con el isotipo IgG1 ADC + venetoclax el día 10 (prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis; Indigo Software).

Ejemplo 15: Eficacia in vivo de CD74-ADC Fc silente con diferentes conectores-cargas útiles contra el modelo de xenoinjerto de leucemia (eosinofílica) mieloide aguda humana EOL1 en ratones

[755] Para optimizar el conector-carga útil, se evaluó la eficacia de 6 CD74-ADC con diferentes conectores-cargas útiles (L5-P1, L30-P1, L31-P1, L32-P1, L33-P1 y L34-P1) en el modelo EOL1 in vivo.

Métodos

[756] Se cultivaron células transfectadas con EOL1 luciferasa a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire en RPMI1640 (BioConcept Ltd. Amimed) suplementado con 10% de FCS (BioConcept Ltd. Amimed, Nº 2-01F30-I), L-glutamina 2 mM (BioConcept Ltd. Amimed, Nº 5-10K00-H) y piruvato de sodio 1 mM (BioConcept Ltd. Amimed, Nº 5-60F00-H), HEPES 10 mM (Gibco Nº 11560496). A fin de establecer los xenoinjertos de EOL1, las células se cosecharon y se resuspendieron en HBSS (Gibco, Nº 14175) antes de inyectar 100 µl que contienen 5 x 10^6 células por vía subcutánea en los flancos de ratones SCID beige hembra (Charles River, Alemania). El crecimiento tumoral se monitoreó de manera regular después de inocular las células y los animales fueron asignados aleatoriamente en grupos de tratamiento (n = 6) con un volumen tumoral promedio de aproximadamente 130 mm^3. Se administraron dosis de control y varios CD74-ADC Fc silente (L5-P1, L30-P1, L31-P1, L32-P1, L33-P1 y L34-P1) como se indica en la Figura 14. Los ADC fueron administrados por vía intravenosa (iv) una vez al comienzo del tratamiento a razón de 2,5 mg/kg o 3,3 mg/kg en combinación con venetoclax que se administró por vía oral (po) diariamente (qd) a 50 mg/kg. Las dosis se ajustaron a los pesos corporales de cada ratón. El volumen de dosis iv era de 10 ml/kg y cada ADC se disolvió en 0,9% (p/v) de NaCl en agua. Los datos de volumen tumoral el día 10 de postratamiento se analizaron estadísticamente usando un ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey post hoc (Indigo Software). Los resultados se expresan como la media ± EEM. Como una medida de la eficacia se calcula el valor del % T/C el día 10 de acuerdo con:

$$(\Delta\text{volumen tumoral}^{\text{tratado}}/\Delta\text{volumen tumoral}^{\text{control}})*100$$

La regresión tumoral se calculó de acuerdo con:

$$-(\Delta\text{volumen tumoral}^{\text{tratado}}/\text{volumen tumoral}^{\text{tratado al comienzo}})*100$$

Donde los Δvolúmenes tumorales representan la media del volumen tumoral el día de la evaluación menos la media del volumen tumoral al comienzo del experimento.

Resultados: Eficacia y tolerabilidad

[757] Todos los ADC, excepto el CD74-L5-P1 Fc silente, redujeron significativamente ($p<0,05$) el crecimiento de los tumores EOL1 después de administrar una dosis baja de 2,5 mg/kg en combinación con venetoclax en comparación con el grupo control de vehículo del día 10 (Figura 14 y Tabla 27). El CD74-L34-P1 Fc silente mostró una respuesta relacionada con la dosis de entre 2,5 y 3,3 mg/kg. Todos los programas de tratamiento fueron bien tolerados en base a cambios del peso corporal (Figura 15).

Tabla 27: Efectos antitumorales de los CD74-ADC en combinación con venetoclax

Agente de prueba, programa y ruta de las dosis	**Día**	**ΔVolumen tumoral (mm^3)**	**T/C (%)**
Vehículo p.o. + vehículo i.v.	10	1082	100
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74-L5-P1 2,5 mg/kg i.v.	10	702	70

Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74-L30-P1 2,5 mg/kg i.v.	10	47	5*$
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74-L31-P1 2,5 mg/kg i.v.	10	144	14*$
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd, CD74-L32-P1 2,5 mg/kg i.v.	10	38	4*$
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74-L33-P1 2,5 mg/kg i.v.	10	228	23*$
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74-L34-P1 2,5 mg/kg i.v.	10	401	40*
Venetoclax 50 mg/kg p.o. qd + CD74-L34-P1 3,3 mg/kg i.v.	10	170	17*$

Los volúmenes tumorales delta y los valores de % de T/C se calcularon para el día 10 y se expresan como promedios. El * indica diferencia estadística ($p<0,05$) en comparación con el control de vehículo y $ indica diferencia estadística (<0,05) en comparación con CD74-L5-P1 + venetoclax el día 10 (ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey post hoc; Indigo Software).

Ejemplo 16: Expresión de variantes de LL1 humanizadas

[758] Se cotransfectaron vectores de expresión que contienen diferentes cadenas pesadas LL1 humanizadas y cadenas livianas LL1 humanizadas en células Expi293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando expifectamina y se cultivaron durante 7 días. Se cosecharon los sobrenadantes del cultivo mediante centrifugación, se filtraron y los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad con Proteína A. Se evaluó la pureza del anticuerpo después de la cromatografía de afinidad se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica.

[759] La primera ronda de transfecciones (Tabla 28) se centraba en evaluar las diferentes cadenas pesadas y livianas humanizadas, junto con las mutaciones de eliminación PTM (véase el Ejemplo 17).

Tabla 28: Expresión de variantes de LL1 humanizadas, primera ronda

Cadena pesada	Cadena liviana	Rendimiento final (mg)	Pureza (% de monómeros)
hLL1	hLL1	2,58	99,73
hLL1	hzLL1-Vk1b	2,57	99,75
hLL1	hzLL1-Vk1a	2,28	99,79
hLL1	hLL1 (NQ)	1,34	99,78
hLL1	hLL1 (QG)	1,05	99,78
hLL1	hLL1 (TG)	1,89	99,7
hLL1	hLL1 (SG)	2,06	99,67
hLL1	hLL1 (NV)	0,53	99,53
hzLL1-VH2	hzLL1-Vk1b	2,98	99,74
hzLL1-VH1b	hzLL1-Vk1b	2,60	99,5
hzLL1-VH1a	hzLL1-Vk1b	2,60	99,62
hzLL1-VH3	hLL1	3,49	99,69
hzLL1-VH2	hLL1	2,10	99,81
hzLL1-VH3	hzLL1-Vk1a	2,71	99,66
hzLL1-VH1b	hLL1	2,96	99,62
hzLL1-VH2	hzLL1-Vk1a	2,77	99,77
hzLL1-VH1a	hLL1	2,80	99,67

hzLL1-VH1b	hzLL1-Vk1a	3,00	99,55
hzLL1-VH3	hzLL1-Vk1b	3,07	99,62
hzLL1-VH1a	hzLL1-Vk1a	2,64	99,61

[760] La expresión y pureza generales eran comparables entre la mayoría de las variantes humanizadas y la versión humanizada original (hLL1). Se encontró una reducción del rendimiento global con la mayoría de las variantes de eliminación de PTM en comparación con las otras variantes humanizadas.

[761] Se incorporó el conjunto de mutaciones NQ en las cadenas livianas hzLL1-Vk1b y hzLL1-Vk1a, y se expresó una segunda ronda de variantes usando una transfección transitoria en células Expi293 (Tabla 29):

Tabla 29: Expresión de variantes de LL1 humanizadas, segunda ronda

Cadena pesada	Cadena liviana	Rendimiento final (mg)	Pureza (% de monómeros)
hLL1	hzLL1-Vk1a (NQ)	2,8	96,0
hLL1	hzLL1-Vk1b (NQ)	0,5	98,0
hzLL1-VH1a Y95F	hzLL1-Vk1a (NQ)	2,75	98,0
hzLL1-VH1a Y95F	hzLL1-Vk1b (NQ)	0,8	99,0
hzLL1-VH1a V5Q Y95F	hzLL1-Vk1a (NQ)	1,8	98,0
hzLL1-VH1a V5Q Y95F	hzLL1-Vk1b (NQ)	0,8	99,0

[762] La expresión global de estas variantes parecía correlacionarse con la selección de las variantes de cadena liviana, donde la cadena liviana hzLL1-Vk1a (NQ) era expresada a un nivel más alto que las variantes con la cadena liviana hzLL1-Vk1b (NQ).

[763] Se estudió la humanización de variantes de anticuerpos usando FACS y SPR para la unión a la proteína CD74 humana. Se seleccionaron las variantes de anticuerpos con características de unión similares al milatuzumab.

Ejemplo 17: Humanización y eliminación de PTM de las secuencias LL1 VH y VL

[764] Los dominios variables del anticuerpo anti-CD74 LL1 de murino se describieron en US7931903 en el contexto de secuencias de anticuerpo quiméricas (cLL1):

LL1 VH

QVQLQQSGPELKKPGETVKVTCKTSGYTFTNYGVNWIKQTPGEGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLESSASTAFLQISNLKNEDMGTYFCSRSRGKNEAWFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID N°:49)

LL1 VL

DIQLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSSHVPPTFGAGTKLEIK (SEQ ID N°:50)

[765] Se divulgaron al mismo tiempo que las secuencias de los dominios VH y VL humanizados, hLL1 VH y hLL1 VL, respectivamente:

hLL1 VH

QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWIKQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQGTLVTVS

S (SEQ ID N°:10)

hLL1 VL

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ ID N°:23)

[766] La humanización de estas secuencias se describió en el ejemplo 5 de US7931903. Este proceso de humanización describe la humanización de ambos dominios variables usando secuencias de anticuerpo que no son de la línea germinal de los anticuerpos humanizados (RT-TS3, HF-21/28) como moldes, lo cual introduce una cantidad de residuos del marco de murino en las secuencias finales del anticuerpo. Además, se dejó intacto un sitio problemático (Asn-Gly o NG) para una modificación común de postraducción de la proteína (desamidación) en la región CDR L1 de la cadena liviana humanizada. Estas propiedades resultan indeseables para un anticuerpo terapéutico, ya que podrían aumentar la inmunogenicidad o disminuir la afinidad de unión del anticuerpo con el almacenamiento.

[767] Se llevaron a cabo dos esfuerzos separados para resolver estas complicaciones. Primero, se rehumanizaron ambas cadenas pesada y liviana de LL1 usando marcos de la línea germinal humana como molde. Segundo, se introdujeron deliberadamente varias mutaciones en la secuencia Asn-Gly en la región CDR L1 de la cadena liviana LL1 para interrumpir el sitio de modificación postraducción. Las construcciones humanizadas con una expresión y unión a CD74 razonables se combinaron con mutaciones de eliminación PTM para producir los principales candidatos finales.

Humanización de LL1

[768] Inicialmente, se compararon las secuencias de LL1 VH y VL de murino con los marcos de la línea germinal de ratón. Para VH, la coincidencia del gen V más próxima (residuos 79/98) parece ser la IGHV9-1*02 de murino (nomenclatura IMGT), con mutaciones de la línea germinal dispersas entre las regiones CDR y de marco. Para VL, la coincidencia del gen V más próxima (residuos 93/100) parece ser la IGKV1-100*01 de murino, con mutaciones divididas entre las regiones CDR y el extremo N-terminal.

[769] El alineamiento de la región LL1 VH de murino con la línea germinal humanas reveló una coincidencia razonable con tres líneas germinales humanas: IGHV7-4-1*02 (coincidencia más próxima), IGHV1-3*02 e IGHV5-51*02. Varios residuos de murino en las regiones del marco que se habían mantenido en la humanización previa de la cadena pesada (hLL1 VH) también se marcaron por ser potencialmente importantes para la unión. Estos tres residuos de la línea germinal humana y de murino se usaron para preparar 6 variantes de cadenas pesadas:

1. humanización a IGHV7-4-1*02 (hzLL1-VH1a)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWVRQAPGQGLEWMGWINPNTGEP

TFDDDFKGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCSRSRGKNEAWFDYWGQGTLVTV SS (SEQ ID N°:51)

2. Humanización a IGHV7-4-1*02 con retención de la mutación V37I (hzLL1-VH1b)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWIRQAPGQGLEWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCSRSRGKNEAWFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID N°:52)

3. Humanización a IGHV7-4-1*02 con retención de la mutación Y95F (hzLL1-VH1a Y95F)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWVRQAPGQGLEWMGWINPNTGEP TFDDDFKGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCSRSRGKNEAWFDYWGQGTLVTV SS (SEQ ID N°:53)

4. Humanización a IGHV7-4-1*02 con retención de las mutaciones V5Q Y95F (hzLL1-VH1a V5Q Y95F)

QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWVRQAPGQGLEWMGWINPNTGEP TFDDDFKGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCSRSRGKNEAWFDYWGQGTLVTV SS (SEQ ID N°:54)

5. Humanización a IGHV1-3*02 (hzLL1-VH2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGVNWVRQAPGQRLEWMGWINPNTGEP TFDDDFKGRVTITLDSSASTAYMELSSLRSEDMAVYYCSRSRGKNEAWFDYWGQGTLVTV SS (SEQ ID N°:55)

6. Humanización a IGHV5-51*01 (hzLL1-VH3)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTNYGVNWVRQMPGKGLEWMGWINPNTGEPT FDDDFKGQVTISLDSSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCSRSRGKNEAWFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID N°:56)

[770] En el caso de la cadena liviana, el alineamiento de la cadena liviana LL1 de murino a las líneas germinales humanas reveló una coincidencia razonable con dos líneas germinales humanas: IGKV2-40*01 e IGKV2-30*02. Estas secuencias se usaron para preparar dos variantes de cadenas livianas humanizadas:

1. Humanización a IGKV2-40*01 (hzLL1-Vk1a)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID N°:27)

2. Humanización a IGKV2-30*02 (hzLL1-Vk1b)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID N°:31)

[771] Se sintetizaron las cadenas pesadas y cadenas livianas humanizadas y se usaron para la expresión de la proteína recombinante (véase el Ejemplo 16).

Eliminación de PTM de la cadena liviana LL1

[772] Para eliminar el sitio de desamidación (Asn-Gly, NG) de la región CDR L1 de la cadena liviana, se construyeron secuencias que contienen los siguientes 5 residuos alternados (QG, SG, TG, NQ, NV) en la secuencia hLL1 VL. Estas se usaron para obtener las siguientes 5 variantes de la cadena liviana:

hLL1 VL (QG)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRQGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ ID N°:57)

hLL1 VL (SG)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRSGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ ID N°:58)

hLL1 VL (TG)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRTGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ ID N°:59)

hLL1 VL (NQ)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNQNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ ID N°:36)

hLL1 VL (NV)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNVNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ ID N°:60)

[773] Se sintetizaron cadenas livianas humanizadas mutantes y se usaron para expresar la proteína recombinante.

Ejemplo 18: Determinación de KD con Biacore

[774] La unión a la CD74 humana y de cinomolgo para los anticuerpos IgG de tipo salvaje (WT) y las variantes humanizadas fue evaluada para las determinaciones de afinidad usando Biacore. Las constantes cinéticas se obtuvieron por medio de SPR usando el instrumento Biacore 8K (Cytiva, antes GE Healthcare Lifesciences) como se describirá a continuación. Se utilizó el método de captura anti-IgG Fc para determinar la cinética de los anticuerpos. Se usó un kit de captura anti-IgG Fc disponible comercialmente (Cytiva, antes GE Healthcare Lifesciences). La IgG provista se inmovilizó sobre la superficie del chip usando el protocolo de acoplamiento de aminas provisto de GE. Este anticuerpo inmovilizado capturó al WT y a las variantes humanizadas, y la CD74 soluble humana y de cinomolgo circularon como analitos. La concentración de CD74 comenzó a 100 nM y se diluyó en serie, una parte a una parte, con solución amortiguadora de corrida para obtener siete concentraciones. La regeneración se realizó al final de cada concentración usando las condiciones especificadas en el kit.

[775] Se completó una sustracción de doble referencia para generar los datos finales. Los

datos brutos se ajustaron a un modelo de unión 1:1, con uno o más parámetros del Índice de Refracción definidos en local. Dada la naturaleza del antígeno, en la siguiente tabla se enumeran los resultados cinéticos aparentes para WT y las variantes de IgG humanizadas

Tabla 30: Resultados cinéticos

Muestra	**Antígeno**	**k_a (1/Ms)**	***k_d* (1/s)**	**KD (M)**	**Antígeno**	**k_a (1/Ms)**	***k_d* (1/s)**	**KD (M)**
milatuzumab	CD74 humana	1,0E+05	5,1E-04	4,9E-09	CD74 Cino	5,6E+04	8,8E-04	1,6E-08
Hcmil x LCmil_NQ		9,6E+04	3,3E-04	3,4E-09		3,0E+04	7,7E-04	2,6E-08
Mil_HC x hzVk1b		2,3E+05	1,7E-04	7,2E-10		1,1E+05	5,8E-04	5,1E-09
Mil_HC x hzVk1a		2,1E+05	1,8E-04	8,5E-10		1,0E+05	5,8E-04	5,7E-09
VHmil x VK1aNQ		2,0E+05	1,8E-04	9,1E-10		1,0E+05	6,2E-04	5,9E-09
VHmil x VK1bNQ		2,2E+05	1,6E-04	7,6E-10		1,1E+05	5,8E-04	5,3E-09