

DERIVADOS DE EXATECAN Y CONJUGADOS DE ANTICUERPO Y FÁRMACO DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 63/422 517, presentada el 4 de noviembre de 2022, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

ANTECEDENTES

[0002] Los conjugados fármaco y anticuerpo (ADC) proporcionan un mecanismo para la administración selectiva de cargas terapéuticas de moléculas pequeñas a células cancerosas con antígenos positivos, lo que atenúa así la toxicidad sistémica de los fármacos citotóxicos para las células normales con antígenos negativos. Tres componentes de un ADC (el anticuerpo, la carga citotóxica y el enlazador que los une) son importantes para diseñar una terapia eficaz. A pesar del desarrollo activo, aún existen desafíos, por ejemplo, la toxicidad debido a la unión del anticuerpo a su objetivo en el tejido normal y la dispersión de la carga citotóxica en el tejido normal debido a la inestabilidad del enlazador de ADC. Por lo tanto, muchos ADC no han tenido éxito en los ensayos clínicos debido a la falta de seguridad y/o eficacia en dosis toleradas.

[0003] La topoisomerasa I desempeña un papel fundamental en la replicación del ADN tanto en condiciones normales como en enfermedades (por ejemplo, cáncer). Como la inhibición de la topoisomerasa I conduce a la muerte celular, los compuestos que se unen a la topoisomerasa I y la inhiben pueden ser útiles como agentes terapéuticos.

[0004] La camptotecina es un producto natural con actividad citotóxica en una variedad de líneas celulares. La unión de su anillo de lactona activo a la topoisomerasa I inhibe la replicación del ADN, provocando así la apoptosis celular. Sin embargo, sus limitaciones para el desarrollo de fármacos incluyen, por ejemplo, su baja solubilidad en agua y un equilibrio entre su forma activa, de lactona, y su forma inactiva, de anillo abierto.

[0005] Exatecan es un derivado de la camptotecina soluble en agua. Como agente quimioterapéutico, el mesilato de exatecan no obtuvo la aprobación farmacológica después de varios ensayos clínicos debido a la falta de eficacia o alta toxicidad en las dosis probadas. Se han realizado esfuerzos para permitir la utilidad clínica del exatecan convirtiéndolo en una forma de profármaco, donde el exatecan está unido covalentemente a un polímero de polialcohol carboximetildextrano a través de un espaciador peptídico (un sustrato para las proteasas de cathepsina intracelulares). Sin embargo, este profármaco no tuvo éxito en los ensayos clínicos.

[0006] Por lo tanto, existe una necesidad de compuestos más adecuados para el desarrollo clínico y el éxito en el tratamiento de tumores humanos. Además, la administración preferencial de inhibidores de la topoisomerasa I a los tejidos enfermos a través de conjugados de fármaco y anticuerpo podría

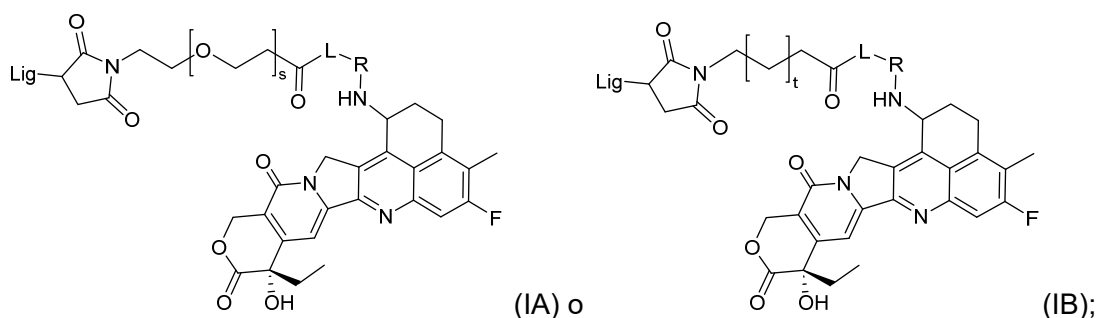
conducir a una mayor seguridad y eficacia, lo que brinda así opciones terapéuticas para un mayor número de pacientes y tipos de cáncer.

COMPENDIO

[0007] La presente descripción hace referencia a compuestos útiles para el tratamiento del cáncer. La presente divulgación está dirigida, en parte, a construcciones de carga activa y enlazador útiles para unir cargas activas a conjugados de fármacos basados en exatecan y anticuerpos. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan compuestos que representan una carga terapéutica, una construcción de carga activa y enlazador o un conjugado de fármaco.

[0008] Por ejemplo, la presente divulgación proporciona construcciones de carga activa y enlazador y conjugados de fármacos, cada uno de los cuales comprende una carga terapéutica divulgada. Además, se proporciona en este documento el uso de los compuestos descritos como agentes medicinales, procesos para su preparación y composiciones farmacéuticas que los contienen como ingrediente activo, tanto solos como en combinación con otros agentes, y también se proporciona su uso como medicamentos y/o en la fabricación de medicamentos para el tratamiento del cáncer.

[0009] Por ejemplo, se describe en el presente documento un conjugado de fármaco representado por la Fórmula IA o la Fórmula IB:



o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

Lig es una fracción objetivo;

L es una fracción enlazadora;

R se selecciona del grupo que consiste en -R¹, -C(O)-R¹-, -C(O)-O-R¹-, -C(O)-NH-R¹-, -C(O)-alquilo C₀₋₃-C(O)-NH-R¹-, -C(O)-(heteroarilo de 5-6 miembros)-R¹-, -CH₂-(heteroarilo de 5-6 miembros)-R¹-, -C(O)-(heterociclilo de 4-6 miembros)-, -C(O)-(heterociclilo de 4-6 miembros)-C(O)-R¹-, -C(O)-(heterociclilo de 4-6 miembros)-NH-R¹-, -C(O)-cicloalquilo C₃₋₄-R¹-, -C(S)-cicloalquilo C₃₋₄-R¹- y -C(O)-O-fenilo-R¹-; en donde se puede sustituir opcionalmente cualquier heteroarilo, heterociclilo, alquilo y cicloalquilo antemencionado sustituidos con uno, dos o tres sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo y oxo;

R¹ se selecciona del grupo que consiste en CH₂-CH₂O-, -CH₂-O-, -NH-, -CH₂ONH- y -CH(CH₃)-

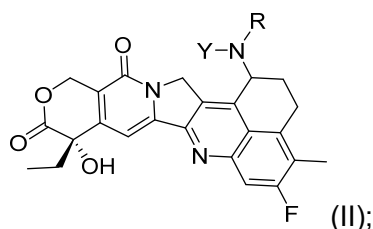
NH-; y

s es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

t es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

[0010] También se describe en este documento una carga activa terapéutica representada por la

5 Fórmula II:



o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

Y es hidrógeno o -alquilo C₁₋₃;

10 R se selecciona del grupo que consiste en -C(O)-alquilo C₃, -C(O)-cicloalquilo C₃, -C(O)-cicloalquilo C₄, -alquilo C₁, -C(O)-(pirrolidinilo) y -C(O)-CH₂ONH-C(O)-(pirrolidinilo);

en donde:

-C(O)-alquilo C₃, -C(O)-cicloalquilo C₃, -C(O)-cicloalquilo C₄ o -alquilo C₁ está sustituido por uno o dos sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, -NH₂, -CHO y -COOH;

15 -C(O)-(pirrolidinilo) y -C(O)-CH₂ONH-C(O)-(pirrolidinilo) pueden estar opcionalmente sustituidos en un átomo de carbono de pirrolidinilo disponible por uno o dos sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en halógeno e hidroxilo, o dos R¹ se unen para formar oxo; y

20 -C(O)-(pirrolidinilo) puede estar opcionalmente sustituido en un átomo de nitrógeno de pirrolidinilo disponible por -CHO, -C(O)CH₃ o -C(O)CH₂NH₂.

[0011] Se contemplan en el presente documento métodos para tratar el cáncer, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto descrito. Por ejemplo, se proporciona aquí un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una carga terapéutica descrita, una construcción de carga activa y enlazador descrita o un conjugado de fármaco descrito.

[0012] Se describen además en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto descrito y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se proporciona aquí una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto descrito, por ejemplo, una carga terapéutica descrita, una construcción de carga activa y enlazador descrita, o un conjugado de fármaco descrito y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013] La Figura 1A, la Figura 1B y la Figura 1C muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3031, 3036 y 3038 sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de carcinoma de pulmón NCI-H292 en ratones lampiños atómicos. Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0014] La Figura 2A y la Figura 2B muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3058A y 3053B sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de cáncer de garganta humano FaDu en ratones lampiños atómicos. Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0015] La Figura 3A, la Figura 3B, la Figura 3C y la Figura 3D muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3058A, 3058B, 3102 y 3053B sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de cáncer de pulmón humano H1975 en ratones lampiños atómicos. Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0016] La Figura 4A, la Figura 4B y la Figura 4C muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3053B, 3058A y 3102 sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 en ratones NOD-SCID. Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0017] La Figura 5A, la Figura 5B, la Figura 5C, la Figura 5D, la Figura 5E y la Figura 5F muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3058A, 3102, 3059B, 3108, 3110 y 3053B sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de cáncer de garganta humano FaDu en ratones NOD-SCID. Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0018] La Figura 6A, la Figura 6B, la Figura 6C y la Figura 6D muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3058A, 3053B, 3102 y 3059B sobre xenoinjerto coinoculado de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y la línea celular de cáncer de colon SW620-luc en ratones NOD-SCID. Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0019] La Figura 7A, la Figura 7B, la Figura 7C y la Figura 7D muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3053B, 3058A, 3102 y 3059B sobre el xenoinjerto coinoculado con la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 y la línea celular de cáncer de cáncer de colon SW620-luc en ratones NOD-SCID. Las cuatro figuras muestran la señal de luciferasa expresada como flujo total (fotones por segundo) en función del tiempo después del inicio de la administración del conjugado de anticuerpo y fármaco en comparación con el grupo de control del vehículo. Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que

el control.

[0020] La Figura 8A, la Figura 8B, la Figura 8C y la Figura 8D muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3111, 3112, 3110 y 3109 sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de cáncer de garganta humano FaDu en ratones NOD-SCID (10 mg por kg, 1 dosis). Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0021] La Figura 9A, la Figura 9B, la Figura 9C y la Figura 9D muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3111, 3112, 3110 y 3109 sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de cáncer de garganta humano FaDu en ratones NOD-SCID (3 mg por kg, 1 dosis). Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0022] La Figura 10A, la Figura 10B, la Figura 10C y la Figura 10D muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3111, 3112, 3110 y 3109 sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de cáncer de garganta humano FaDu en ratones NOD-SCID (1 mg por kg, 3 dosis). Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

[0023] La Figura 11A, la Figura 11B, la Figura 11C y la Figura 11D muestran el efecto de supresión tumoral de los conjugados de anticuerpo y fármaco 3111, 3112, 3110 y 3109 sobre el xenoinjerto derivado de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 en ratones NOD-SCID (3 mg por kg, 1 dosis). Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0024] Las características y otros detalles de la descripción se describirán ahora más particularmente. Antes de describir adicionalmente la presente divulgación, se recopilan aquí ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Estas definiciones deben leerse a la luz del resto de la descripción y tal como las entiende una persona experta en la técnica. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos habituales en la técnica.

Definiciones

[0025] Tal como se utilizan en este documento, las palabras “un” y “una” incluyen uno o más, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, el término “un agente” abarca tanto un solo agente como una combinación de dos o más agentes.

[0026] El término “alquenilo” como se utiliza en este documento se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado insaturado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquenilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un grupo lineal o ramificado de 2 a 6 o 3 a 4 átomos de carbono, denominados en este documento alquenilo C₂₋₆ y alquenilo C₃₋₄, respectivamente. Los grupos

alquenilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, vinilo, alilo, butenilo, pentenilo, etc.

[0027] El término “alcoxi” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado unido al oxígeno (alquil-O-). Los grupos alcoxi ejemplares incluyen, pero no se limitan a, grupos alcoxi de 1 a 6 o 2 a 6 átomos de carbono, denominados en este documento alcoxi C₁₋₆ y alcoxi C₂₋₆, respectivamente. Los grupos alcoxi ejemplares incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, isopropoxi, etc.

[0028] El término “alcoxialquilo” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado unido al oxígeno, unido a un segundo grupo alquilo lineal o ramificado (alquil-O-alquil-). Los grupos alcoxialquilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, grupos alcoxialquilo en los que cada uno de los grupos alquilo contiene independientemente de 1 a 6 átomos de carbono, denominados en este documento alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆. Los grupos alcoxialquilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, metoximetilo, 2-metoxietilo, 1-metoxietilo, 2-metoxipropilo, etoximetilo, 2-isopropoxietilo, etc.

[0029] El término “alquioxycarbonilo” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado unido al oxígeno, unido a un grupo carbonilo (alquil-O-C(O)-). Los grupos alcoxycarbonilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, grupos alcoxycarbonilo de 1 a 6 átomos de carbono, denominados en este documento alcoxycarbonilo C₁₋₆. Los grupos alcoxycarbonilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, t-butoxycarbonilo, etc.

[0030] El término “alqueniloxi” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo alquenilo lineal o ramificado unido al oxígeno (alquenil-O-). Los grupos alqueniloxi ejemplares incluyen, pero no se limitan a, grupos con un grupo alquenilo de 3 a 6 átomos de carbono, denominados en este documento alqueniloxi C₃₋₆. Los grupos “alqueniloxi” ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aliloxi, buteniloxi, etc.

[0031] El término “alquiniloxi” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo alquenilo lineal o ramificado unido al oxígeno (alquinil-O-). Los grupos alquiniloxi ejemplares incluyen, pero no se limitan a, grupos con un grupo alquinilo de 3 a 6 átomos de carbono, denominados en este documento alquiniloxi C₃₋₆. Los grupos alquiniloxi ejemplares incluyen, pero no se limitan a, propiniloxi, butiniloxi, etc.

[0032] El término “alquilo” hace referencia a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada. Los grupos alquilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, hidrocarburos lineales o ramificados de 1 a 6, 1 a 4 o 1 a 3 átomos de carbono, denominados en este documento alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₄ y alquilo C₁₋₃, respectivamente. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, de modo no taxativo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-2-butilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, etc.

[0033] El término “alquilcarbonilo” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado unido a un grupo carbonilo (alquil-C(O)-). Los grupos alquilcarbonilo ejemplares incluyen,

pero no se limitan a, grupos alquilcarbonilo de 1 a 6 átomos, denominados en este documento grupos alquilcarbonilo C_{1-6} . Los grupos alquilcarbonilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, acetilo, propanoílo, isopropanoílo, butanoílo, etc.

[0034] “Alquilenno” significa un radical alifático divalente saturado, lineal o ramificado, que tiene el número de carbonos indicado. “Cicloalquilenno” se refiere a un radical divalente de un grupo hidrocarburo saturado carbocíclico que tiene el número de carbonos indicado.

[0035] El término “alquinilo” como se utiliza en este documento se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado insaturado que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un grupo lineal o ramificado de 2 a 6 o 3 a 6 átomos de carbono, denominados en este documento alquinilo C_{2-6} y alquinilo C_{3-6} , respectivamente. Los grupos alquinilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, metilpropinilo, etc.

[0036] El término “carbonilo” como se utiliza aquí se refiere al radical $-C(O)-$.

[0037] El término “ciano” como se utiliza aquí se refiere al radical $-CN$.

[0038] El término “cicloalcoxi” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo cicloalquilo unido al oxígeno (cicloalquil-O-). Los grupos cicloalcoxi ejemplares incluyen, pero no se limitan a, grupos cicloalcoxi de 3 a 6 átomos de carbono, denominados en este documento grupos cicloalcoxi C_{3-6} . Los grupos cicloalcoxi ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ciclopropoxi, ciclobutoxi, ciclohexiloxi, etc.

[0039] Los términos “cicloalquilo” o “grupo carbocíclico” como se utilizan en este documento se refieren a un grupo hidrocarburo saturado o parcialmente insaturado de, por ejemplo, 3-6 o 4-6 carbonos, denominados en este documento cicloalquilo C_{3-6} o cicloalquilo C_{4-6} , respectivamente. Los grupos cicloalquilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ciclohexilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclobutilo o ciclopropilo.

[0040] Los términos “halo” o “halógeno” tal como se utilizan en este documento se refieren a F, Cl, Br o I.

[0041] Los términos “heteroarilo” o “grupo heteroaromático” como se utilizan en este documento se refieren a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5 a 6 miembros que contiene uno o más heteroátomos, por ejemplo, de uno a tres heteroátomos, como nitrógeno, oxígeno y azufre. Cuando sea posible, dicho anillo heteroarilo puede estar unido al radical adyacente a través de carbono o nitrógeno.

Los ejemplos de anillos heteroarilo incluyen, entre otros, furano, tiofeno, pirrol, tiazol, oxazol, isotiazol, isoxazol, imidazol, pirazol, triazol, piridina o pirimidina, etc.

[0042] Los términos “heterociclilo” o “grupo heterocíclico” están reconocidos en la técnica y se refieren, por ejemplo, a estructuras de anillo monocíclicas o bicíclicas de 4 a 10 miembros, saturadas o parcialmente insaturadas, o, por ejemplo, estructuras de anillo saturadas de 4 a 9 o 4 a 6 miembros,

incluidos anillos puenteados, fusionados o espirocíclicos, y cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a tres heteroátomos, como nitrógeno, oxígeno y azufre. Cuando sea posible, los anillos heterocíclicos pueden estar unidos al radical adyacente a través de carbono o nitrógeno. Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen, pero no se limitan a, pirrolidina, piperidina, morfolina, tiomorfolina, piperazina, oxetano, azetidina, tetrahidrofurano o dihidrofurano, etc.

[0043] El término “heterociclioxi” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo heterociclilo unido al oxígeno (heterocicli-O-).

[0044] El término “heteroariloxi” como se utiliza en este documento se refiere a un grupo heteroarilo unido al oxígeno (heteroaril-O-).

[0045] Los términos “hidroxi” e “hidroxilo” tal como se utilizan en este documento se refieren al radical -OH.

[0046] El término “oxo” como se utiliza aquí se refiere al radical =O.

[0047] “Farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable” incluye entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administran a un animal o a un ser humano, según corresponda. Para la administración a seres humanos, las preparaciones deberán cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza general como lo requieren los estándares de la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

[0048] Tal como se usan en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” hacen referencia a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, que sean compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionen funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas.

[0049] Tal como se usa en la presente, el término “composición farmacéutica” hace referencia a una composición que comprende al menos un compuesto descrito en la presente formulado junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0050] “Individuo”, “paciente” o “sujeto” se utilizan indistintamente e incluyen cualquier animal, incluidos mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado, ovejas, caballos o primates, y más preferiblemente humanos. Los compuestos de la presente divulgación se pueden administrar a un mamífero, tal como un ser humano, pero también se pueden administrar a otros mamíferos tales como un animal que necesita tratamiento veterinario, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas y similares).

“Modulación” incluye antagonismo (por ejemplo, inhibición), agonismo, antagonismo parcial y/o agonismo parcial.

[0051] El término "tratar" incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminuir, reducir, modular, mejorar o eliminar, que tenga como resultado la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares.

5 **[0052]** En la presente memoria descriptiva, los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significan la cantidad del compuesto en cuestión que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o animal (por ejemplo, mamífero o humano) que busca el investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico. Los compuestos de la presente divulgación se administran en cantidades terapéuticamente eficaces para tratar una enfermedad. Alternativamente, una cantidad
10 terapéuticamente eficaz de un compuesto es la cantidad requerida para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, como una cantidad que resulta en reducción de peso.

[0053] El término “sales farmacéuticamente aceptables” como se utiliza en este documento se refiere a sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en los compuestos utilizados en las composiciones. Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza básica
15 son capaces de formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que pueden usarse para preparar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, lo que incluye, pero no se limita a, sales de malato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato,
20 acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-*bis*-(2-hidroxi-3-naftoato)). Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza ácida son capaces de formar sales básicas con varios cationes farmacológicamente
25 aceptables. Entre los ejemplos de dichas sales se incluyen las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, en particular, las sales de calcio, magnesio, sodio, litio, zinc, potasio y hierro. Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que incluyen una fracción básica o ácida también pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con varios aminoácidos. Los compuestos de la divulgación pueden contener grupos tanto ácidos como básicos; por ejemplo, un grupo amino y un grupo
30 ácido carboxílico. En tal caso, el compuesto puede existir como una sal de adición de ácido, un zwitterión o una sal básica.

[0054] Como lo entenderá el experto en la técnica, “H” es el símbolo del hidrógeno, “N” es el símbolo del nitrógeno, “S” es el símbolo del azufre, “O” es el símbolo del oxígeno. “Me” es una abreviatura de metilo. Se apreciará que la presente divulgación debe interpretarse en congruencia con las leyes y

principios del enlace químico.

[0055] Los compuestos de la divulgación pueden contener uno o más centros quirales y, por lo tanto, existir como estereoisómeros. El término “estereoisómeros” cuando se utiliza aquí consiste en todos los enantiómeros o diastereómeros. Estos compuestos pueden designarse con los símbolos “(+)”, “(-)”, “R” o “S”, dependiendo de la configuración de los sustituyentes alrededor del átomo de carbono estereogénico, pero el experto reconocerá que una estructura puede denotar un centro quiral implícitamente. La presente divulgación abarca varios estereoisómeros de estos compuestos y mezclas de estos. Las mezclas de enantiómeros o diastereómeros pueden designarse “(±)” en la nomenclatura, pero el experto reconocerá que una estructura puede denotar un centro quiral implícitamente.

[0056] Los compuestos de la divulgación pueden contener uno o más enlaces dobles y, por lo tanto, existir como isómeros geométricos resultantes de la disposición de sustituyentes alrededor de un enlace doble carbono-carbono. El símbolo = denota un enlace que puede ser simple, doble o triple como se describe aquí. Los sustituyentes alrededor de un enlace doble carbono-carbono se designan como en configuración “Z” o “E”, en donde los términos “Z” y “E” se utilizan de acuerdo con los estándares de la IUPAC. A menos que se especifique lo contrario, las estructuras que representan enlaces dobles abarcan los isómeros “E” y “Z”. Los sustituyentes alrededor de un enlace doble carbono-carbono pueden denominarse alternativamente “cis” o “trans”, donde “cis” representa sustituyentes en el mismo lado del enlace doble y “trans” representa sustituyentes en lados opuestos del enlace doble.

[0057] Los compuestos de la divulgación pueden contener un anillo carbocíclico o heterocíclico y, por lo tanto, existir como isómeros geométricos resultantes de la disposición de sustituyentes alrededor del anillo. La disposición de los sustituyentes alrededor de un anillo carbocíclico o heterocíclico se designa como en configuración “Z” o “E”, en donde los términos “Z” y “E” se utilizan de acuerdo con los estándares de la IUPAC. A menos que se especifique lo contrario, las estructuras que representan anillos carbocíclicos o heterocíclicos abarcan los isómeros “Z” y “E”. Se puede hacer referencia a los sustituyentes alrededor de un anillo carbocíclico o heterocíclico como “cis” o “trans”, donde el término “cis” representa sustituyentes en el mismo lado del plano del anillo y el término “trans” representa sustituyentes en lados opuestos del plano del anillo. Las mezclas de compuestos en los que los sustituyentes están dispuestos tanto en el mismo lado como en lados opuestos del plano del anillo pueden denominarse “cis/trans”.

[0058] Los enantiómeros y diastereómeros individuales de los compuestos de la presente divulgación pueden prepararse sintéticamente a partir de materiales de partida disponibles comercialmente que contienen centros asimétricos o estereogénicos, o mediante la preparación de mezclas racémicas seguida de métodos de resolución bien conocidos por los expertos en la materia. Estos métodos de resolución se ejemplifican mediante (1) la unión de una mezcla de enantiómeros a un auxiliar quiral, la

separación de la mezcla resultante de diastereómeros mediante recristalización o cromatografía y la liberación del producto ópticamente puro del auxiliar, (2) la formación de sales empleando un agente de resolución ópticamente activo, (3) la separación directa de la mezcla de enantiómeros ópticos en columnas de cromatografía líquida quirales o (4) la resolución cinética utilizando reactivos químicos o enzimáticos estereoselectivos. Las mezclas racémicas también pueden resolverse en sus enantiómeros componentes mediante métodos bien conocidos, como la cromatografía líquida en fase quiral o la cristalización del compuesto en un disolvente quiral. Las síntesis estereoselectivas, una reacción química o enzimática en la que un único reactivo forma una mezcla desigual de estereoisómeros durante la creación de un nuevo estereocentro o la transformación de uno preexistente, son bien conocidas en la técnica. Las síntesis estereoselectivas abarcan transformaciones enantio- y diastereoselectivas y pueden implicar el uso de auxiliares quirales. Para ver ejemplos, consulte Carreira y Kvaerno, *Classics in Stereoselective Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

[0059] Los compuestos divulgados en este documento pueden existir en formas solvatadas y no solvatadas con solventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares, y se pretende que la presente divulgación abarque tanto las formas solvatadas como las no solvatadas. En una realización, el compuesto es amorfo. En una realización, el compuesto es un polimorfo único. En otra realización, el compuesto es una mezcla de polimorfos. En otra realización, el compuesto está en forma cristalina.

[0060] La presente divulgación también abarca compuestos marcados isotópicamente de la divulgación que son idénticos a los aquí citados, excepto que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masa que se encuentra habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la presente divulgación incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Por ejemplo, un compuesto de la divulgación puede tener uno o más átomos de H reemplazados con deuterio.

[0061] Ciertos compuestos marcados isotópicamente (por ejemplo, aquellos marcados con ^3H y ^{14}C) son útiles en ensayos de distribución de tejidos de compuestos y/o sustratos. Los isótopos tritiados (es decir, ^3H) y de carbono-14 (es decir, ^{14}C) son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados como el deuterio (es decir, ^2H) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica (por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o menores requisitos de dosis) y, por lo tanto, puede ser preferida en algunas circunstancias. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente divulgación generalmente se pueden preparar siguiendo procedimientos análogos a los divulgados en los ejemplos aquí presentados,

mediante la sustitución de un reactivo marcado isotópicamente por un reactivo no marcado isotópicamente.

[0062] El término “profármaco” se refiere a compuestos que se transforman *in vivo* para producir un compuesto descrito o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto. La transformación puede ocurrir por diversos mecanismos (como por esterasa, amidasa, fosfatasa, metabolismo oxidativo o reductivo) en varios lugares (como en la luz intestinal o durante el tránsito por el intestino, la sangre o el hígado). Los profármacos son conocidos en la técnica (por ejemplo, ver Rautio, Kumpulainen, et ál, Nature Reviews Drug Discovery 2008, 7, 255). Por ejemplo, si un compuesto de la presente divulgación o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto contiene un grupo funcional de ácido carboxílico, un profármaco puede comprender un éster formado por la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo ácido con un grupo tal como alquilo (C_{1-8}), alquilcarboniloximetilo (C_{2-12}), 1-(alquilcarboniloxi)etilo que tiene de 4 a 9 átomos de carbono, 1-metil-1-(alquilcarboniloxi)-etilo que tiene de 5 a 10 átomos de carbono, alcóxicarboniloximetilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, 1-(alcóxicarboniloxi)etilo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcóxicarboniloxi)etilo que tiene de 5 a 8 átomos de carbono, N-(alcóxicarbonil)aminometilo que tiene de 3 a 9 átomos de carbono, 1-(N-(alcóxicarbonil)amino)etilo que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, 3-ftalidilo, 4-crotonolactonilo, gamma-butirolacton-4-ilo, di-N,N-(C_{1-2})alquilamino(C_{2-3})alquilo (como β -dimetilaminoetilo), carbamoil-(C_{1-2})alquilo, N,N-di(C_{1-2})alquilcarbamoil-(C_{1-2})alquilo y piperidino-, pirrolidino- o morfolinoalquilo(C_{2-3}).

[0063] De manera similar, si un compuesto descrito contiene un grupo funcional alcohol, se puede formar un profármaco mediante la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo alcohol por un grupo como alquil(C_{1-6})carboniloximetilo, 1-((C_{1-6})alquilcarboniloxi)etilo, 1-metil-1-((C_{1-6})alquilcarboniloxi)etilo, alcóxi(C_{1-6})carboniloximetilo, N-alcóxi(C_{1-6})carbonilaminometilo, succinoílo, alquil(C_{1-6})carbonilo, α -amino(C_{1-4})alquilcarbonilo, arilalquilcarbonilo y α -aminoalquilcarbonilo, o α -aminoalquilcarbonil- α -aminoalquilcarbonilo, donde cada grupo α -aminoalquilcarbonilo se selecciona independientemente de los L-aminoácidos naturales, $P(O)(OH)_2$, $-P(O)(O(alquiloC_{1-6}))_2$ o glicosilo (el radical resultante de la eliminación de un grupo hidroxilo de la forma hemiacetal de un carbohidrato).

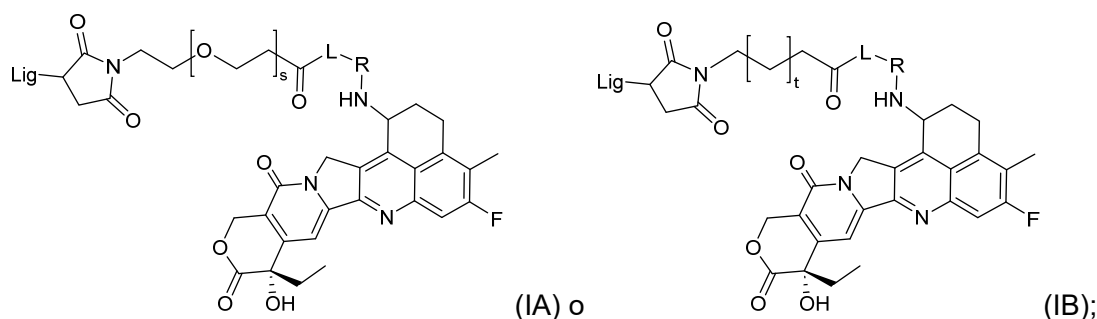
[0064] Si un compuesto de la presente divulgación incorpora un grupo funcional amina, se puede formar un profármaco, por ejemplo, mediante la creación de una amida o carbamato, un derivado de N-alquilcarboniloxialquilo, un derivado de (oxodioxolenil)metilo, una base de N-Mannich, imina o enamina. Además, una amina secundaria puede escindirse metabólicamente para generar una amina primaria bioactiva, o una amina terciaria puede escindirse metabólicamente para generar una amina primaria o secundaria bioactiva. Para ver ejemplos, véase Simplício, et ál., *Molecules* 2008, 13, 519 y referencias allí citadas.

[0065] Los procedimientos para la elaboración de los compuestos descritos en este documento se proporcionan a continuación en los ejemplos prácticos y pueden complementarse o sustituirse por procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los materiales de partida utilizados en los ejemplos prácticos pueden adquirirse o prepararse mediante métodos descritos en la bibliografía química, o mediante adaptaciones de estos, utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia. El orden de ejecución de los pasos puede variar en función de los grupos introducidos y los reactivos utilizados, pero resultará evidente para los expertos en la materia. Los compuestos descritos, o cualquiera de los intermedios descritos en este documento, pueden derivarse adicionalmente mediante uno o más métodos sintéticos estándar conocidos por los expertos en la materia.

[0066] Las sales de los compuestos descritos en este documento se pueden preparar mediante la reacción de un compuesto descrito en este documento con un ácido o base apropiados en un disolvente adecuado, o una mezcla de disolventes (tales como un éter, por ejemplo, éter dietílico, o un alcohol, por ejemplo etanol, o un disolvente acuoso) utilizando procedimientos convencionales. Las sales de un compuesto descrito en este documento se pueden intercambiar por otras sales mediante tratamiento utilizando procedimientos de cromatografía de intercambio iónico convencionales.

Compuestos

[0067] Por ejemplo, se describe en el presente documento un conjugado de fármaco representado por la Fórmula IA o la Fórmula IB:



o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

Lig es una fracción objetivo;

L es una fracción enlazadora;

R se selecciona del grupo que consiste en -R¹, -C(O)-R¹-, -C(O)-O-R¹-, -C(O)-NH-R¹-, -C(O)-alquilo C₀₋₃-C(O)-NH-R¹-, -C(O)-(heteroarilo de 5-6 miembros)-R¹-, -CH₂-(heteroarilo de 5-6 miembros)-R¹-, -C(O)-(heterociclilo de 4-6 miembros)-, -C(O)-(heterociclilo de 4-6 miembros)-C(O)-R¹-, -C(O)-(heterociclilo de 4-6 miembros)-NH-R¹-, -C(O)-cicloalquilo C₃₋₄-R¹-, -C(S)-cicloalquilo C₃₋₄-R¹- y -C(O)-O-fenilo-R¹-; en donde se puede sustituir opcionalmente cualquier heteroarilo, heterociclilo, alquilo y cicloalquilo antemencionado sustituidos con uno, dos o tres sustituyentes, cada uno seleccionado

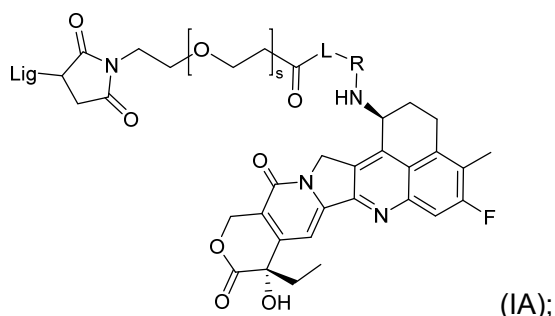
independientemente del grupo que consiste en halógeno, hidroxilo y oxo;

R^1 se selecciona del grupo que consiste en $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O-}$, $\text{-CH}_2\text{-O-}$, -NH- , $\text{-CH}_2\text{ONH-}$ y $\text{-CH(CH}_3\text{)-NH-}$; y

s es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

5 t es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

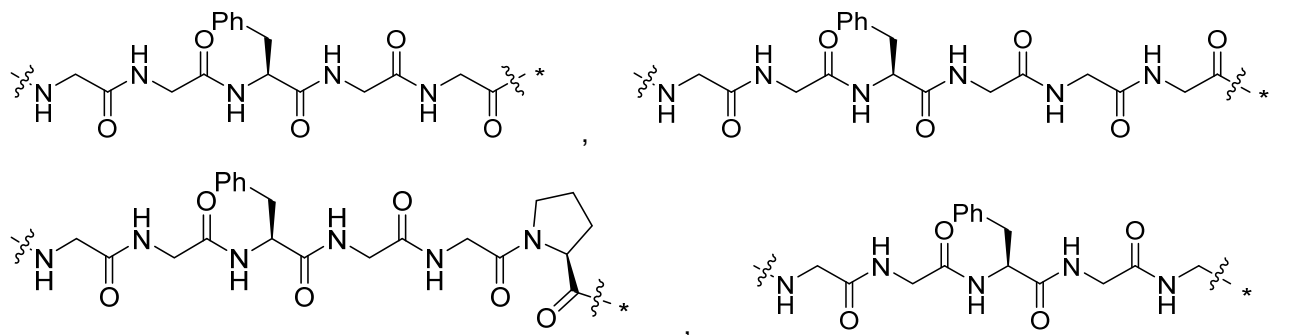
[0068] En algunas realizaciones, un conjugado farmacológico descrito de Fórmula I puede estar representado por la Fórmula IA:

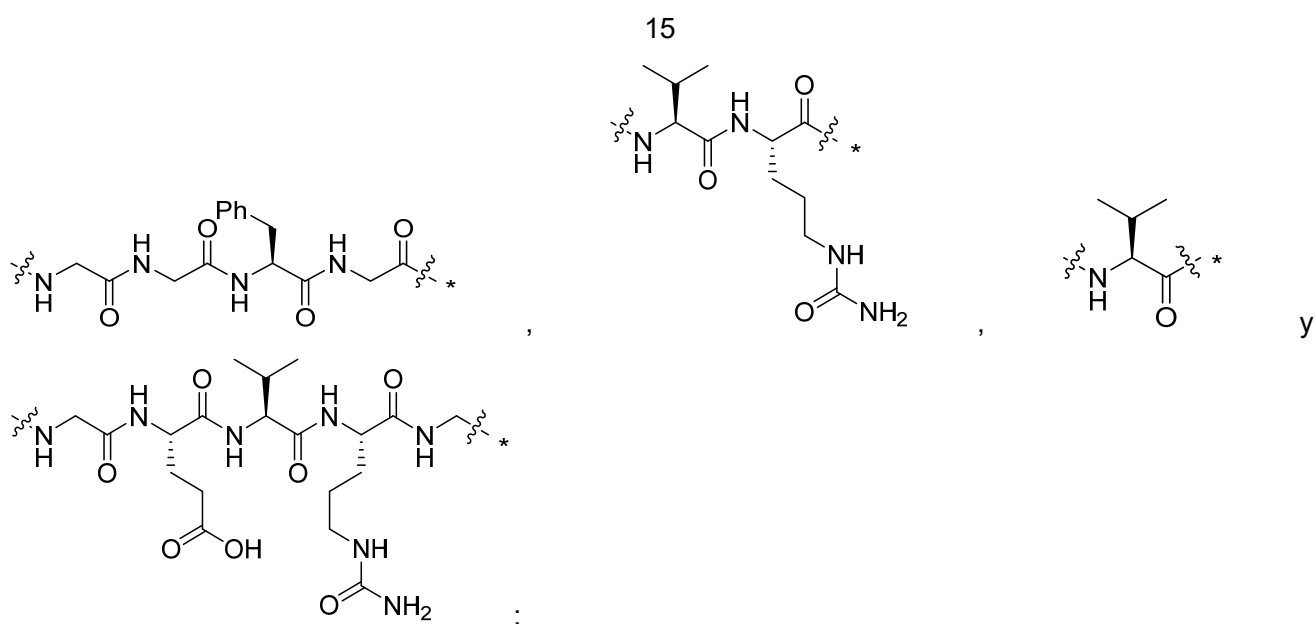


10 o una sal, un profármaco o un estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este; en donde s es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

[0069] En algunas realizaciones, Lig es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, Lig se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-EGRF, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-B7-H3, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33 y un anticuerpo anti-CD70. En otras realizaciones, Lig se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-EGRF y un anticuerpo anti-HER2. En ciertas realizaciones, Lig es un anticuerpo anti-TROP2. En ciertas otras realizaciones, Lig es un anticuerpo anti-EGRF. En otras realizaciones más, Lig es un anticuerpo anti-HER2. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, Lig puede seleccionarse de un anticuerpo descrito en la Tabla 4. En otras realizaciones, s es 1 u 8. Por ejemplo, en algunas realizaciones, s es 1.

[0070] En algunas realizaciones, L se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en:





en donde * indica el punto de unión a R.

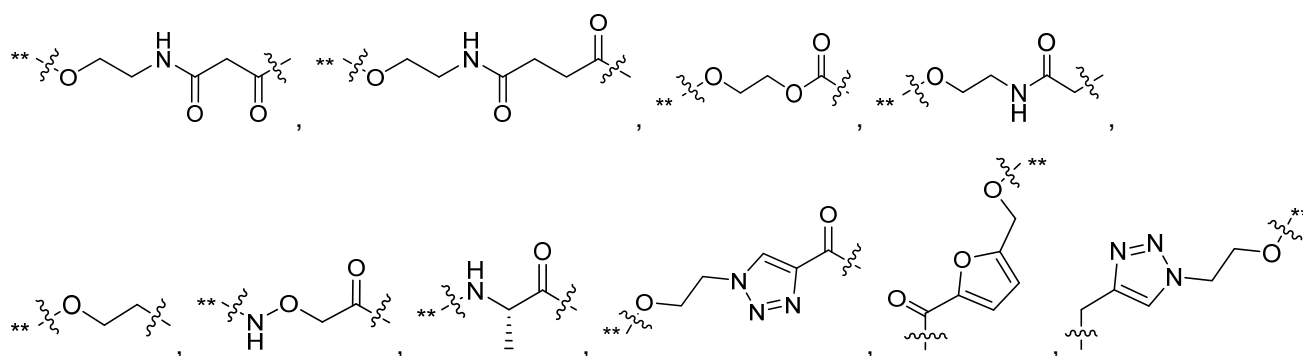
[0071] En otras realizaciones, R se selecciona del grupo que consiste en $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2\text{ONH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{alquil } \text{C}_1-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{alquil } \text{C}_3-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ y $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-$.

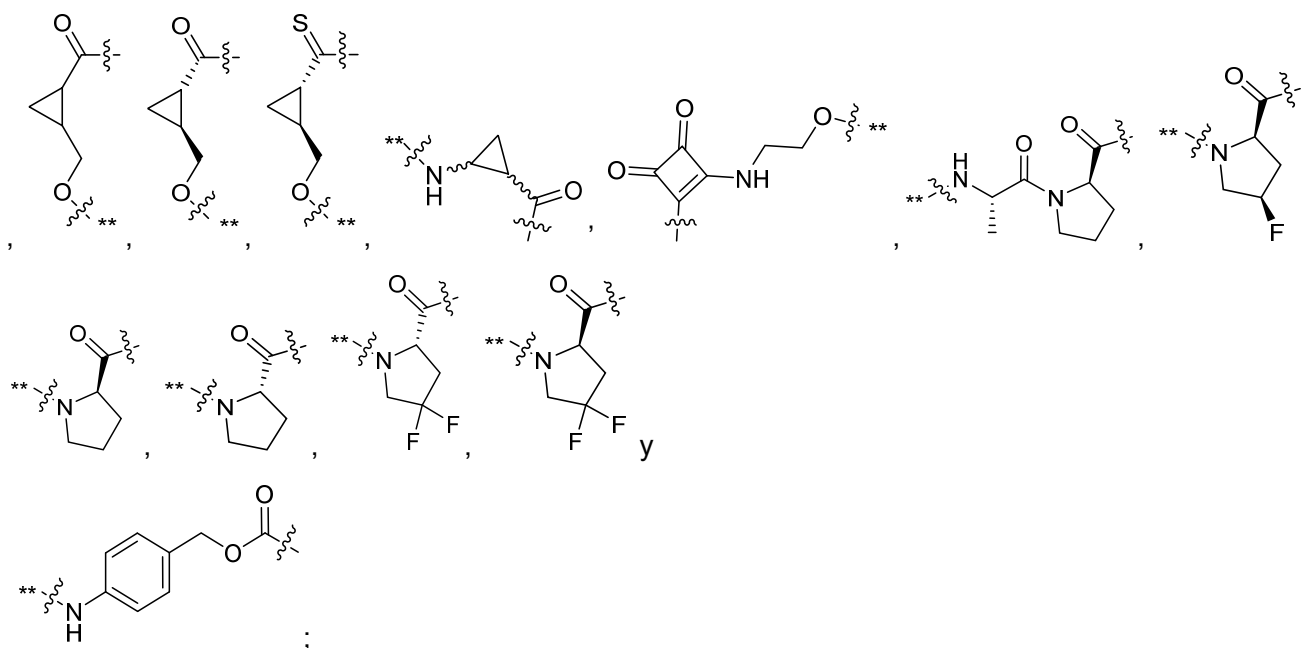
[0072] En otras realizaciones más, R se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(\text{O})-\text{triazolil}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{triazolil}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ y $-\text{C}(\text{O})-\text{furanil}-\text{CH}_2\text{O}-$.

[0073] En otras realizaciones, R se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(\text{O})-\text{cicloalquilo } \text{C}_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{C}(\text{S})-\text{cicloalquilo } \text{C}_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{cicloalquilo } \text{C}_3-\text{NH}-$ y $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{fenil}-\text{NH}-$.

[0074] En ciertas realizaciones, R se selecciona del grupo que consiste en $-\text{C}(\text{O})-\text{pirrolidinilo}-$ y $-\text{C}(\text{O})-\text{pirrolidinil}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-$, donde el pirrolidinilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o dos átomos de flúor.

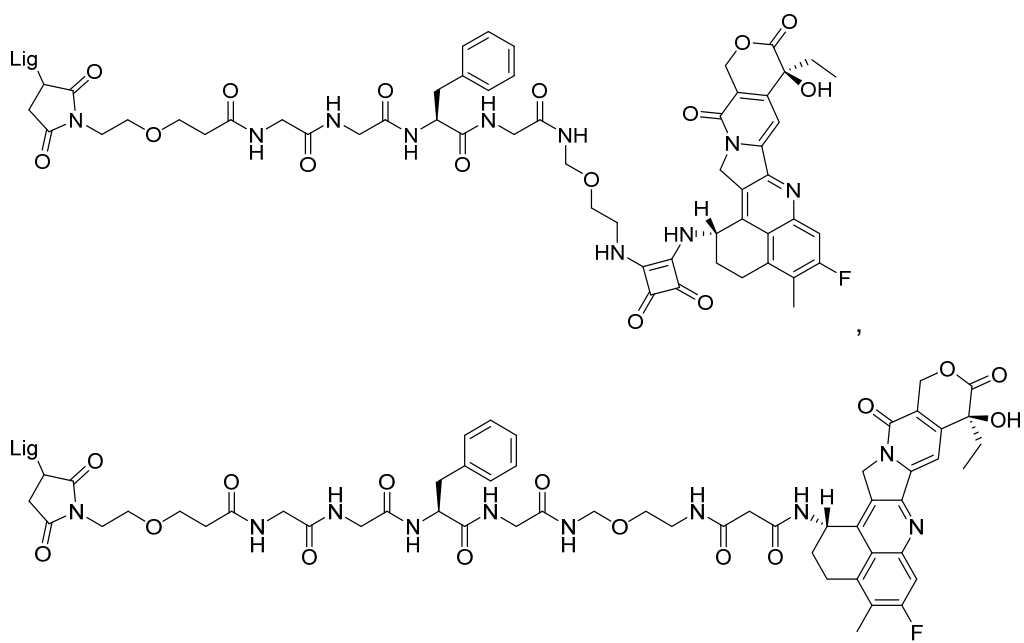
[0075] Por ejemplo, en algunas realizaciones, R se selecciona del grupo que consiste en

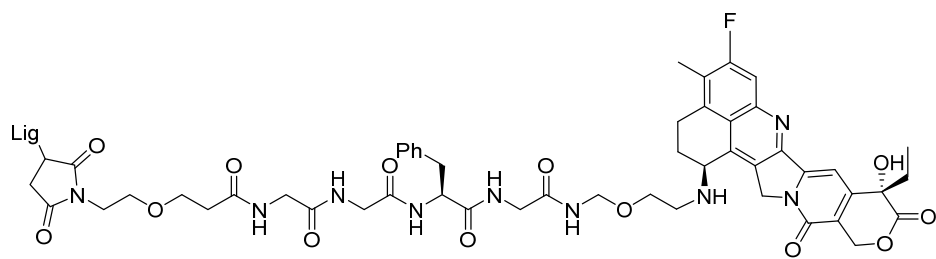
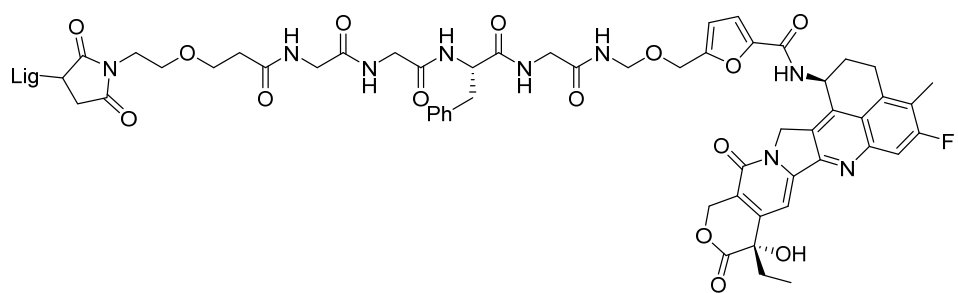
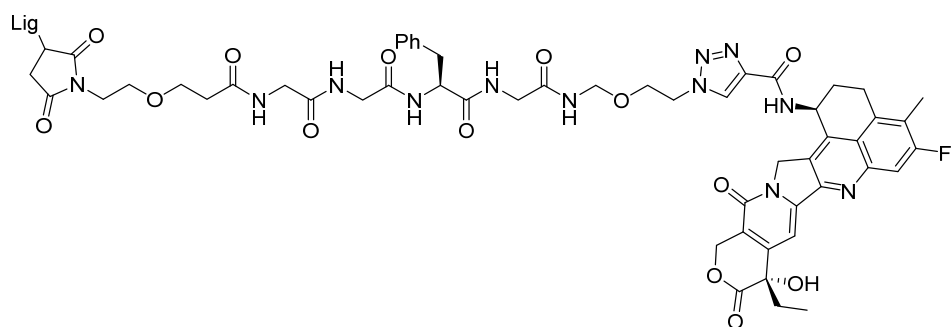
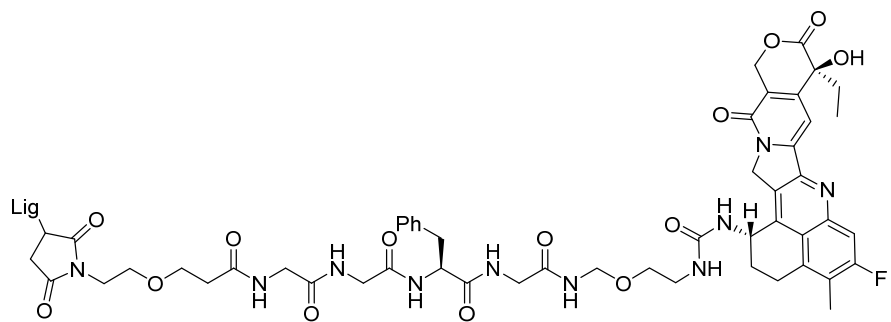
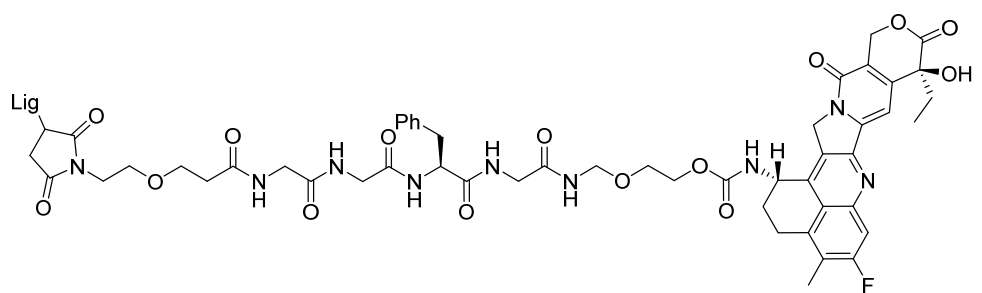


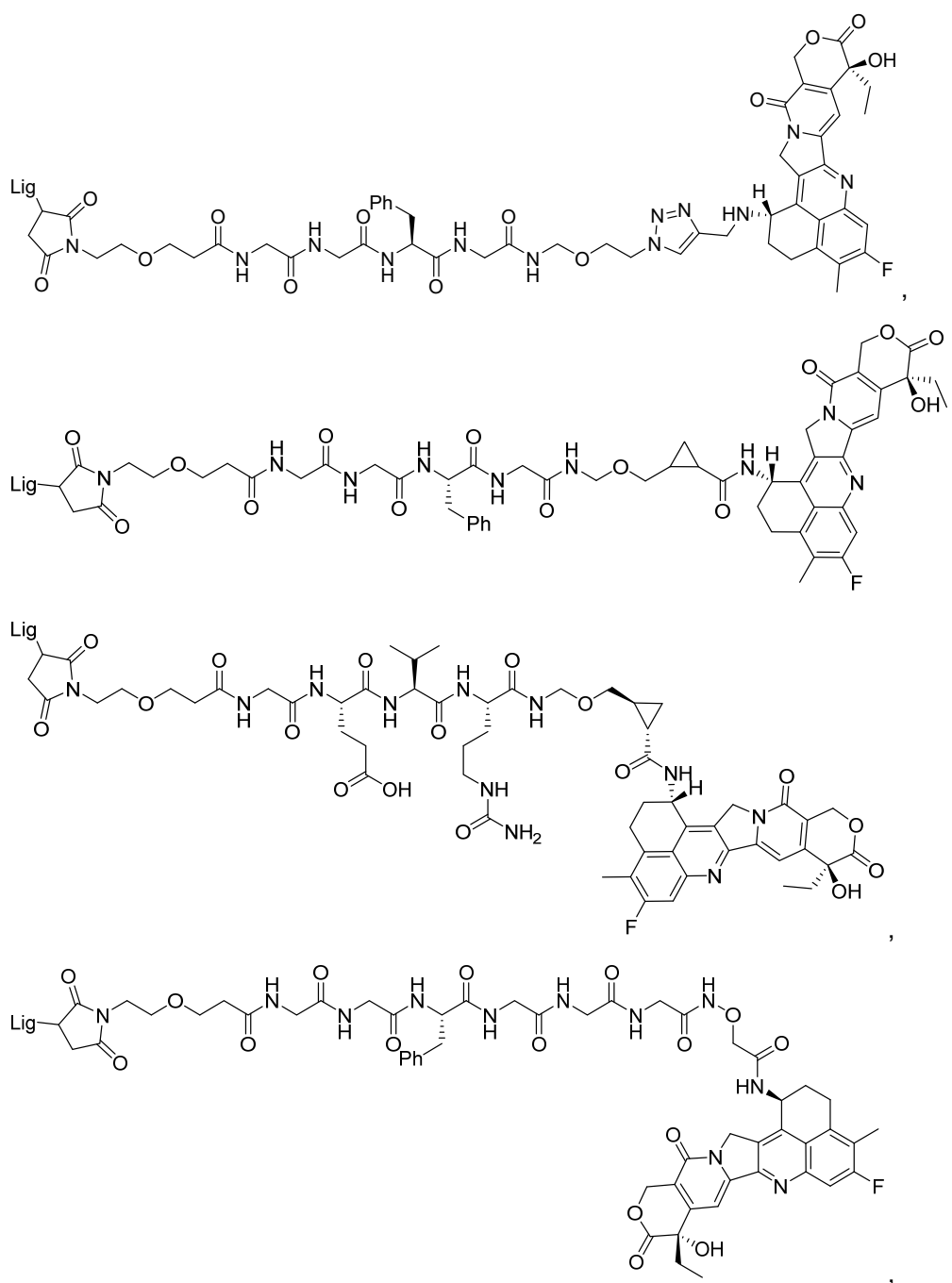


en donde ** indica el punto de unión a L.

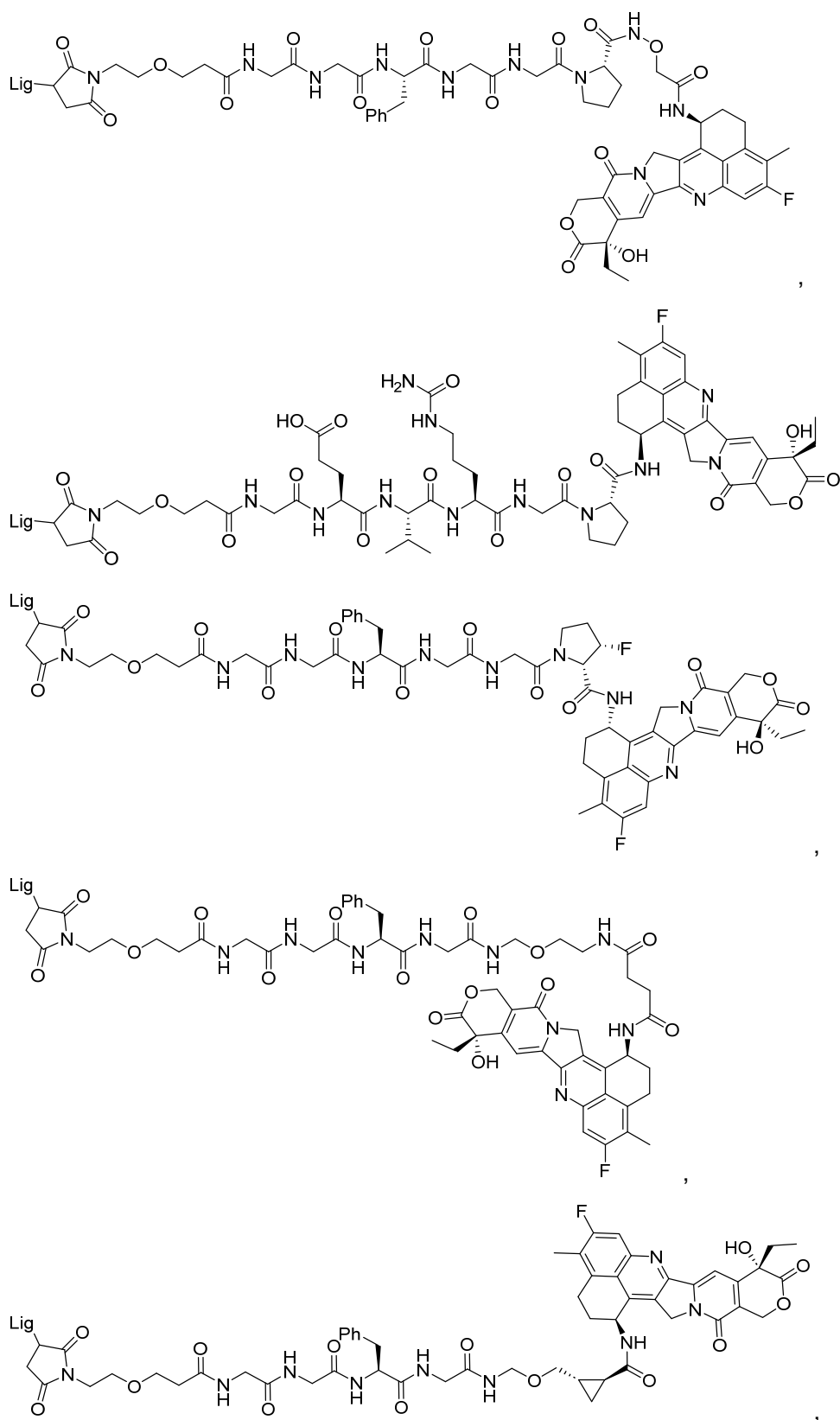
- 5 **[0076]** Por ejemplo, en algunas realizaciones, un conjugado de fármaco descrito puede seleccionarse del grupo que consiste en



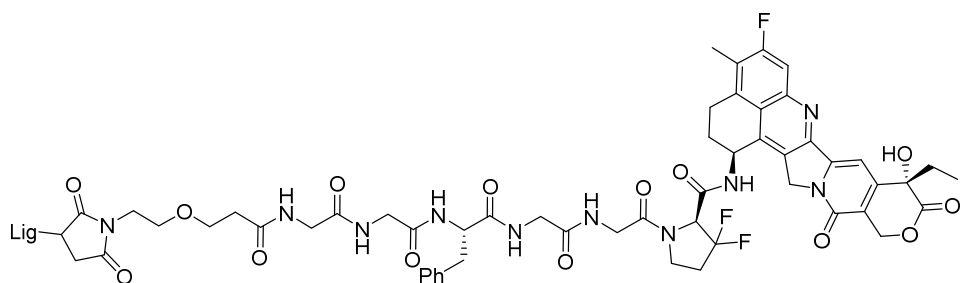
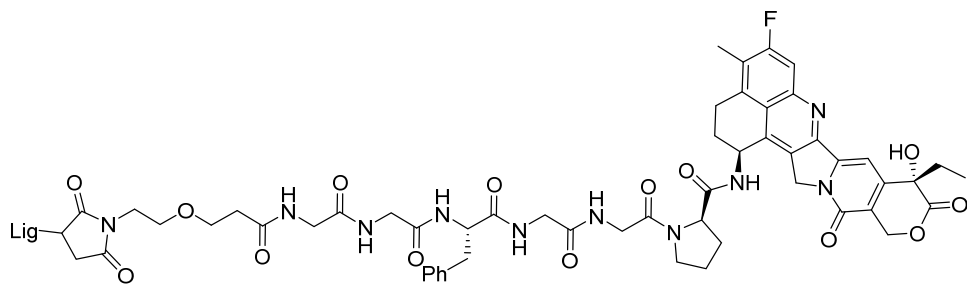
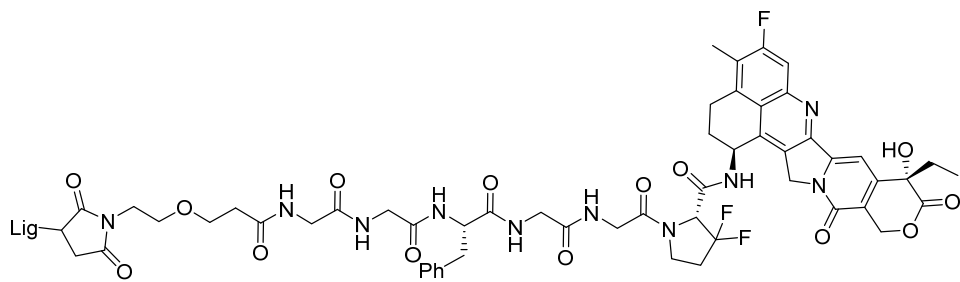
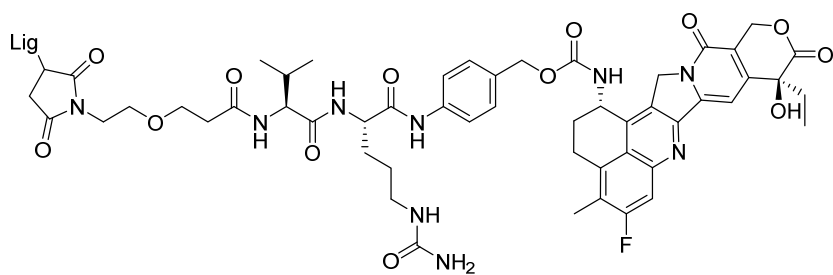
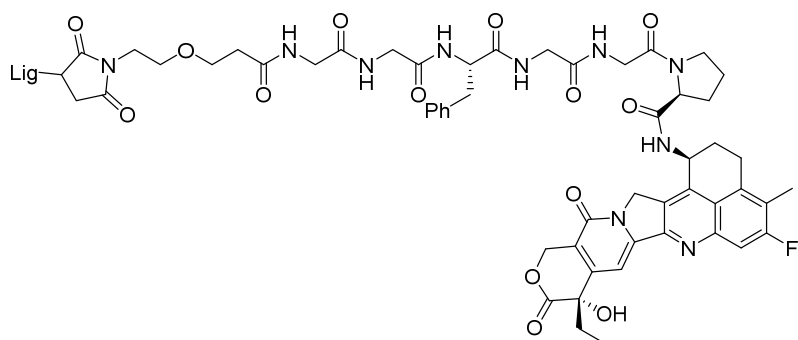




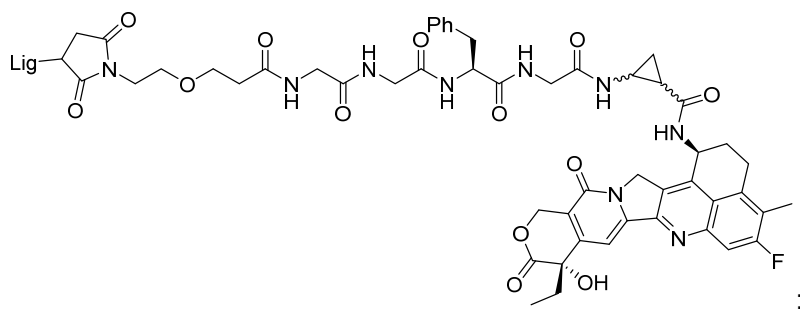
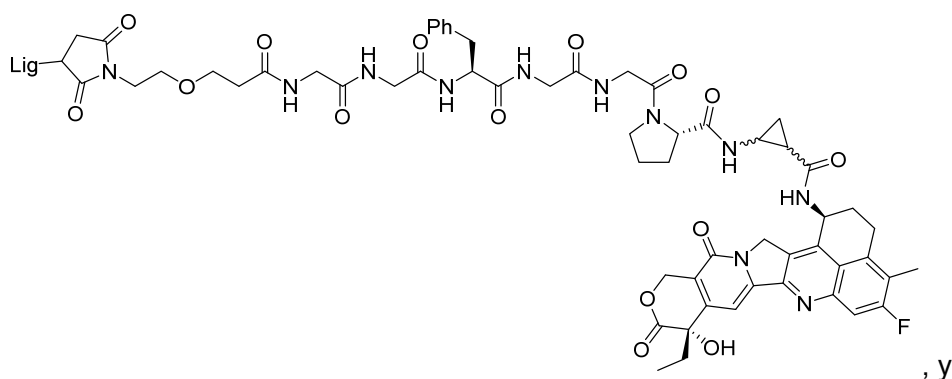
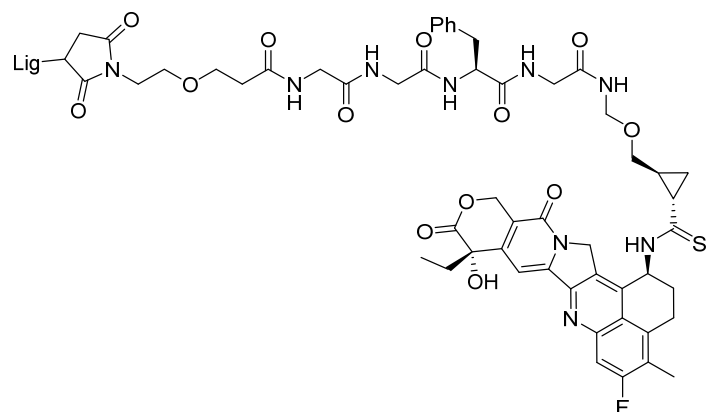
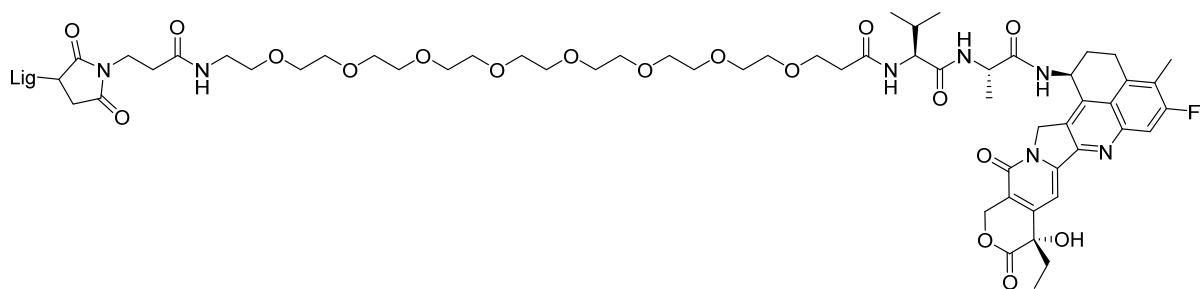
19



20



21



- 5 o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este.
 en donde Lig se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-HER2.

[0077] En ciertas realizaciones, Lig es un anticuerpo anti-TROP2. En ciertas otras realizaciones, Lig es

un anticuerpo anti-EGFR, por ejemplo, Panitumumab, Nimotuzumab, Matuzumab o Cetuximab. En otras realizaciones más, Lig es un anticuerpo anti-HER2. En otras realizaciones, s es 1 u 8. Por ejemplo, en algunas realizaciones, s es 1.

[0078] Por ejemplo, los conjugados de fármacos contemplados en la presente divulgación se proporcionan en las Tablas 1-3.

5

Tabla 1. Conjugados de fármacos y anticuerpos anti-HER 2

Compuesto N.º	Objetivo
3001	HER2
3002	HER2
3003	HER2
3004	HER2
3005	HER2
3006	HER2
3007	HER2
3008	HER2
3009	HER2
3010	HER2
3011	HER2
3012	HER2
3013	HER2
3014	HER2
3015	HER2
3016	HER2
3017	HER2
3018	HER2
3019	HER2
3020	HER2
3021	HER2
3022	HER2
3023	HER2
3024	HER2

3025	HER2
3026	HER2
3100	HER2

Tabla 2. Conjugados de fármacos y anticuerpos anti-TROP2

Compuesto N.º	Objetivo
3027	TROP2
3028A	TROP2
3028B	TROP2
3029A	TROP2
3029B	TROP2
3030	TROP2
3031	TROP2
3032	TROP2
3033	TROP2
3034	TROP2
3035	TROP2
3036	TROP2
3037	TROP2
3038	TROP2
3039	TROP2
3040	TROP2
3041	TROP2
3042	TROP2
3043	TROP2
3044	TROP2
3045	TROP2
3046	TROP2
3047	TROP2
3048	TROP2

3101	TROP2
------	-------

Tabla 3. Conjugados de fármacos y anticuerpos anti-EGFR

[0079] Para los compuestos 3049-3107, se utilizó IgG1 anti-EGFR **1**; para el compuesto 3108, se utilizó IgG1 anti-EGFR **2**; para los compuestos 3109-3110, se utilizó IgG1 anti-EGFR **3**; para los compuestos 3111-3112, se utilizó IgG1 anti-EGFR **4** y para el compuesto 3113, se utilizó IgG1 anti-EGFR **5**.

Compuesto N.º	Objetivo
3049	EGFR
3050	EGFR
3051A	EGFR
3051B	EGFR
3052	EGFR
3053A	EGFR
3053B	EGFR
3054	EGFR
3055	EGFR
3056	EGFR
3057	EGFR
3058A	EGFR
3058B	EGFR
3059A	EGFR
3059B	EGFR
3060	EGFR
3061	EGFR
3062A	EGFR
3062B	EGFR
3063	EGFR
3064	EGFR
3065	EGFR
3066	EGFR

3067	EGFR
3068	EGFR
3069	EGFR
3070	EGFR
3102	EGFR
3103	EGFR
3104	EGFR
3105	EGFR
3107	EGFR
3108	EGFR
3109	EGFR
3110	EGFR
3111	EGFR
3112	EGFR
3113	EGFR

[0080] Los objetivos contemplados y los anticuerpos de ejemplo correspondientes de la presente divulgación se proporcionan en la Tabla 4.

Tabla 4

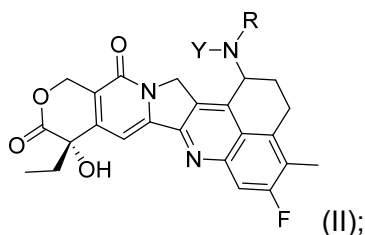
Objetivo	Nombre del anticuerpo
EGFR	Cetuximab
EGFR	Panitumumab
EGFR	RN765C
EGFR	Laprituximab
EGFR	Serclutamab
EGFR	Matuzumab
EGFR	Imgatuzumab
EGFR	Nimotuzumab
EGFRviii	Depatuxizumab
HER2	Trastuzumab
HER2	Pertuzumab

HER2	Disitumab
TROP2	RS7
TROP2	Sacituzumab
TROP2	Datopotomab
TROP2	RN927C
HER3	Patritumab
NECTIN-4	Enfortumab
CD-33	Gemtuzumab
CD-33	Vadastuximab
CD-30	Brentuximab
CD-22	Inotuzumab
CD-22	Pinatuzumab
CD-22	Moxetumomab
CD-22	Epratuzumab
anti-CD79b	Polatuzumab
CD-19	Tafasitamab
Antiangiopoyetina-2; anti-VEGF-A	Vanucizumab
Anti-AFP	Tacatuzumab
FR α	Mirvetuximab
CD-166	Praluzatamab
Mesotelina	Anetumab
CD74	Milatuzumab
CD56	Lorvotuzumab
NaPi2b	Lifastuzumab
STEAP1	Vandortuzumab
LIV-1	Ladiratuzumab
CD74	Milatuzumab
CD56	Lorvotuzumab
GPNMB	Glembatumomab
CD66e (CAECAM5)	Labetuzumab; SAR408701
TF	Tisotumab

DLL3	SC16LD6,5
Mesotelina	Anetumab
CD37	Naratuximab
BCMA	Belantamab
AXL	Enapotamab
CD-20	Ibritumomab
CD-25	Camidanlumab
PTK7	Cofetuzumab
c-Met	Telisotuzumab
CD138	Indatuximab
BH-73 (CD126)	Omburtamab
CD19	SAR3419
CD138	BT-062
PSMA	
SC-16	SC16LD6,5
EGFR	ABT-414
CAIX	BAY 79-4620
ETBR	DEDN6526A (RG7636)
Nectina-4	ASG-22ME (ASG- 22M6E, AGS-22CE)
SLITRK6	ASG15E-13-1, ASG- 15ME
CA6	SAR566658
CD19	SGN-CD19A
CD70	SGN-CD70A
ENPP3	AGS-16M8F
GCC	MLN0264
EGFR	IMGN289, J2898A
EGFRvIII	AMG 595
CD70	AMG 172
5T4	PF-06263507
CD98	IGN523

CD-33	IMGN-633; AVE9633
HER3	Patritumab
Integrina-beta-6	SGN-B6A
STn (antígeno Sialyl-Thomsen nouveau) (CD175)	L2A5; SGN-STVN; 8C2-2D6
PDL1	SGN-PDL1V
B7H4	SGN-B7H4V
B7H4	XMI_1660
B7H4	AZD8205

[0081] También se describe en este documento una carga activa terapéutica representada por la Fórmula II:



5 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

Y es hidrógeno o -alquilo C₁₋₃;

R se selecciona del grupo que consiste en -alquilo C(O)-C₃, -C(O)O-alquilo C₃, -C(O)-cicloalquilo C₃, -C(O)-cicloalquilo C₄, -alquilo C₁, -C(O)-(pirrolidinilo) y -C(O)-CH₂ONH-C(O)-(pirrolidinilo);

en donde:

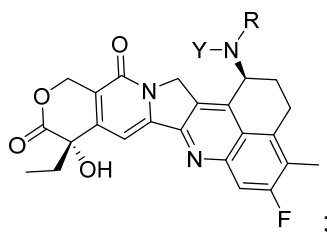
10 -C(O)-alquilo C₃, -C(O)-cicloalquilo C₃, -C(O)O-cicloalquilo C₃, -C(O)-cicloalquilo C₄ o -alquilo C₁ está sustituido por uno o dos sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, -NH₂, -CHO y -COOH;

-C(O)-(pirrolidinilo) y -C(O)-CH₂ONH-C(O)-(pirrolidinilo) pueden estar opcionalmente sustituidos en un átomo de carbono de pirrolidinilo disponible por uno o dos sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en halógeno e hidroxilo, o dos R¹ se unen para formar oxo; y

15 -C(O)-(pirrolidinilo) puede estar opcionalmente sustituido en un átomo de nitrógeno de pirrolidinilo disponible por -CHO, -C(O)CH₃ o -C(O)CH₂NH₂.

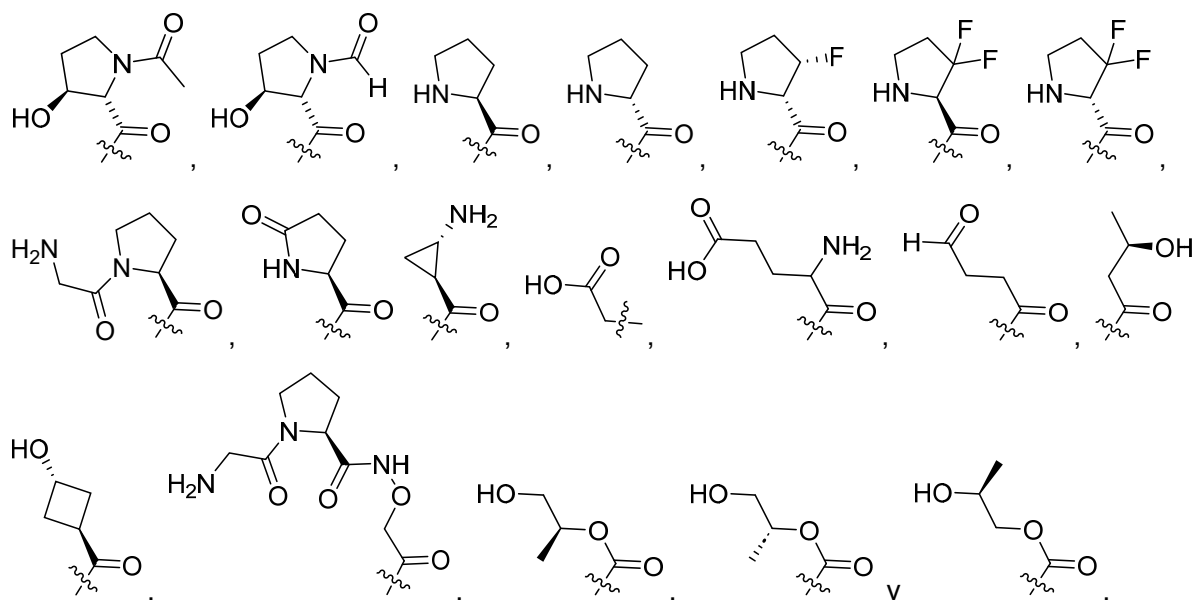
20 **[0082]** En algunas realizaciones, una carga terapéutica divulgada de Fórmula II puede estar

representada por la Fórmula IIA:



o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este.

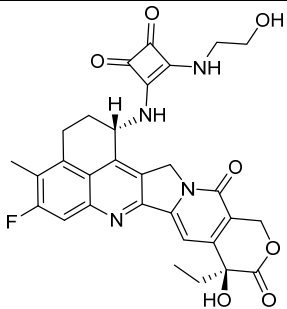
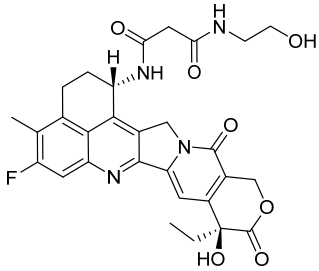
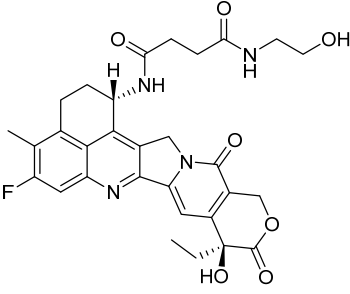
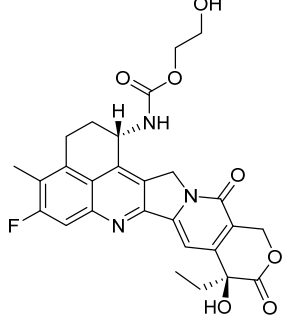
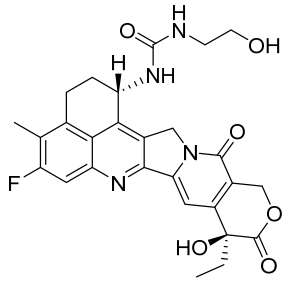
- 5 **[0083]** En algunas realizaciones, Y es hidrógeno. En otras realizaciones, Y es -alquilo C₁₋₃. Por ejemplo, en ciertas realizaciones Y es -CH₃. En algunas realizaciones, R se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en:



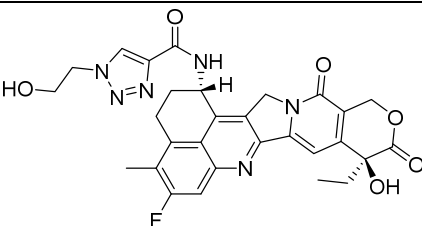
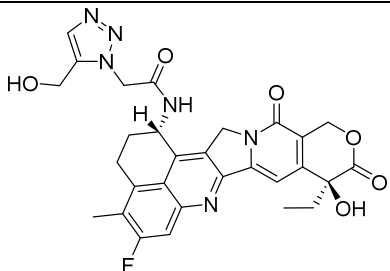
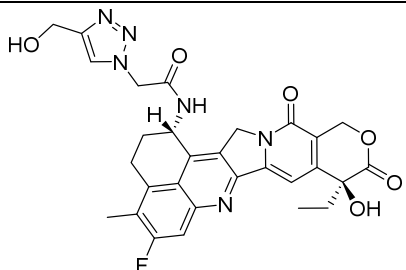
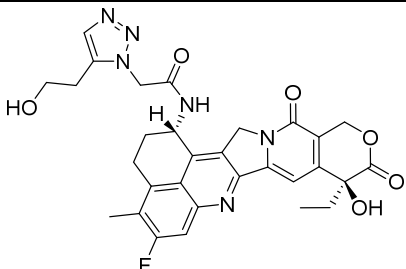
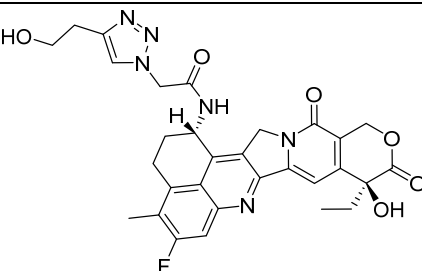
- 10 **[0084]** En algunas realizaciones, una carga terapéutica divulgada puede seleccionarse, por ejemplo, de cualquiera de los compuestos divulgados en la Tabla 5, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este.

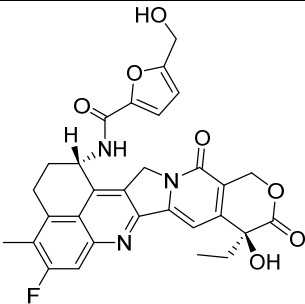
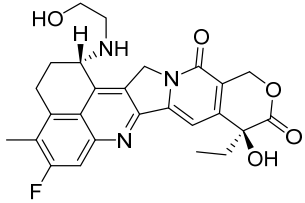
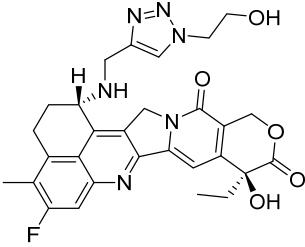
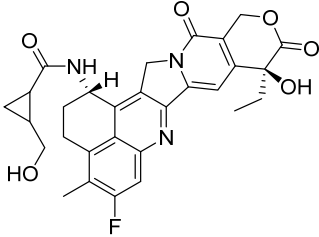
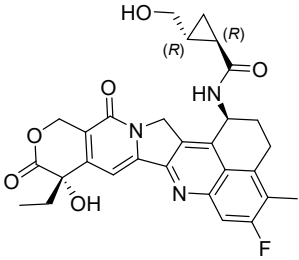
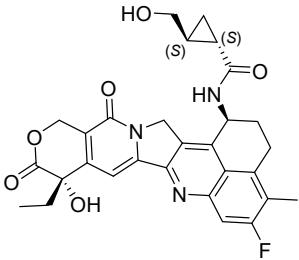
Tabla 5.

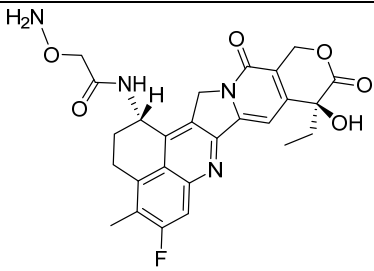
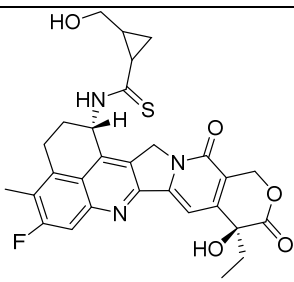
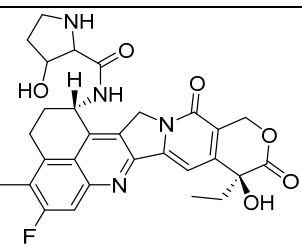
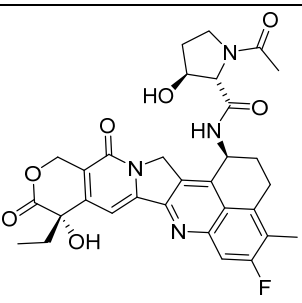
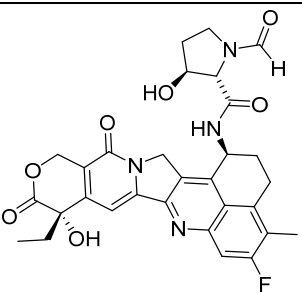
Comp. N.º	Estructura
-----------	------------

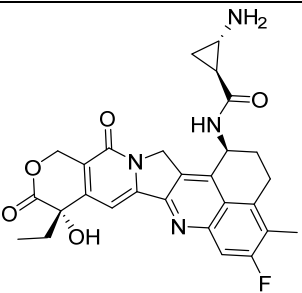
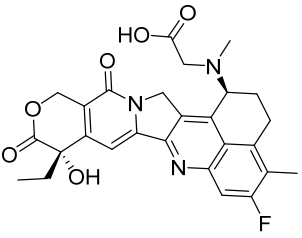
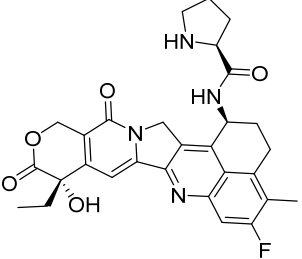
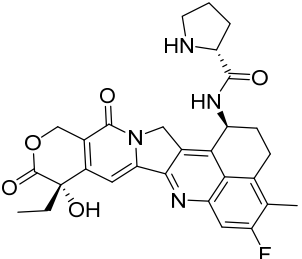
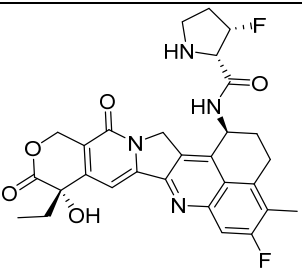
2	
12	
16	
22	
42	

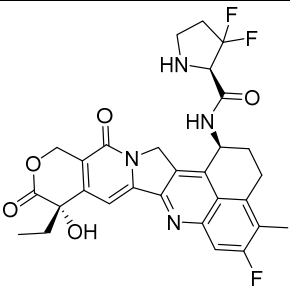
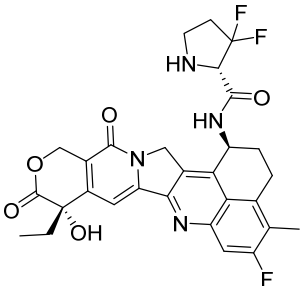
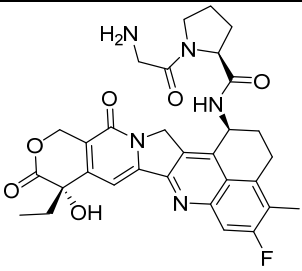
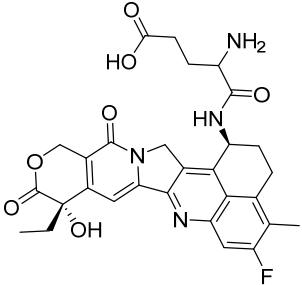
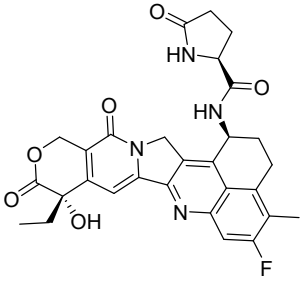
31

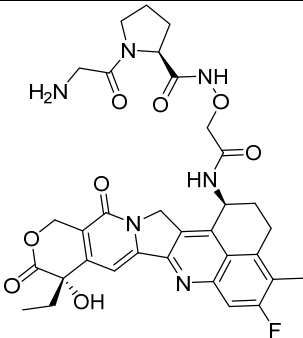
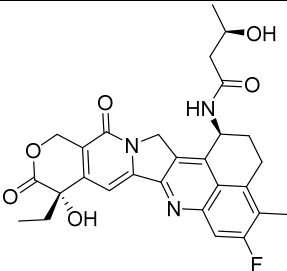
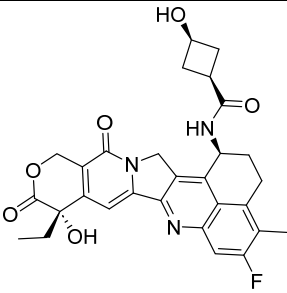
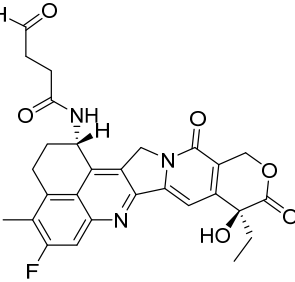
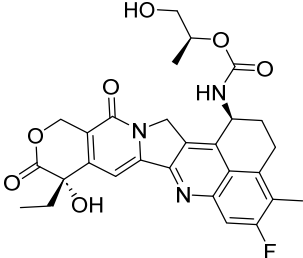
52	
71	
72	
73	
74	

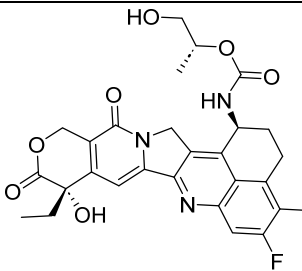
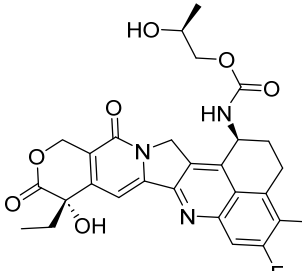
103	
105	
108	
111	
111-A	
111-B	

130	
177	
180	
193	
194	

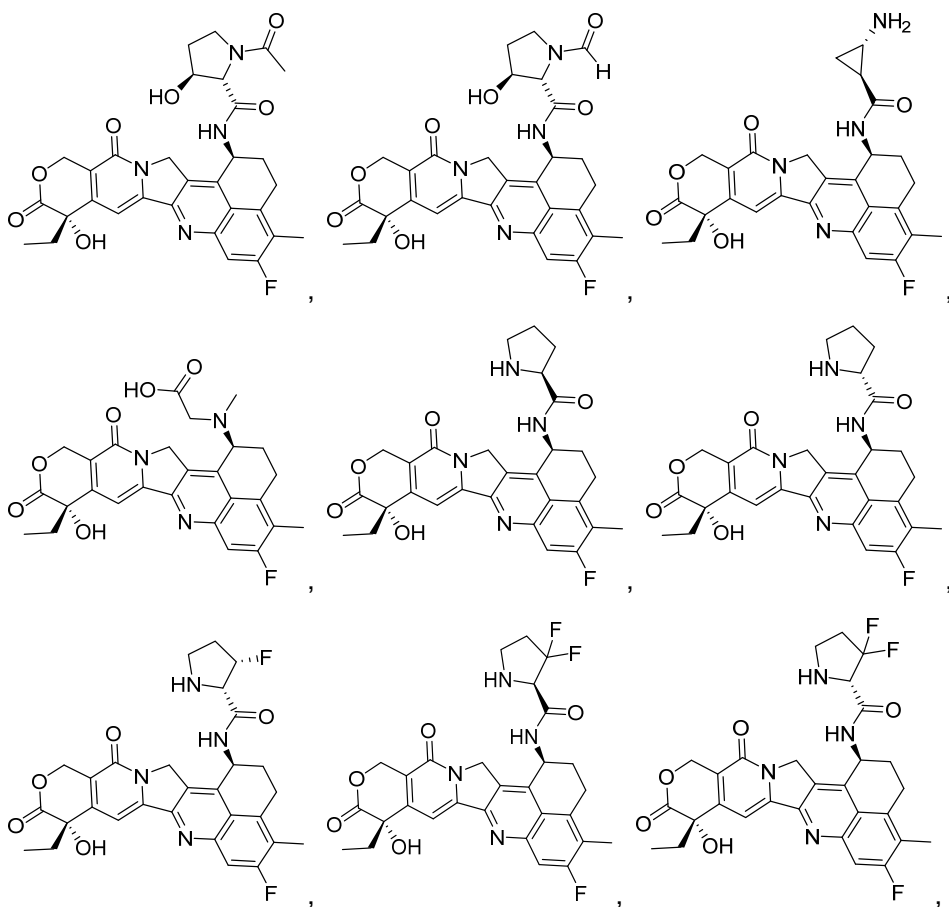
195	
196	
197	
198	
199	

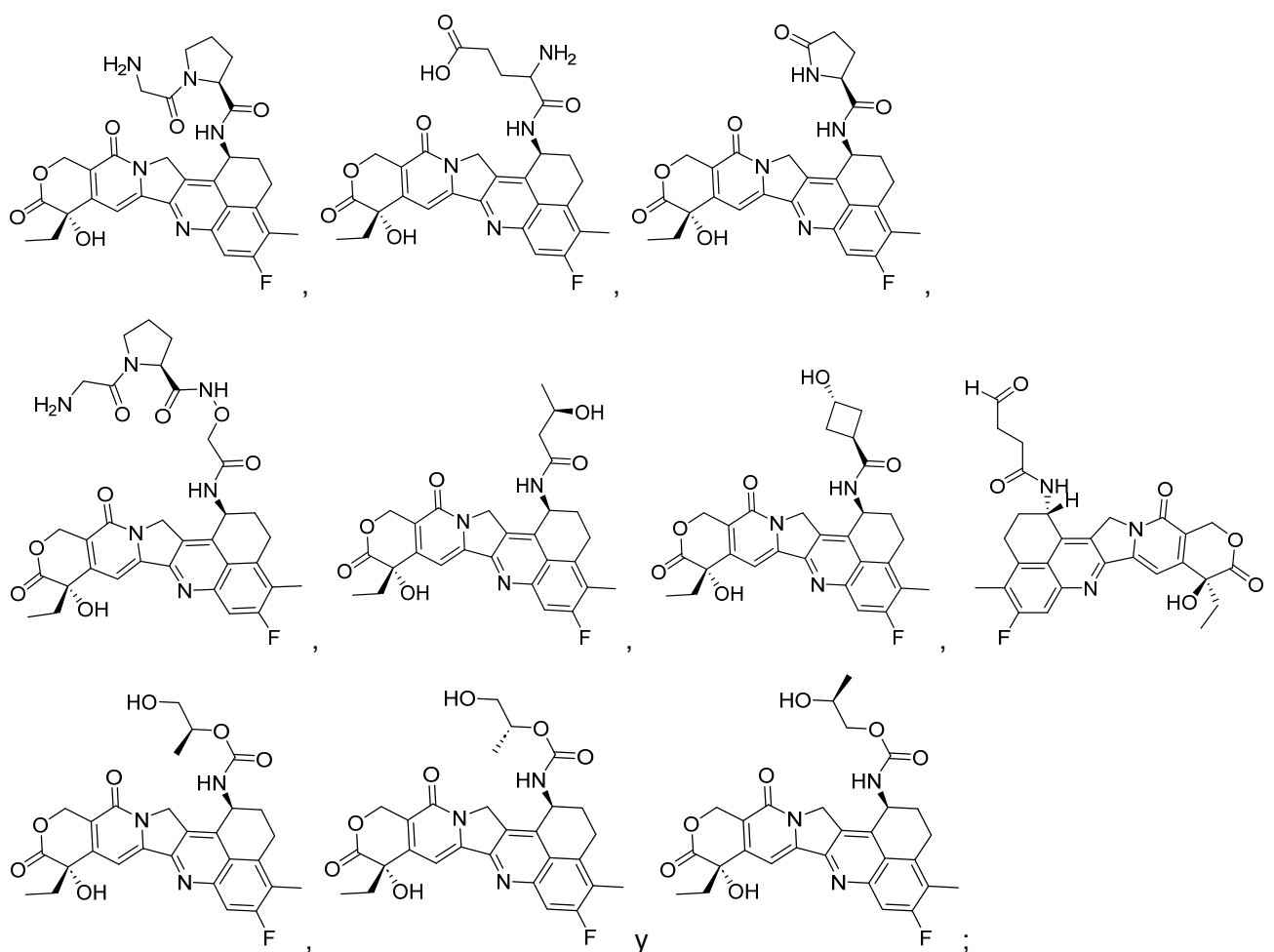
200	
201	
202	
203	
204	

205	
206	
207	
208	
209	

210	
211	

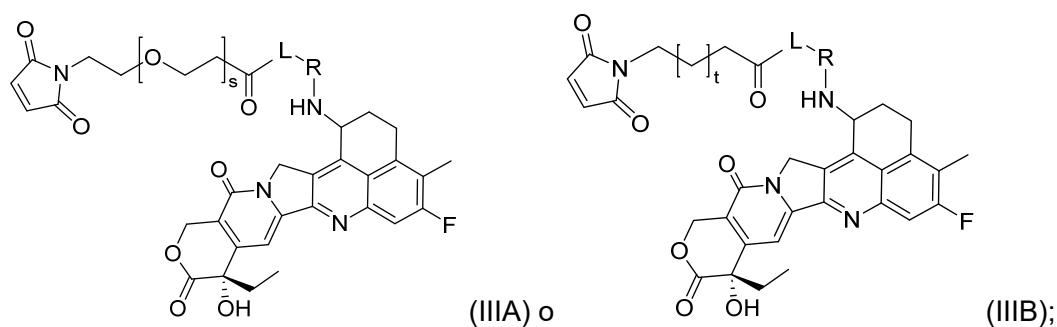
[0085] Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una carga terapéutica divulgada en este documento puede seleccionarse del grupo que consiste en:





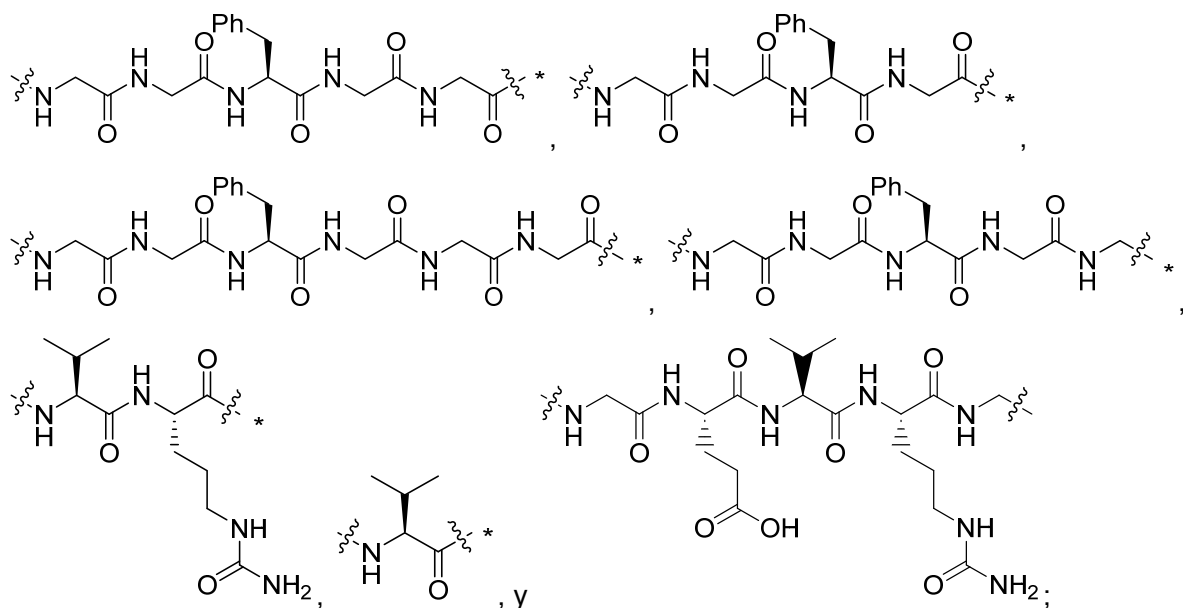
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 5 Se describe además en este documento una construcción de carga activa y enlazador representada por la Fórmula IIIA o la Fórmula IIIB:



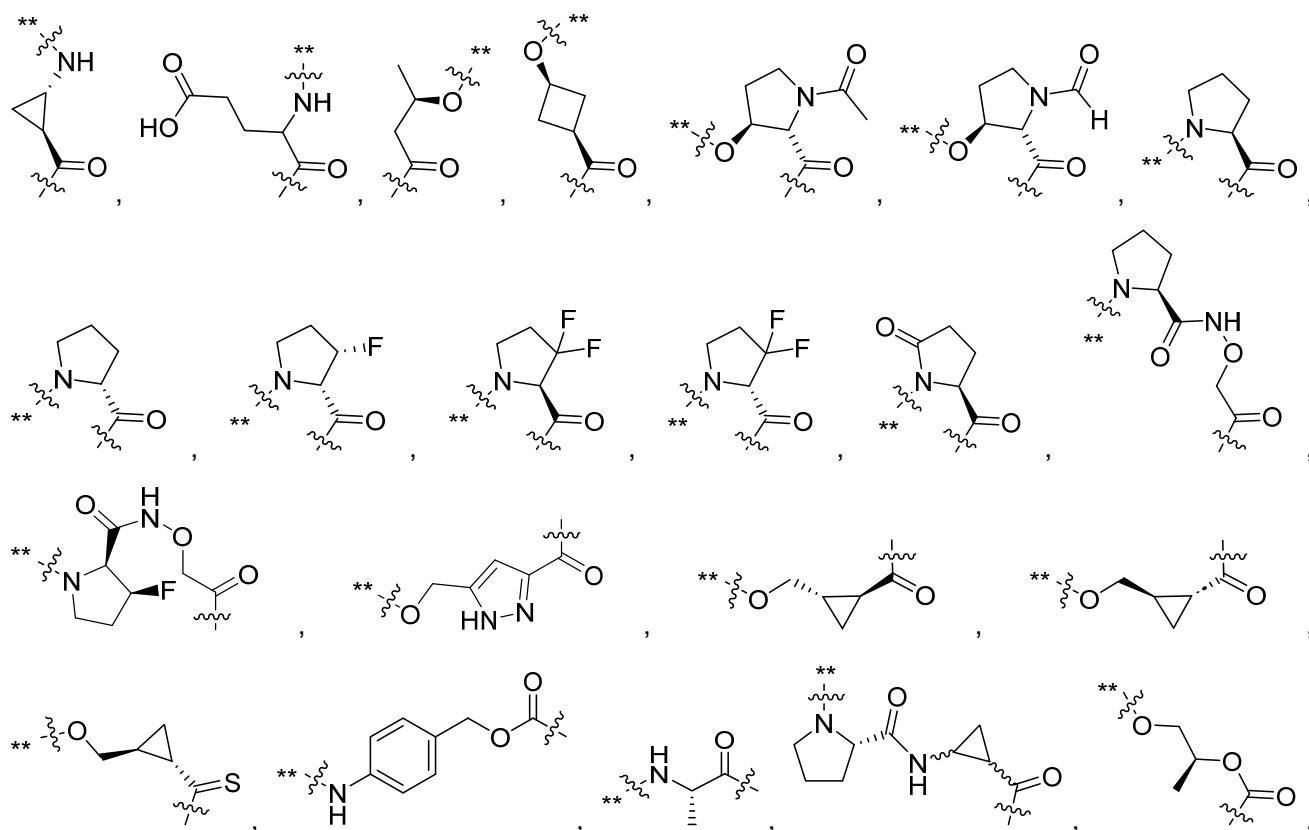
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

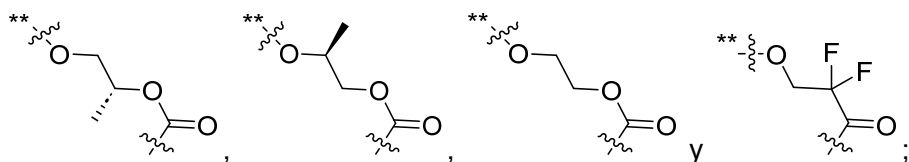
L se selecciona del grupo que consiste en:



en donde * indica el punto de unión a R;

5 R se selecciona del grupo que consiste en:



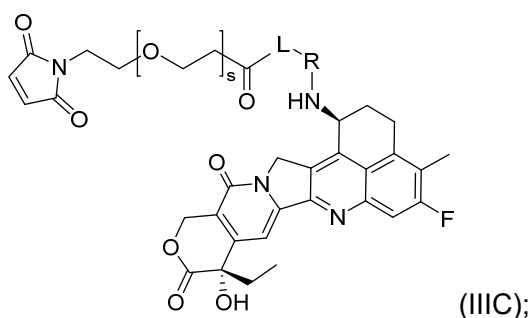


en donde ** indica el punto de unión a L, y

s es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

t es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

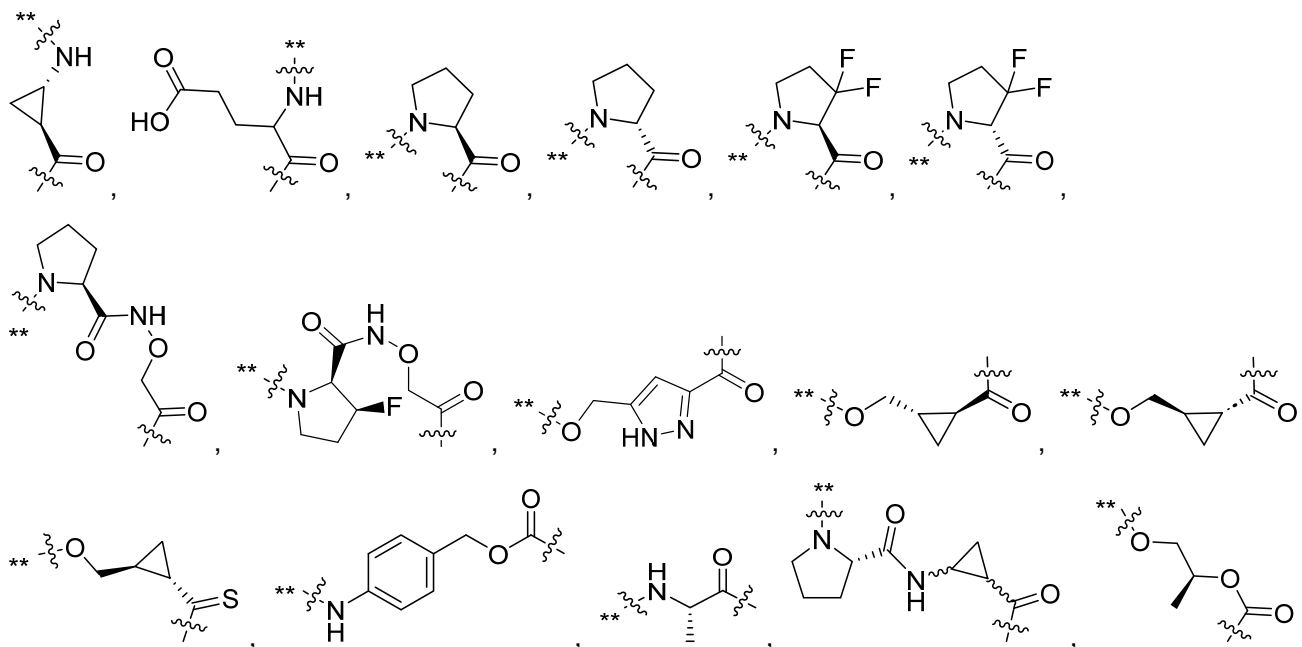
- 5 **[0086]** En algunas realizaciones, una construcción de carga activa y enlazador divulgada de Fórmula III puede representarse mediante la Fórmula IIIC:

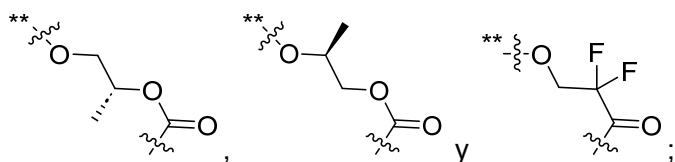


o una sal, un profármaco o un estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este

en donde s es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 10 **[0087]** En algunas realizaciones, R se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en:





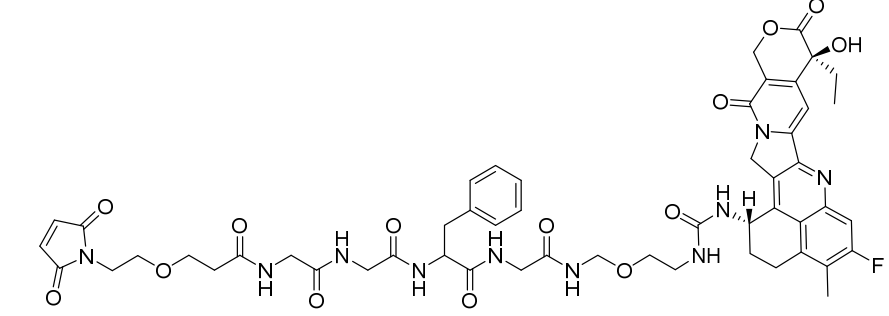
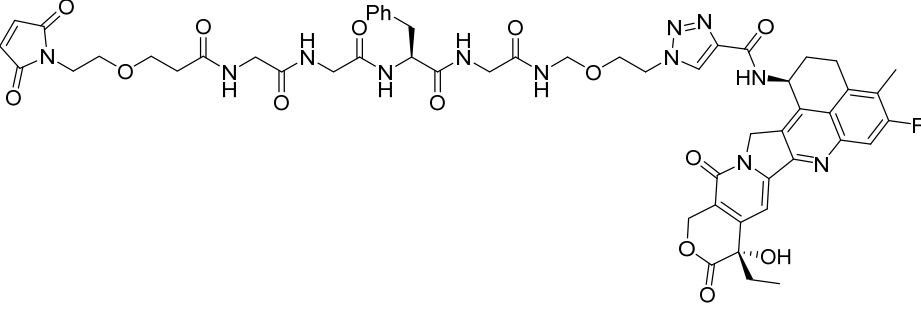
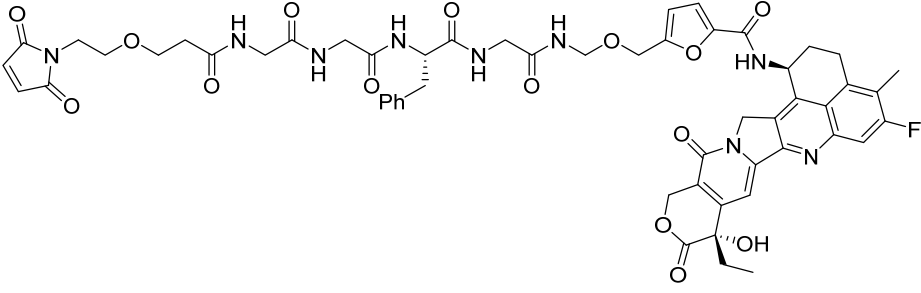
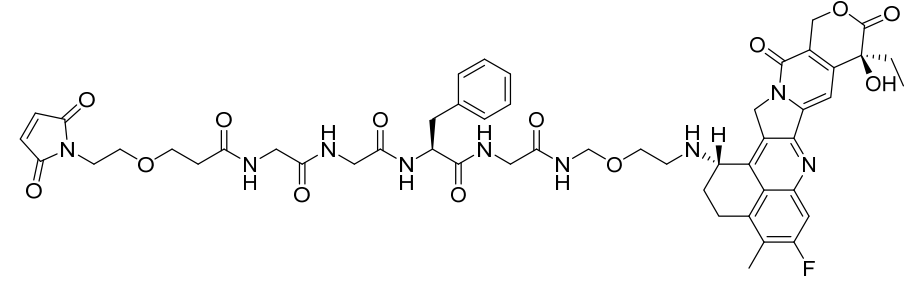
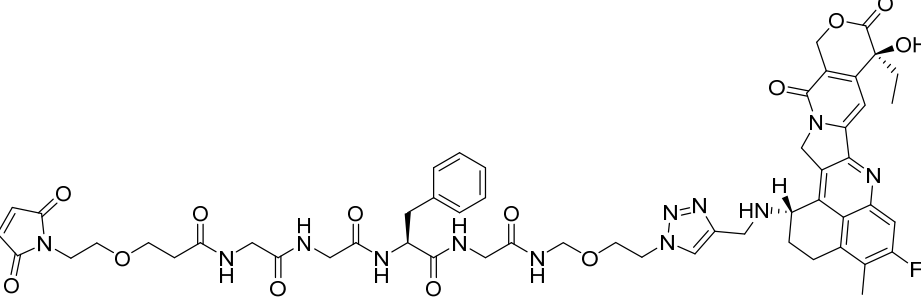
en donde ** indica el punto de unión a L.

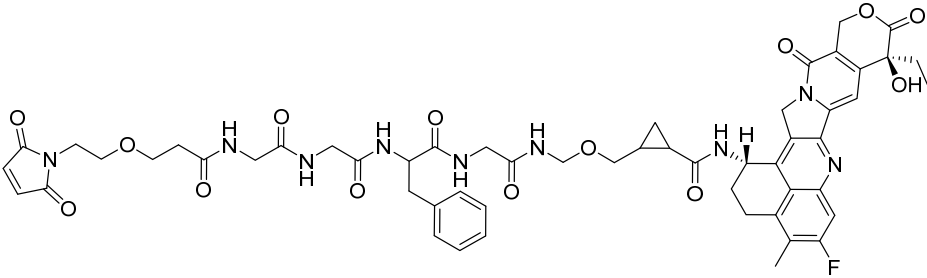
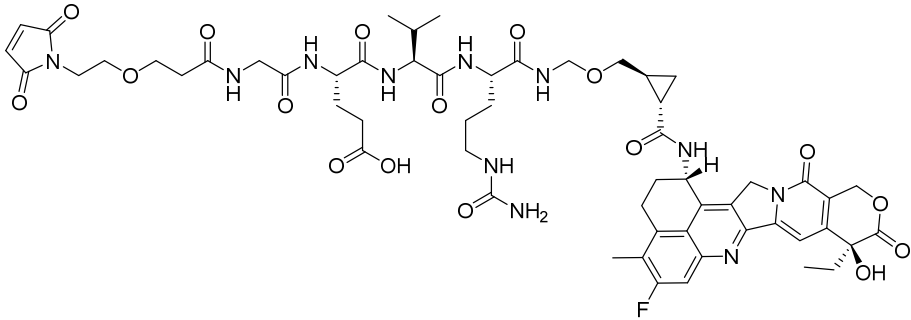
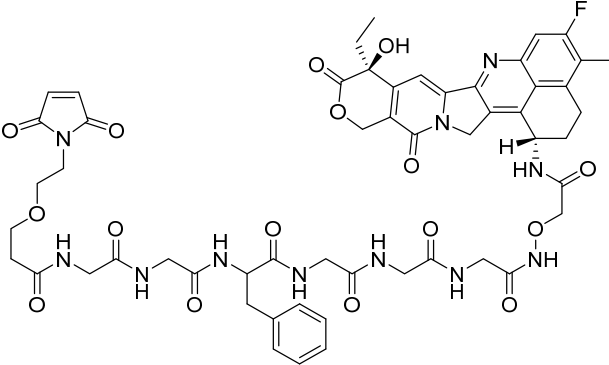
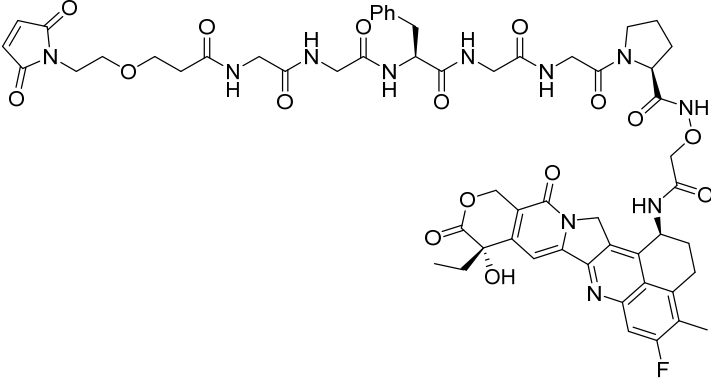
[0088] En ciertas realizaciones, s es 1 u 8. En otras realizaciones, s es 1.

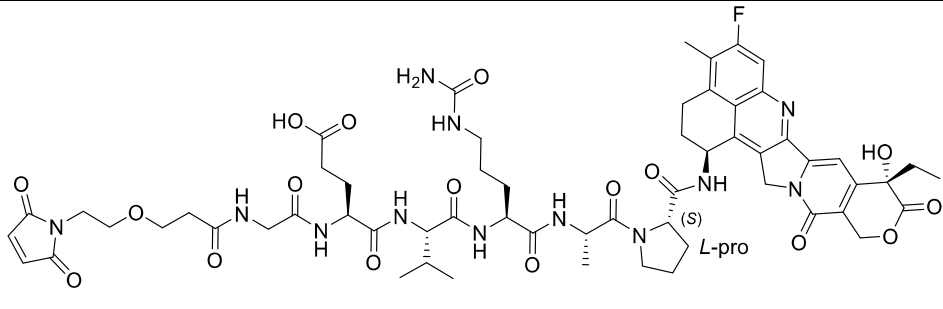
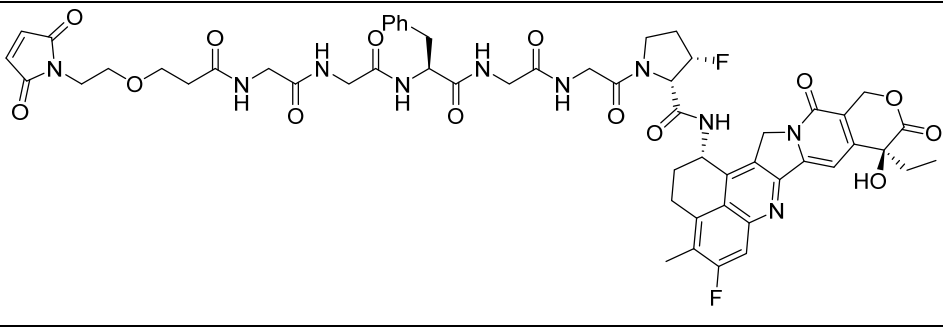
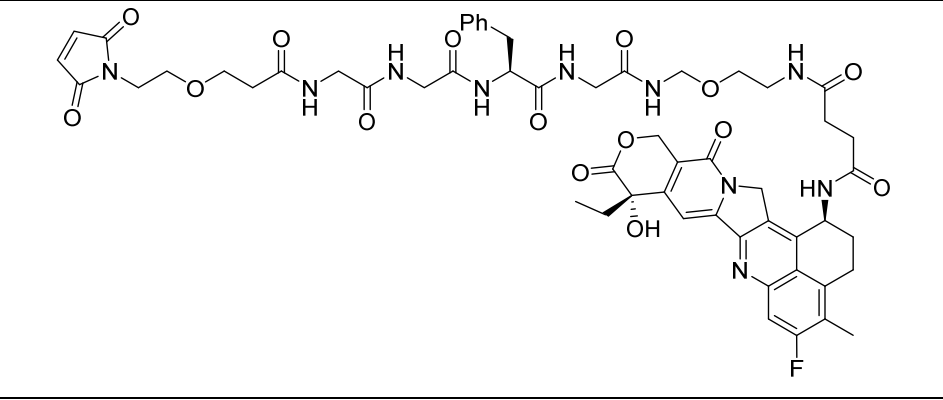
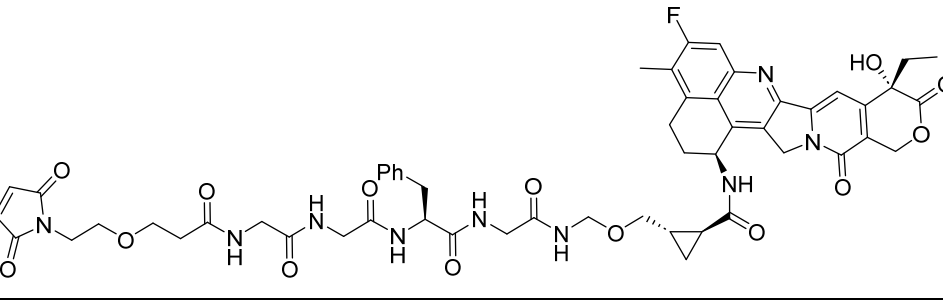
[0089] En algunas realizaciones, una construcción de carga terapéutica y enlazador divulgada puede seleccionarse, por ejemplo, de cualquiera de los compuestos divulgados en la Tabla 6, o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este.

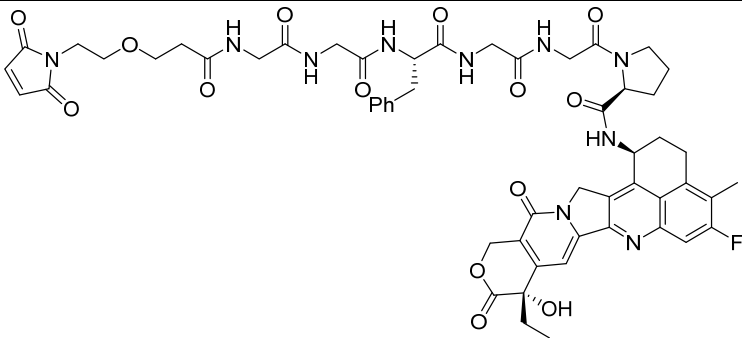
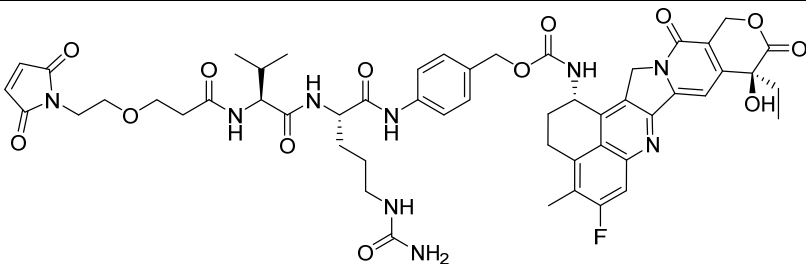
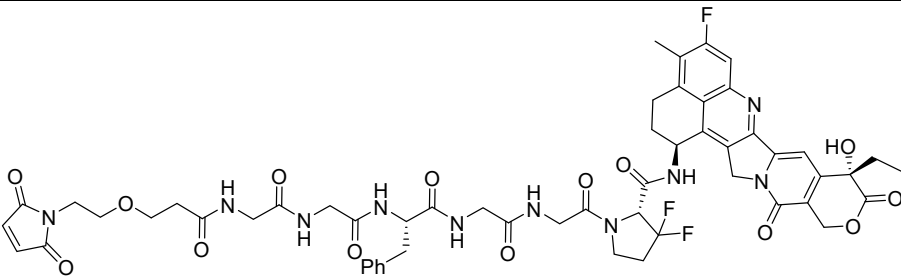
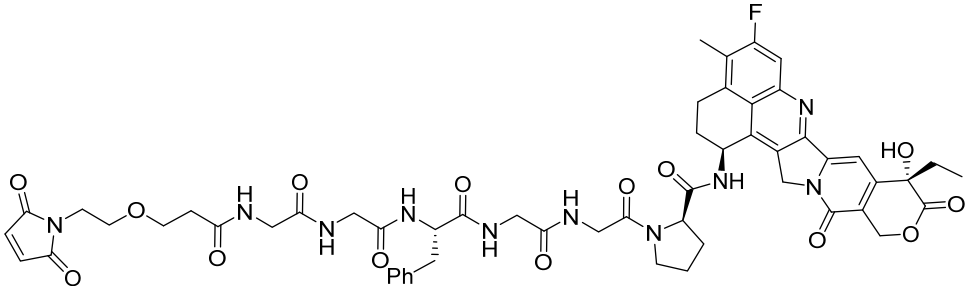
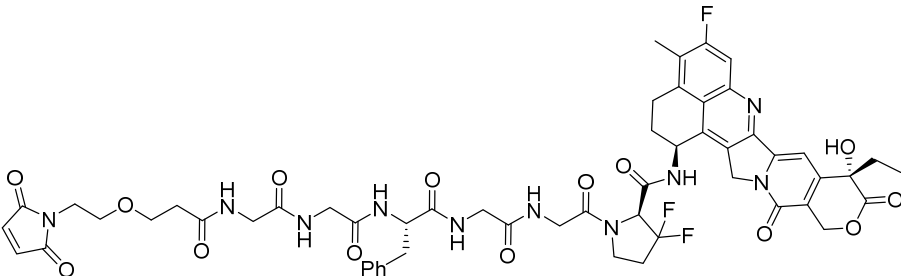
Tabla 6.

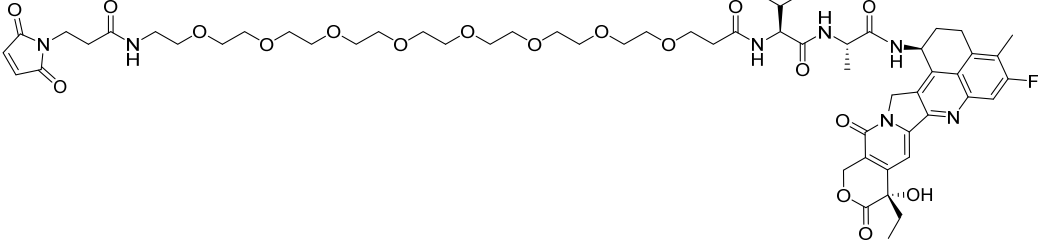
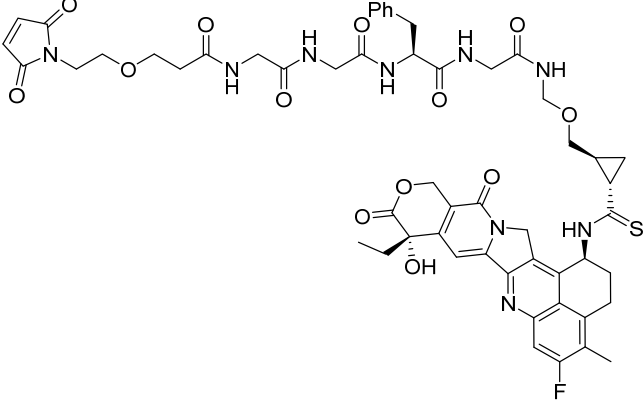
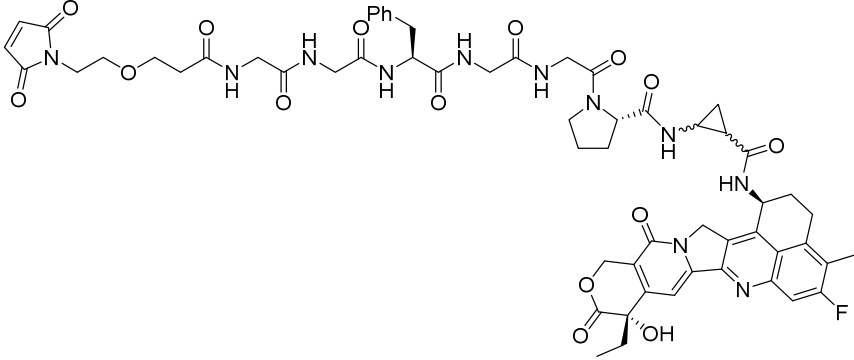
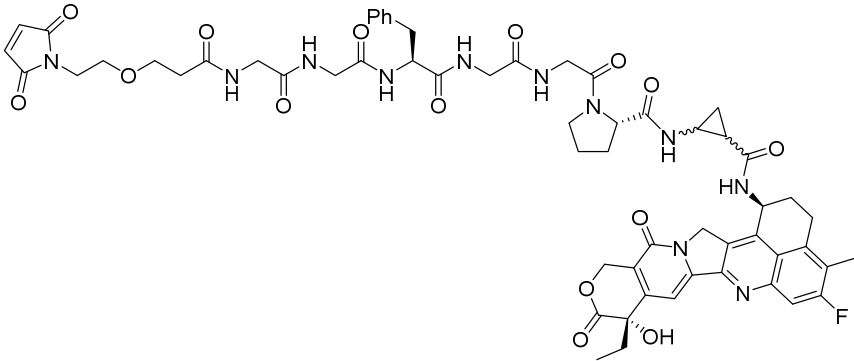
Comp.	Estructura
1001	
1005	
1007	

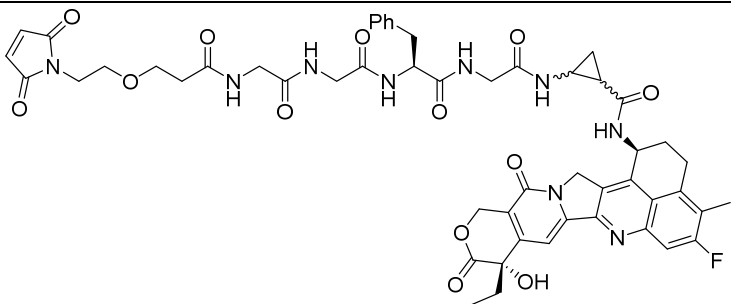
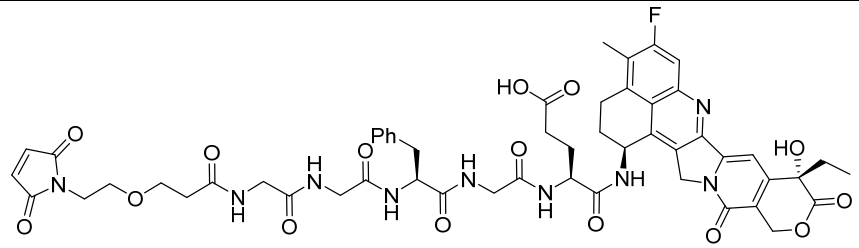
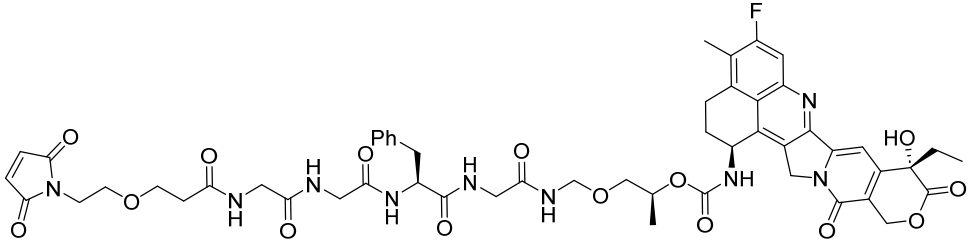
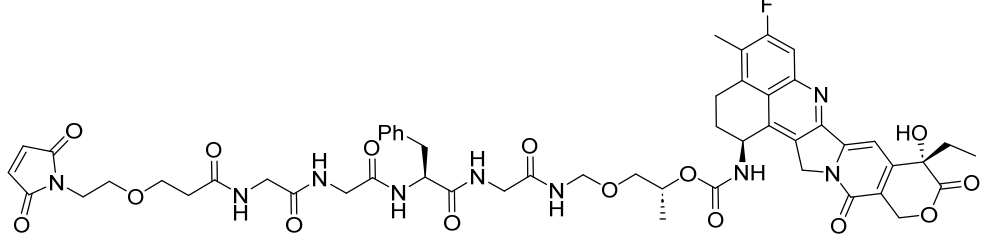
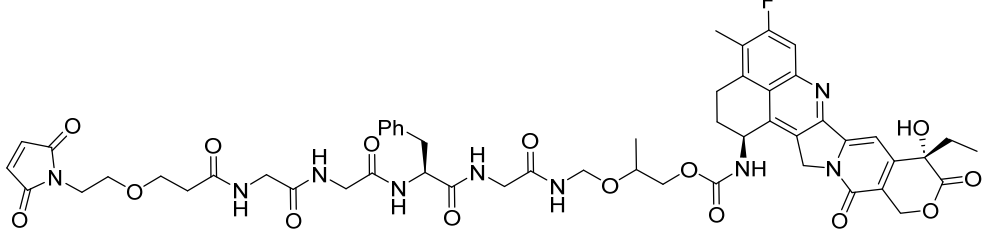
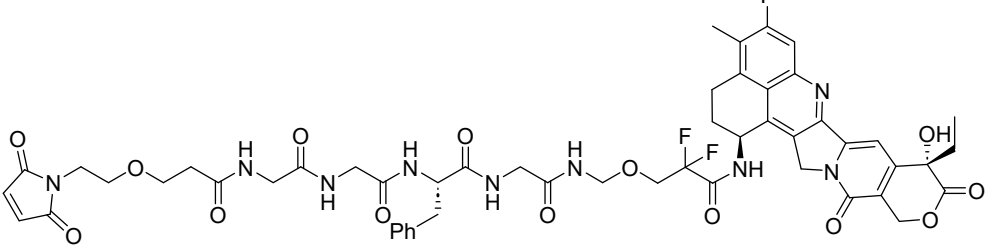
1008	
1010	
1012	
1013	
1015	

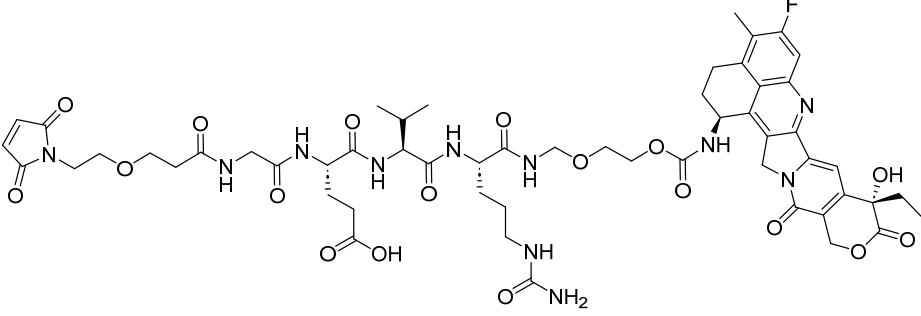
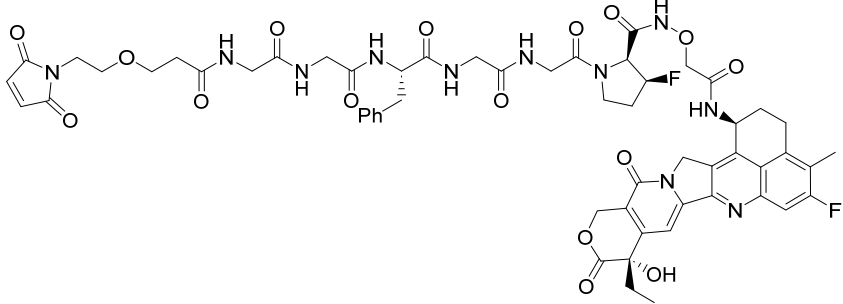
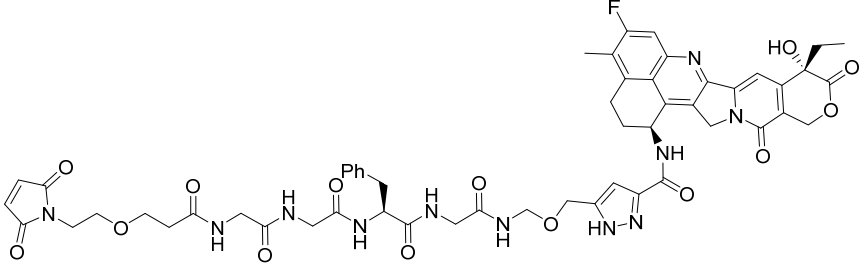
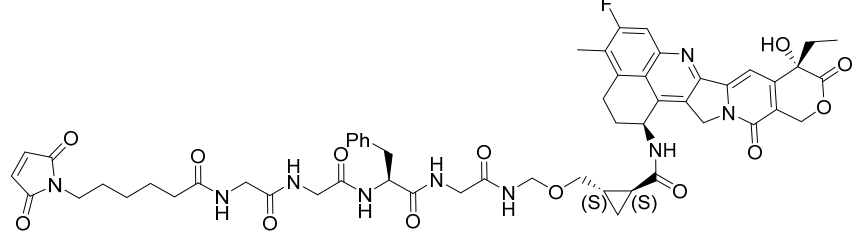
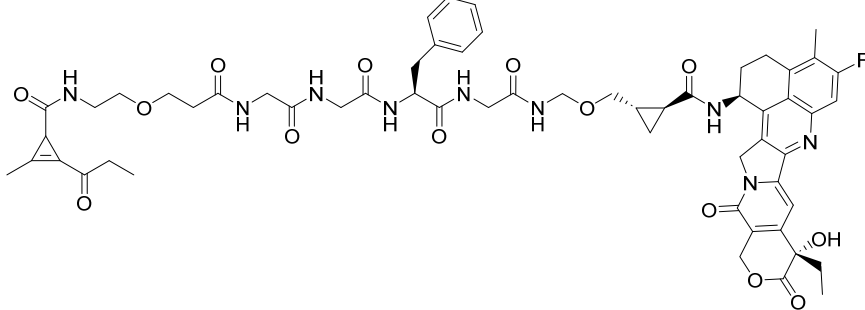
1016	
1017	
1018	
1019	

1021	
1022	
1023	
1025	

1028	
1029	
1030	
1031	
1032	

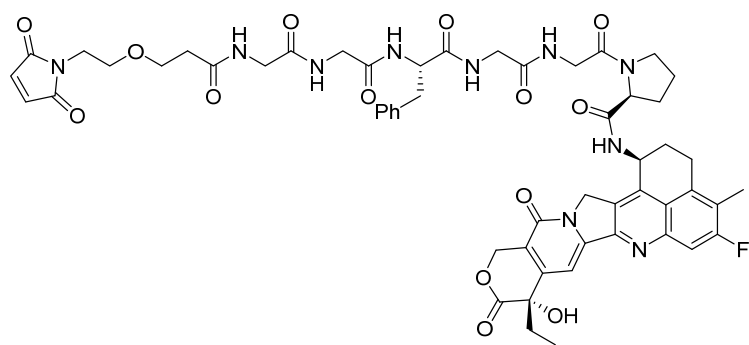
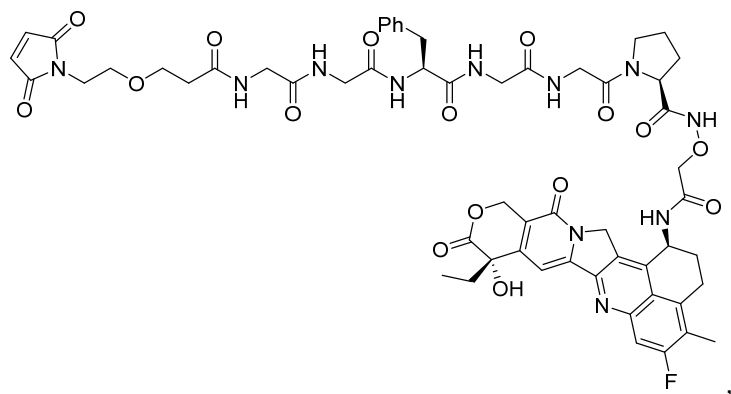
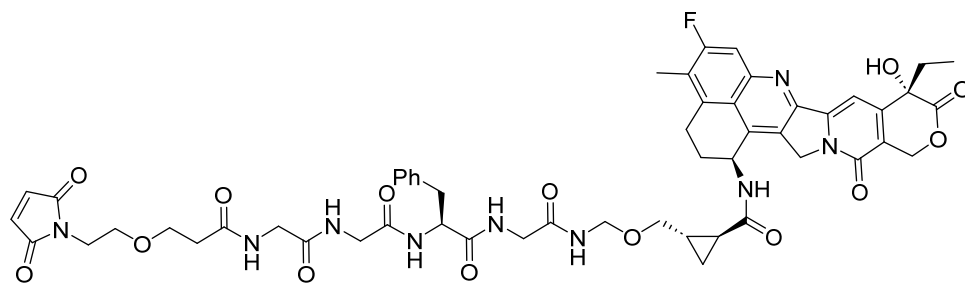
1033	
1034	
1035 (Isómero A)	
1036 (Isómero B)	

1037	
1038	
1039	
1040	
1041	
1042	

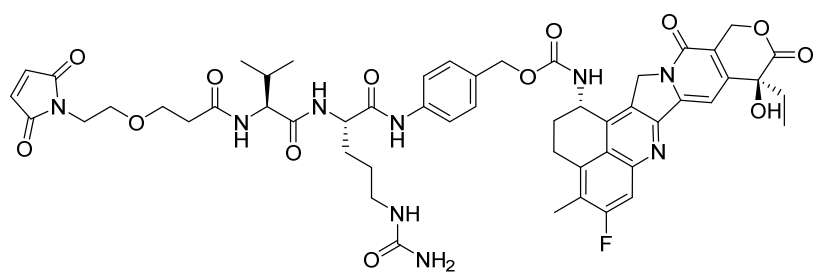
1043	
1044	
1045	
1046	
1047	

[0090] Por ejemplo, en algunas realizaciones, una construcción de carga activa y enlazador

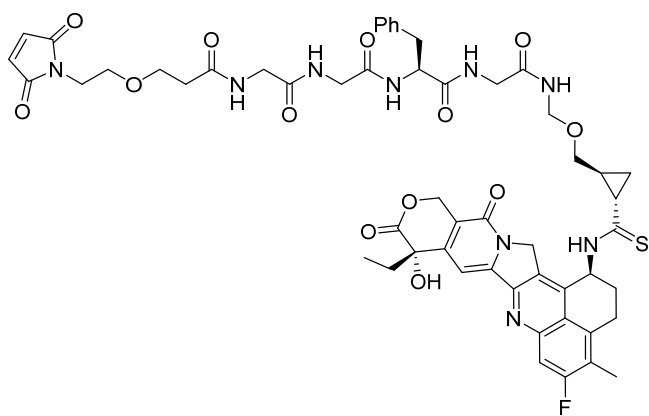
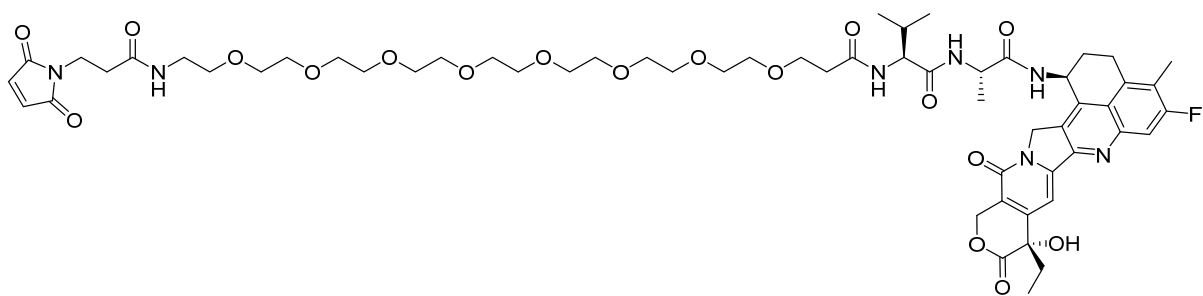
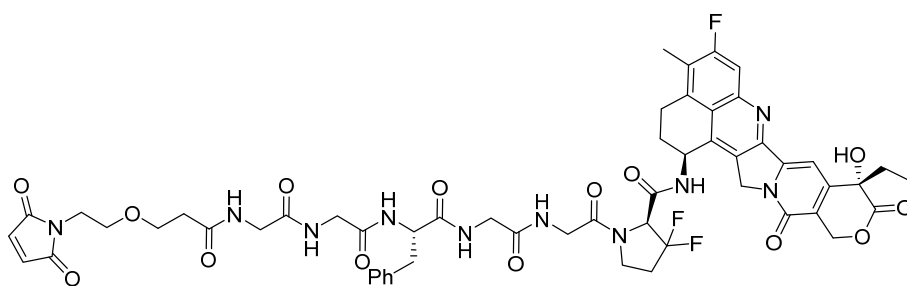
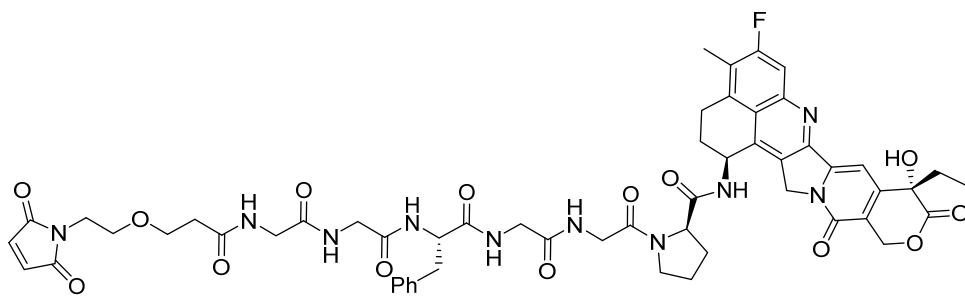
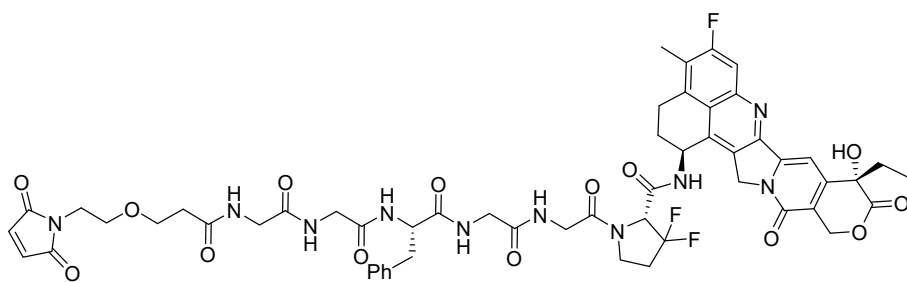
contemplada en este documento puede seleccionarse del grupo que consiste en:



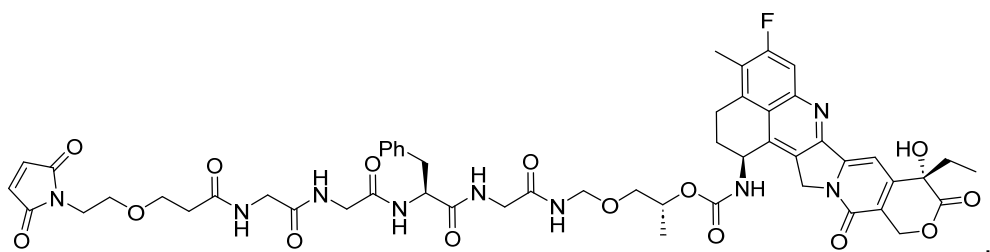
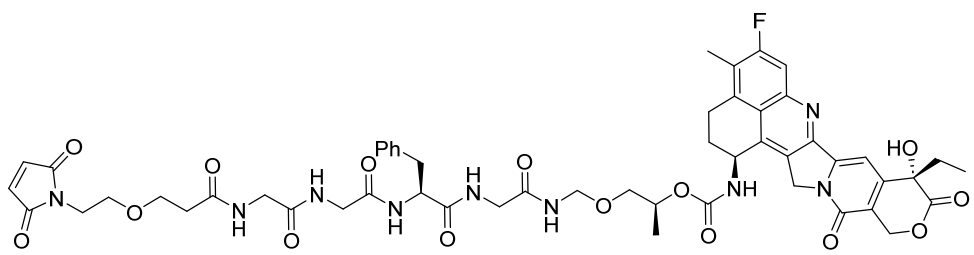
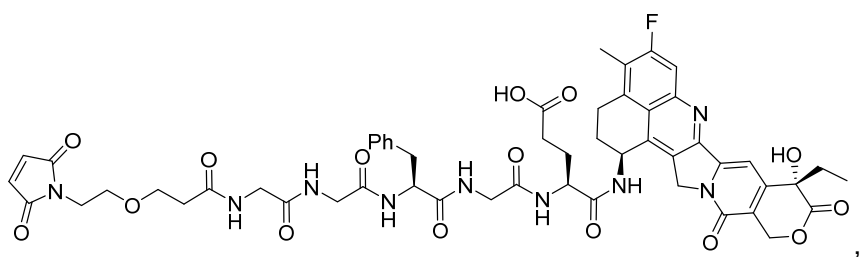
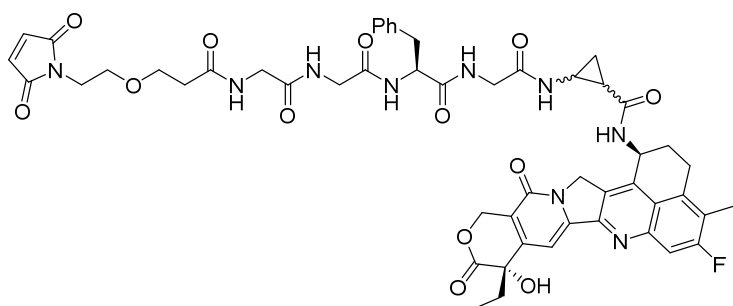
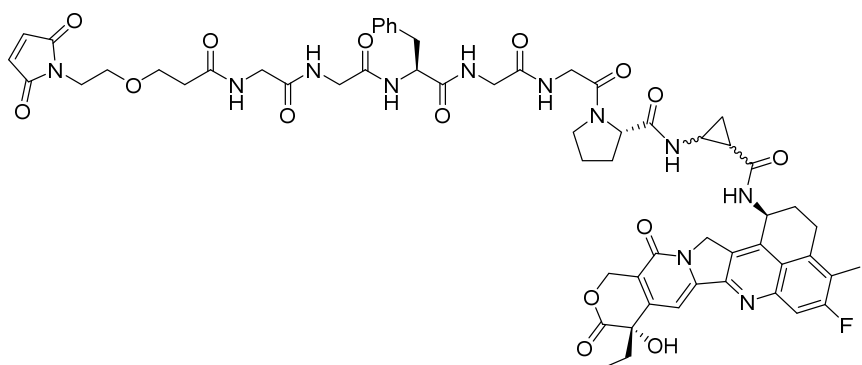
5

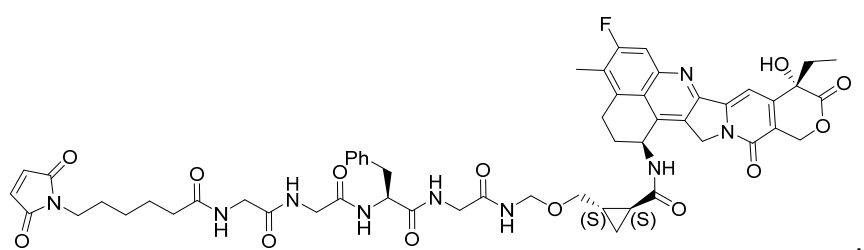
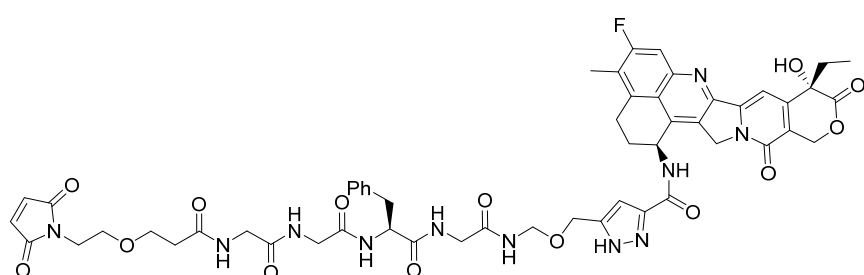
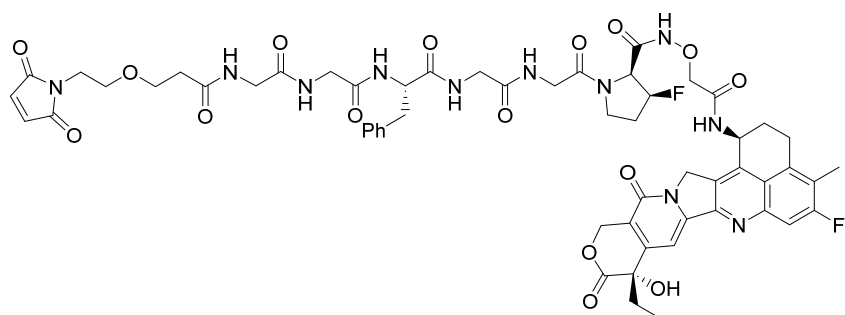
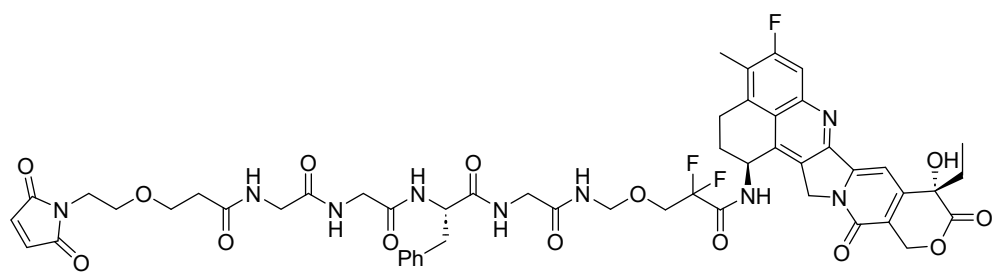
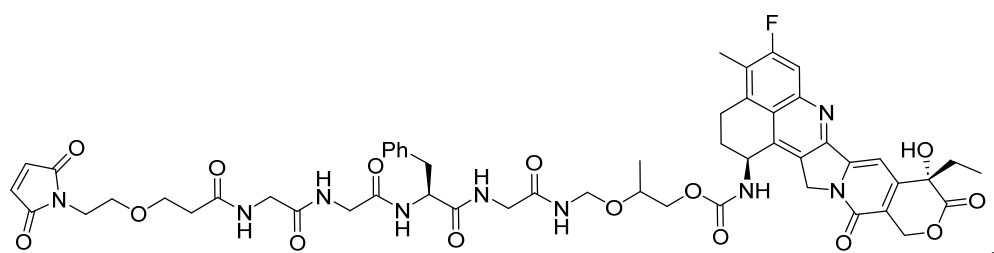


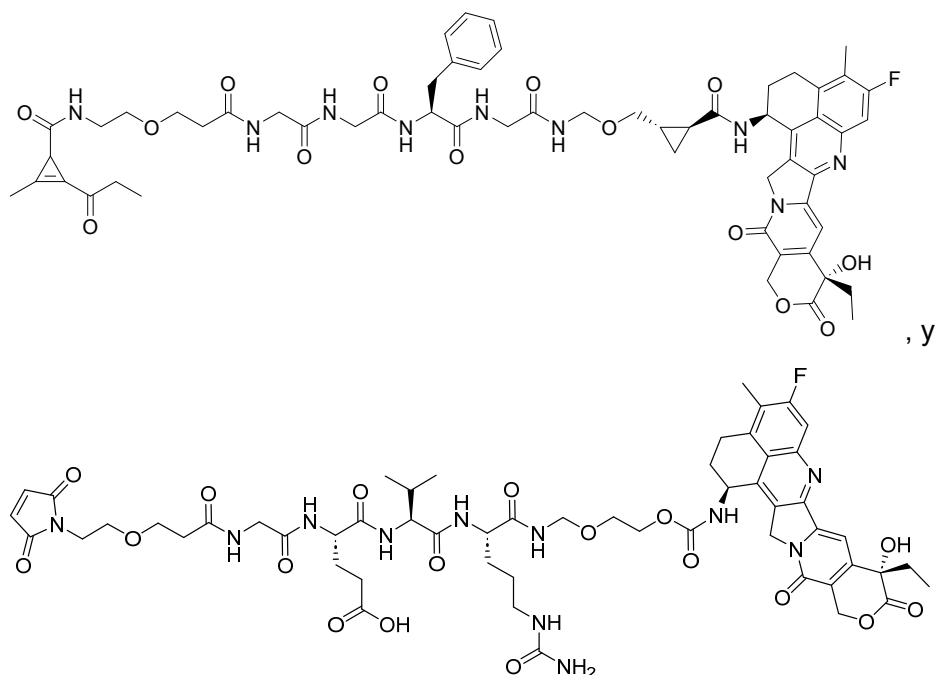
50



51







Métodos

- [0091]** En el presentedocumento se describe, por ejemplo, un método para tratar el cáncer en un
- 5 paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una carga terapéutica descrita en el presente documento, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago y cáncer de esófago.
- 10 **[0092]** En el presentedocumento también se describe un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una construcción de carga activa y enlazador descrita en el presente documento, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma,
- 15 cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago y cáncer de esófago.
- [0093]** En el presente documento también se describe un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un conjugado de fármaco que comprende cualquiera de las cargas activas descritas en el presente documento, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer
- 20 colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago y cáncer de esófago.
- [0094]** También se describe en este documento un método para administrar una cantidad

terapéuticamente eficaz de una fracción de carga terapéutica a un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente cualquiera de los conjugados de fármacos descritos en este documento.

[0095] En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

- 5 **[0096]** En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto descrito puede comprender administración subcutánea. En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto descrito puede comprender la administración intravenosa. En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto descrito puede comprender la administración oral.

- 10 **[0097]** Los métodos de tratamiento proporcionados pueden incluir la administración de un compuesto descrito una, dos o tres veces al día; aproximadamente cada dos días (p. ej., cada 2 días); dos veces por semana (p. ej., cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, o p. ej., administrado con un intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 días entre dosis); una vez por semana; tres veces por semana; cada dos semanas; dos veces al mes; una vez al mes; cada dos meses; o incluso con menos frecuencia.

- 15 **[0098]** En particular, en ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para tratar una o más de las indicaciones médicas anteriores que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en este documento.

- 20 **[0099]** En ciertas realizaciones, el compuesto utilizado por uno o más de los métodos descritos en este documento es uno de los compuestos genéricos, subgenéricos o específicos descritos en este documento.

- 25 **[00100]** Los compuestos de la presente divulgación pueden administrarse a pacientes (animales y humanos) que necesitan dicho tratamiento en dosis que proporcionarán una eficacia farmacéutica óptima. Se apreciará que la dosis requerida para su uso en cualquier aplicación particular variará de un paciente a otro, no solo con el compuesto o composición particular seleccionado, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la condición que se está tratando, la edad y condición del paciente, la medicación concurrente o las dietas especiales que siga el paciente y otros factores que los expertos en la materia reconocerán, y la dosis apropiada quedará en última instancia a discreción del médico tratante. Para tratar las condiciones y enfermedades clínicas señaladas en este documento, un compuesto de la presente divulgación se puede administrar por vía oral, subcutánea, tópica, parenteral, 30 mediante aerosol de inhalación o por vía rectal en formulaciones unitarias de dosificación que contienen vehículos, adyuvantes y portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. La administración parenteral puede incluir inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas o intramusculares o técnicas de infusión.

[00101] El tratamiento puede continuar durante el período tan largo o tan corto como se desee. Un

período de tratamiento adecuado puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente una semana, al menos aproximadamente dos semanas, al menos aproximadamente un mes, al menos aproximadamente seis meses, al menos aproximadamente 1 año o indefinidamente. Un período de tratamiento puede finalizar cuando se logra el resultado deseado.

5 Composiciones farmacéuticas y kits

[00102] Otro aspecto de la descripción hace referencia a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos como se describen en la presente formulados en conjunto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En particular, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprende los compuestos descritos en la presente formulados junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica, bucal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa), vaginal o en aerosol, aunque la forma de administración más adecuada en cada caso dependerá del grado y la gravedad de la afección que se esté tratando y de la naturaleza del compuesto particular que se esté utilizando. Por ejemplo, las composiciones descritas pueden formularse como una dosis unitaria y/o pueden formularse para administración oral o subcutánea.

[00103] Por ejemplo, se describe aquí una composición farmacéutica que comprende una carga terapéutica descrita aquí y un excipiente farmacéuticamente aceptable. También se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende una construcción de carga de enlazador descrita en este documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende un conjugado de fármaco descrito en este documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00104] Las composiciones farmacéuticas ejemplares de esta divulgación se pueden utilizar en forma de una preparación farmacéutica, por ejemplo, en forma sólida, semisólida o líquida, que contiene uno o más compuestos divulgados, como ingrediente activo, en mezcla con un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones externas, enterales o parenterales. El ingrediente activo puede combinarse, por ejemplo, con los vehículos habituales, no tóxicos y farmacéuticamente aceptables para comprimidos, pellets, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones y cualquier otra forma adecuada para su uso. El compuesto activo se incluye en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o condición de la enfermedad.

[00105] Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el ingrediente activo principal puede mezclarse con un vehículo farmacéutico, *por ejemplo*, ingredientes de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, *por ejemplo*, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contenga una mezcla homogénea de un compuesto

descrito, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se quiere decir que el principio activo se dispersa uniformemente en toda la composición, de modo que la composición se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas.

- 5 **[00106]** En formas farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), la composición en cuestión se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones pueden comprender también agentes amortiguadores. También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

- 20 **[00107]** Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos comprimibles se pueden preparar utilizando un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla de la composición en cuestión humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos conocidos en la técnica de formulación farmacéutica.

- 30 **[00108]** Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de estos, y polvos. Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de la composición objeto, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en

la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ciclodextrinas y mezclas de los mismos.

[00109] Las suspensiones, además de la composición en cuestión, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

[00110] Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando una composición en cuestión con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se derretirá en la cavidad corporal y liberará el agente activo.

[00111] Las formas de dosificación para la administración transdérmica de una composición de esta divulgación incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El componente activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualesquiera conservantes, amortiguadores o propelentes que se requieran.

[00112] Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de una composición objeto, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

[00113] Los polvos y aerosoles pueden contener, además de una composición sujeto, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles también pueden contener propelentes habituales, como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, como butano y propano.

[00114] Las composiciones y compuestos de la presente divulgación pueden administrarse alternativamente mediante aerosol. Esto se logra preparando un aerosol acuoso, una preparación liposomal o partículas sólidas que contengan el compuesto. Se podría utilizar una suspensión no acuosa (por ejemplo, propelente de fluorocarbono). Se pueden utilizar nebulizadores sónicos porque minimizan la exposición del agente al cizallamiento, lo que puede provocar la degradación de los compuestos contenidos en las composiciones en cuestión. Normalmente, un aerosol acuoso se elabora formulando una solución o suspensión acuosa de una composición en cuestión junto con vehículos y estabilizadores

farmacéuticamente aceptables convencionales. Los portadores y estabilizadores varían según los requisitos de la composición del tema en particular, pero típicamente incluyen surfactantes no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas como albúmina sérica, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles generalmente se preparan a partir de soluciones isotónicas.

[00115] Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación adecuadas para administración parenteral comprenden una composición en cuestión en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

[00116] Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y ciclodextrinas. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

[00117] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas enterales que incluyen un compuesto divulgado y un material entérico; y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable del mismo. Los materiales entéricos se refieren a polímeros que son sustancialmente insolubles en el ambiente ácido del estómago y que son predominantemente solubles en fluidos intestinales a pH específicos. El intestino delgado es la parte del tracto gastrointestinal entre el estómago y el intestino grueso, e incluye el duodeno, el yeyuno y el íleon. El pH del duodeno es de aproximadamente 5,5, el pH del yeyuno es de aproximadamente 6,5 y el pH del íleon distal es de aproximadamente 7,5. En consecuencia, los materiales entéricos no son solubles, por ejemplo, hasta un pH de aproximadamente 5,0, de aproximadamente 5,2, de aproximadamente 5,4, de aproximadamente 5,6, de aproximadamente 5,8, de aproximadamente 6,0, de aproximadamente 6,2, de aproximadamente 6,4, de aproximadamente 6,6, de aproximadamente 6,8, de aproximadamente 7,0, de aproximadamente 7,2, de aproximadamente 7,4, de aproximadamente 7,6, de aproximadamente 7,8, de aproximadamente 8,0, de aproximadamente 8,2, de aproximadamente 8,4, de aproximadamente 8,6, de aproximadamente 8,8, de aproximadamente 9,0, de aproximadamente 9,2, de aproximadamente 9,4, de aproximadamente 9,6, de aproximadamente 9,8 o de aproximadamente 10,0. Los materiales entéricos ejemplares incluyen

ftalato de acetato de celulosa (CAP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), trimelitato de acetato de celulosa, succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de acetato de celulosa, hexahidroftalato de acetato de celulosa, ftalato de propionato de celulosa, maleato de acetato de celulosa, butirato de acetato de celulosa, propionato de acetato de celulosa, copolímero de ácido metilmetacrílico y metacrilato de metilo, copolímero de acrilato de metilo, metilmetacrilato y ácido metacrílico, copolímero de éter metilvinílico y anhídrido maleico (serie Gantrez ES), copolímero de acrilato de etilo-metilmetacrilato-acrilato de etilo de clorotrimetilamonio, resinas naturales como zeína, goma laca y coloforio de copal, y varios sistemas de dispersión entérica disponibles comercialmente. (por ejemplo, Eudragit L30D55, Eudragit FS30D, Eudragit L100, Eudragit S100, Kollicoat EMM30D, Estacryl 30D, Coateric y Aquateric). La solubilidad de cada uno de los materiales mencionados anteriormente es conocida o se puede determinar fácilmente *in vitro*. Lo anterior es una lista de posibles materiales, pero una persona experta en la materia con el beneficio de la divulgación reconocería que no es exhaustiva y que existen otros materiales entéricos que cumplirían los objetivos de la presente invención.

[00118] Ventajosamente, la presente divulgación también proporciona kits para su uso, por ejemplo, por un consumidor que necesita tratamiento contra el cáncer. Dichos kits incluyen una forma de dosificación adecuada como las que se describen en este documento e instrucciones que describen el método de uso de dicha forma de dosificación para mediar, reducir o prevenir la inflamación. Las instrucciones indicarían al consumidor o al personal médico que administrara la forma de dosificación de acuerdo con los modos de administración conocidos por los expertos en la materia. Dichos kits podrían empaquetarse y venderse ventajosamente en unidades individuales o múltiples. Un ejemplo de este tipo de kit es el llamado blíster. Los blísteres son bien conocidos en la industria del embalaje y se utilizan ampliamente para el embalaje de formas farmacéuticas unitarias de dosificación (comprimidos, cápsulas y similares). Los blísteres suelen consistir en una lámina de material relativamente rígido recubierta de una lámina de plástico, preferiblemente transparente. Durante el proceso de envasado se forman huecos en la lámina de plástico. Los huecos tienen el tamaño y la forma de los comprimidos o cápsulas a envasar. A continuación, se colocan las tabletas o cápsulas en los huecos y se sella la lámina de material relativamente rígido contra la lámina de plástico en la cara de la lámina que está opuesta a la dirección en la que se formaron los huecos. De este modo, las tabletas o cápsulas quedan selladas en los huecos entre la lámina de plástico y la lámina. Preferiblemente, la resistencia de la lámina es tal que las tabletas o cápsulas se pueden retirar del blíster aplicando manualmente presión sobre los huecos con lo que se forma una abertura en la lámina en el lugar del hueco. A continuación se puede extraer la tableta o cápsula a través de dicha abertura.

[00119] Puede ser deseable proporcionar una ayuda de memoria en el kit, *por ejemplo*, en forma de

números al lado de las tabletas o cápsulas, de modo que los números se correspondan con los días del régimen en que se deben ingerir las tabletas o cápsulas así especificadas. Otro ejemplo de este tipo de ayuda para la memoria es un calendario impreso en la tarjeta, por ejemplo, como sigue: “Primera semana, lunes, martes, etc. Segunda semana, lunes, martes, . . .” etc. Otras variaciones de ayudas para la memoria serán fácilmente evidentes. Una “dosis diaria” puede ser un solo comprimido o cápsula o varias pastillas o cápsulas que se toman en un día determinado. Además, una dosis diaria de un primer compuesto puede consistir en un comprimido o cápsula, mientras que una dosis diaria del segundo compuesto puede consistir en varios comprimidos o cápsulas y viceversa. La ayuda de memoria debería reflejar esto.

EJEMPLOS

[00120] Los compuestos descritos en la presente se pueden preparar de varias maneras con base en el contenido de la presente y procedimientos de síntesis conocidos en la técnica. En la descripción de los métodos sintéticos descritos a continuación, se debe entender que todas las condiciones de reacción propuestas, incluida la elección del disolvente, la atmósfera de reacción, la temperatura de reacción, la duración del experimento y procedimientos de tratamiento, pueden ser seleccionados por una persona experta en la técnica. Un experto en la técnica de la síntesis orgánica entenderá que la funcionalidad presente en diversas porciones de la molécula debe ser compatible con los reactivos y las reacciones propuestos. Los sustituyentes no compatibles con las condiciones de reacción serán evidentes para una persona experta en la materia, por lo que se indican métodos alternativos. Los materiales de partida para los ejemplos están disponibles comercialmente o se preparan fácilmente mediante métodos estándar a partir de materiales conocidos. Al menos algunos de los compuestos identificados como “Intermedios” en este documento se contemplan como compuestos de la presente divulgación.

[00121] A menos que se indique lo contrario, todas las reacciones se realizaron en un material de vidrio secado con pistola de calor bajo una atmósfera de argón, utilizando técnicas de septos estándar. Todos los bloques de construcción iniciales disponibles comercialmente se adquirieron a vendedores comerciales.

Ejemplo 1: Métodos generales

[00122] Las reacciones se monitorearon mediante análisis HPLC-MS utilizando un sistema Shimadzu UFLC-MS-2020 con ESI, y/o mediante cromatografía de capa fina (TLC) utilizando placas de gel de sílice 60 F254 (Merck) y visualizadas por UV a 254 nm. Las purificaciones se realizaron utilizando un sistema de cromatografía ultrarrápida automatizado (ECOM), utilizando una columna preempacada que contenía gel de sílice C18 o C18 modificado (Interchim, PT-15C18AQ, 15 µm Puriflash 200, 5 g, 12 g o 25 g). Los HPLC semipreparativos se realizaron en el sistema HPLC ECOM, utilizando una columna semipreparativa C18 modificada (YMC-Actus, Triart Prep C18, 250x20 mm, S-10 µm, 12 nm). Los

análisis HPLC-MS se realizaron en el sistema Shimadzu UFLC-MS-2020 con ESI. Columna: Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 x 50 mm. Disolvente A: H_2O 0,1 % HCOOH ; Disolvente B: MeCN + 0,1 % HCOOH . Flujo total: 0,6 ml/min. Tiempo total del método: 10 min. El espectro de masas se registró en el rango de 100 a 3000 m/z, tanto en modo positivo como negativo, con un tiempo de evento de 0,2 s.

- 5 Los espectros UV-Vis se registraron con un detector de diodos Prominence Shimadzu SPD-M20A, en el rango de 200 a 800 nm. Los espectros de RMN se registraron utilizando solventes deuterados al >99% en un espectrómetro Bruker AVANCE III de 400 MHz (^1H a 400 MHz) y/o en un Bruker AVANCE 500 (^1H a 500,0 MHz). Los desplazamientos químicos (en ppm, escala δ) fueron la señal del disolvente en los espectros ^1H . Los productos intermedios y finales se liofilizaron utilizando un liofilizador de instrumentos Gregory (modelo L4-110), a partir de agua o mezclas de agua con dioxano o acetonitrilo.
- 10

Abreviaturas:

DCM	Diclorometano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
DMTMM	cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio
EPPS	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanosulfónico
Equivalente	equivalentes
h, hora	hora(s)
Mal-PEG1-NHS	Maleimida-polietilenglicol 1- <i>N</i> -hidroxisuccinimida
Mg	miligramos
Min	Minuto(s)
mL, ml	mililitro(s)
RP	Fase inversa
NCS	<i>N</i> -clorosuccinimida
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
rt, RT	Temperatura ambiente
TBAI	Yoduro de tetrabutilamonio
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético

THF	Tetrahidrofurano
-----	------------------

Síntesis de genes de anticuerpos monoclonales, expresión y purificación de anticuerpos

[00123] La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-HER2 se basó en la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y ligera de trastuzumab, entrada D03257 de la base de datos KEGG, el anticuerpo anti-EGFR se basó en la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y ligera de panitumumab, entrada D05350 de la base de datos KEGG, la secuencia de aminoácidos de cetuximab, entrada D03255 de la base de datos KEGG, el número de acceso de DrugBank DB06192 de la secuencia de aminoácidos de nimotuzumab o el número de acceso de DrugBank DB06192 de la secuencia de aminoácidos de matuzumab.

Cadena ligera anti-HER2, SEQ ID NO: 1

10 **[00124]** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF
SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de IgG1 anti-HER2, SEQ ID NO: 2

15 **[00125]** EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
20 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Cadena ligera anti-EGFR IgG1 1, SEQ ID NO: 3

25 **[00126]** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF
SGSGSGTDFTFITISLQPEDATYFCQHFHDLPLAFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de IgG1 anti-EGFR 1, SEQ ID NO: 4

30 **[00127]** QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNY
NPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS

GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Cadena pesada de IgG1 anti-EGFR **2**, SEQ ID NO: 5

[00128] QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIWVRQAPGQGLEWIGGINPTSGGSNF
NEKFKTRVTITADESSTTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQQLWFDS DGRGDFWQGQTTVTVSSASTK
5 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10 Cadena ligera de IgG1 anti-EGFR **2**, SEQ ID NO: 6

[00129] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIVHSNGNTYLDWYQQTPGKAPKLLIYKVS NRFSG
VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCFQYSHVPWTFGQGTKLQITREVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 Cadena pesada de IgG1 anti-EGFR **3**, SEQ ID NO: 7

[00130] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHWMHWVRQAPGQGLEWIGEFNPSNGRTN
YNEKFKSKATMTVDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCASRDYDYAGRYFDYWGQGT LTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
20 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera de IgG1 anti-EGFR **3**, SEQ ID NO: 8

[00131] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVPSRFS
25 GSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQWSSHIFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de IgG1 anti-EGFR **4**, SEQ ID NO: 9

[00132] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHWMHWVRQAPGQGLEWIGEFNPSNGRTN
30 YNEKFKSKATMTVDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCASRDYDYDGRYFDYWGQGT LTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera de IgG1 anti-EGFR **4**, SEQ ID NO: 10

[00133] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAGSVPSRFS
GSGSGTDYFTISSLQPEDATYYCQQWSSHIFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
5 CLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de IgG1 anti-EGFR **5**, SEQ ID NO: 11

[00134] QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN
TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFP
10 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 Cadena ligera de IgG1 anti-EGFR **5**, SEQ ID NO: 12

[00135] DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

20 Cadena pesada de IgG1 anti-EGFR **6** (variante de cadena pesada de IgG1 anti-EGFR **5**), SEQ ID NO:
13

[00136] QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYN
TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSEDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
25 QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Cadena ligera de IgG1 anti-EGFR **6**, variante, SEQ ID NO: 14

30 DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF
TLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY
PRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

Cadena ligera del anticuerpo isotipo, SEQ ID NO: 15

[00137] DIVLTQSPATLSVTPGNSVSLSCRASQSIGNDLHWYQQKSHEsprLLIKYASQSIGIPSRFS
 GSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC

5 Cadena pesada de anticuerpo de isotipo IgG1 humano, SEQ ID NO: 16

[00138] DVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVTGDSITSDYWSWIRKFPGNRLEYMGYVSYSGSTYYNP
 SLKSRISITRDTSKNQYYLDLNSVTTEDTATYYCANWDGDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE
 10 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Cadena ligera anti-TROP2, SEQ ID NO: 17

[00139] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVSIATAVWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRF
 15 SSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQHYITPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 CLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de IgG1 anti-TROP2, SEQ ID NO: 18

[00140] QVQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPT
 20 YAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGYGSSYWFYFDVWGQGTITVTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 25 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[00141] Se generaron secuencias de proteínas de cadena ligera y cadena pesada de control de isotipo anti-HER2, anti-TROP2, anti-EGFR e IgG1 mediante síntesis genética y codones optimizados para expresión en células de mamíferos (GeneUniversal). Los genes de la cadena pesada y ligera se clonaron en vectores de expresión de mamíferos separados y luego se cotransfectaron transitoriamente en
 30 células EXPI293F (ThermoFisher). La expresión de anticuerpos se llevó a cabo en medio de expresión EXPI293F (ThermoFisher) y el sobrenadante se cosechó 5 días después de la transfección. Los anticuerpos respectivos se purificaron utilizando resina MABSELECT Sure (Cytiva) y el amortiguador se intercambió en solución salina amortiguada con fosfato 1x pH 7,4. Los datos de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (Cytiva, Superdex 200 10/300) indicaron que los respectivos anticuerpos

eran aproximadamente 99 % monómero.

Preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco

[00142] Para generar un conjugado de anticuerpo y fármaco en el que el fármaco enlazador se conjuga con cisteínas intercatenarias pesada-pesada y pesada-ligera del anticuerpo, los conjugados de anticuerpo-fármaco anti-HER2, anti-TROP2 y anti-EGFR se produjeron haciendo reaccionar un compuesto enlazador-fármaco como se describe en este documento con un anticuerpo anti-HER2, anti-TROP2 o anti-EGFR y formando un enlace tioéter en residuos de cisteína que forman sitios de enlace disulfuro presentes entre las subunidades de anticuerpo de cadena ligera y pesada y las subunidades de anticuerpo de cadena pesada y pesada respectivamente. Deruxtecan (CAS n.º: 1599440-13-7) se obtuvo de ChemScene, Inc.

Procedimiento A:

[00143] 3,3 mg/ml de anticuerpo monoclonal anti-HER2 IgG1 (coeficiente de extinción a 280 nm, 215380 M-1cm-1) en 1x PBS pH 7,4, 10% de sacarosa, 5 mM EDTA, se redujeron parcialmente añadiendo 40 equivalentes molares de solución TCEP (BondBreaker, ThermoFisher) en relación con el anticuerpo monoclonal durante 60 min a 20 °C. El polvo liofilizado del fármaco enlazador respectivo se disolvió en DMSO al 100 % (peso por volumen) y se agregó a la mezcla de reacción de anticuerpo reducido a 2-37 equivalentes molares con relación al anticuerpo monoclonal como solución de DMSO al 5-8 % v/v, y la solución de reacción se agitó durante 2 horas a 20 °C. Posteriormente, se añadió una solución acuosa 20 mM de N-acetilcisteína (SigmaAldrich) a 9 equivalentes molares con respecto al anticuerpo y la mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a 20 °C.

Procedimiento B:

[00144] 3,8 mg/ml de anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2 (coeficiente de extinción a 280 nm, 203460 M-1cm-1) en 1x PBS pH 7,4, sacarosa al 10 %, EDTA 5 mM, se redujo parcialmente mediante la adición de 40 equivalentes molares de TCEP (ThermoFisher) con respecto al anticuerpo monoclonal durante 60 min a 20 °C. El polvo liofilizado de fármaco y enlazador se disolvió en DMSO al 100 % (peso en volumen) y se agregó a la mezcla de reacción de anticuerpo reducido en 6-37 equivalentes molares con respecto al anticuerpo monoclonal como una solución 5-8 % v/v de DMSO y la mezcla de reacción se inclinó durante 2 horas a 20 °C. Posteriormente, se añadió una solución acuosa 20 mM de N-acetilcisteína (SigmaAldrich) a 9 equivalentes molares con respecto al anticuerpo y la mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a 20 °C.

Procedimiento C:

[00145] Se redujeron parcialmente de 2,4 a 10 mg/ml del anticuerpo monoclonal anti-EGFR IgG1 1, 2, 3, 4 o 5 respectivo en 1x PBS pH 7,4, 10 % de sacarosa, EDTA 5 mM, añadiendo 40 equivalentes molares de TCEP (ThermoFisher) en relación con el anticuerpo monoclonal durante 60 min a 20 °C. El

polvo liofilizado de fármaco y enlazador se disolvió en DMSO al 100 % (peso en volumen) y se agregó a la mezcla de reacción de anticuerpo reducido en 2-37 equivalentes molares con respecto al anticuerpo monoclonal como una solución 5-8 % v/v de DMSO y la mezcla de reacción se inclinó durante 2 horas a 20 °C. Posteriormente, se añadió 1 equivalente molar de N-acetilcisteína (SigmaAldrich) en relación con la carga de enlazador y la mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a 20 °C. Anticuerpo monoclonal anti-EGFR IgG1 coeficiente de extinción **1** a 280 nm, 232 340 M-1cm-1. Coeficiente de extinción del anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **2** a 280 nm, 217440 M-1cm-1. Coeficiente de extinción del anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **3** a 280 nm, 227360 M-1cm-1. Coeficiente de extinción del anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **4** a 280 nm, 227360 M-1cm-1. Coeficiente de extinción del anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **5** a 280 nm, 217440 M-1cm-1.

Eliminación del exceso de enlazador-fármaco del conjugado anticuerpo-fármaco

[00146] El exceso de fármaco-enlazador extinguido se separó de los respectivos conjugados fármaco-anticuerpo mediante cromatografía de intercambio catiónico (Cytiva, resina HiTrap SP HP), la composición del amortiguador A fue 10 % de sacarosa, 12,5 mM de acetato de sodio pH 5,0, 20 mM de NaCl, y el amortiguador B fue 10 % de sacarosa, 12,5 mM de acetato de sodio pH 5,0, 1 M de NaCl. El conjugado de anticuerpo y fármaco y la mezcla de enlazador-fármaco no conjugado en PBS 1x pH 7,4 se diluyeron en sacarosa al 10 %, acetato de sodio 12,5 mM pH 5,0 y amortiguador de NaCl 0 mM y se cargaron en una columna de resina HiTrap SP HP (Cytiva). Los respectivos fármacos enlazadores no conjugados no se unieron a la columna, mientras que los respectivos conjugados anticuerpo-fármaco se unieron a la columna y se eluyeron en un amortiguador de sacarosa al 10 %, NaCl 100-150 mM y acetato de Na 12,5 mM, pH 5,0. La cromatografía de exclusión por tamaño analítica (Cytiva, Superdex 200 10/300 en amortiguador PBS 1x, pH 7,4 o columna Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 4,6 x 150 mm, tamaño de partícula de 2,7 micrones, en amortiguador PBS 1x, pH 7,4, 10 % de isopropanol) mostró que los conjugados de anticuerpo y fármaco eran >90 % monoméricos.

Determinación de la relación fármaco-enlazador a anticuerpo

[00147] La relación fármaco-enlazador a anticuerpo de los conjugados anticuerpo-fármaco se determinó mediante espectrometría de masas por cromatografía líquida de fase inversa (RPLC-MS) de las especies de subunidades de cadena pesada y ligera del anticuerpo utilizando el enfoque conocido en la técnica (Zhu X. et ál. 2020. J Pharm Anal. 10(3): 209–220; Firth D. et ál. 2015 Analytical Biochemistry, 485, 34-42). Brevemente, los conjugados de anticuerpos y fármacos se desglicosilaron utilizando el tratamiento con PNGasa F (New England Biolabs Rapid PNGase) y los puentes disulfuro de cisteína se redujeron para separar las subunidades de cadena pesada y ligera y la muestra se analizó mediante cromatografía líquida de fase inversa acoplada a espectrometría de masas (RPLC-MS). Tras la reducción de los puentes disulfuro de cisteína y la eliminación de los glicanos unidos a N, las cadenas

pesadas y ligeras se eluyeron en picos distintos. Los espectros sustraídos de la línea base de ionización por electrospray y los espectros de masas deconvolucionados de los picos eluidos por RPLC se utilizaron para determinar las respectivas masas de cadena pesada y ligera y la abundancia (intensidad del pico de masa) de las especies de subunidades de cadena pesada y ligera del anticuerpo conjugadas con 0, 1, 2 o 3 enlaces-fármaco para la subunidad de cadena pesada (aquí denominadas H_0 , H_1 , H_2 , H_3) y 0 o 1 enlaces-fármaco para la subunidad de cadena ligera (aquí denominadas L_0 , L_1). Los datos se utilizaron para determinar la relación promedio general entre el fármaco enlazador y el conjugado de anticuerpo (DAR) de cada conjugado de anticuerpo y fármaco. La condición de cromatografía líquida de fase inversa fue que la fase móvil A fue 0,05 % de TFA en agua, la fase móvil B fue 0,05 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. El programa de gradiente fue de 10-20% de fase móvil B en 1 min, 20-50% de fase móvil B en 9 min, velocidad de flujo 0,5 mL/min, división posterior a la columna, 2,1 x 50 mm Halo Difenil 2,7 μ m, 80°C. El espectrómetro de masas fue Waters Xevo G2-XS QToF, con Acquity i-Class UPLC. El procesamiento de datos de espectros de masas fue realizado por ProMass HR para el software MassLynx (Waters Limited).

[00148] El número promedio de moléculas de fármaco conjugadas al anticuerpo se determinó para cada conjugado de fármaco anticuerpo utilizando las siguientes fórmulas: Carga útil promedio del enlazador conjugada a la cadena ligera = $(\text{intensidad máxima de masa de } L_0 \times 0 / (1 \times \text{intensidad máxima de masa de } L_1 + 0 \times \text{intensidad máxima de masa de } L_0)) + (\text{intensidad máxima de masa de } L_1 \times 1 / (1 \times \text{intensidad máxima de masa de } L_1 + 0 \times \text{intensidad máxima de masa de } L_0))$. Carga media del enlazador conjugada con la cadena pesada = $(\text{intensidad máxima de masa de } H_0 \times 0 / (0 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_0 + 1 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_1 + 2 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_2 + 3 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_3)) + (\text{intensidad máxima de masa de } H_1 \times 1 / (0 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_0 + 1 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_1 + 2 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_2 + 3 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_3)) + (\text{intensidad máxima de masa de } H_2 \times 2 / (0 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_0 + 1 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_1 + 2 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_2 + 3 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_3)) + (\text{intensidad máxima de masa de } H_3 \times 3 / (0 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_0 + 1 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_1 + 2 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_2 + 3 \times \text{intensidad máxima de masa de } H_3))$. Número promedio de moléculas de fármaco conjugadas con anticuerpo compuesto por dos subunidades de cadena ligera y dos de cadena pesada = $(2 \times \text{carga promedio del enlazador conjugada con la cadena ligera} + 2 \times \text{carga promedio del enlazador conjugada con la cadena pesada})$.

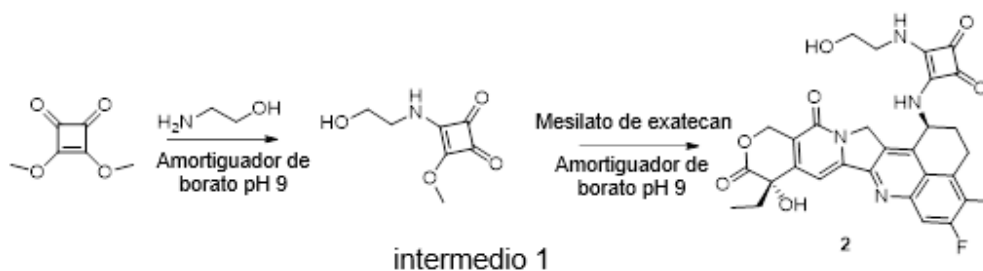
[00149] La masa observada de la cadena pesada del anticuerpo anti-TROP2 sin fármaco enlazador (H_0) fue de 49208,8 Da (daltons) y la masa observada de la cadena ligera sin fármaco enlazador (L_0) fue de 23343,8 Da. La masa observada de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER2 sin fármaco y

enlazador (H_0) fue de 49123,9 Da y la masa observada de la cadena ligera sin fármaco y enlazador (L_0) fue de 23456,2 (Da). La masa observada de la cadena pesada del anticuerpo anti-EGFR **1** sin fármaco enlazador (H_0) fue 48 897,5 (Da) y la masa observada de la cadena ligera sin fármaco de enlazador (L_0) fue 23 357,3 (Da). La masa observada de cadena pesada de anticuerpo anti-EGFR **3** sin fármaco y enlazador (H_0) fue de 49508 (Da) y la de la cadena ligera sin fármaco y enlazador (L_0) observada fue de 23317 (Da). La masa observada de la cadena pesada del anticuerpo anti-EGFR **4** sin fármaco enlazador (H_0) fue de 49552 (Da) y la cadena ligera observada sin fármaco enlazador (L_0) fue de 23317 (Da). Las masas respectivas observadas de la cadena pesada con un fármaco enlazador (H_1) fueron ($H_0 + 1x$ peso molecular del fármaco enlazador), la cadena pesada con dos fármacos enlazadores (H_2) fue ($H_0 + 2x$ peso molecular del fármaco enlazador), la cadena pesada con tres fármacos enlazadores (H_3) fue ($H_0 + 3x$ peso molecular del fármaco enlazador). Las masas respectivas observadas de la cadena ligera con un fármaco enlazador (L_1) fueron ($L_0 + 1x$ peso molecular del fármaco enlazador), donde los pesos moleculares respectivos de los fármacos enlazadores se proporcionan en los procedimientos sintéticos.

[00150] Además, se determinó la DAR mediante la comparación del ADC conjugado con el mismo fármaco-enlazador utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa reducida (RP-HPLC). Los anticuerpos parentales (no conjugados) en PBS (pH 7,4) se prepararon con una concentración de muestra de 1 mg/mL. Las muestras de ADC (en amortiguador de muestra original de 10 mM de acetato de sodio (pH 5,0), 130 mM de NaCl y 10 % (peso/vol.) de sacarosa) se prepararon con una concentración de 1 mg/ml (con respecto a la proteína) y se añadió un volumen de 0,1 M de Tris (pH 8,5) a una concentración final de 20 mM de Tris para ayudar a elevar el pH. Se añadió ditiotreitól (DTT, formato No-Weigh™ ThermoScientific) a las muestras de anticuerpos y ADC a una concentración de 50 mM, y las muestras se incubaron a 40 °C durante 5 minutos. Se añadió inmediatamente un volumen igual de 0,1 % (vol./vol.) de ácido trifluoroacético (TFA, FisherChemical) en agua a cada muestra de anticuerpo y ADC después de la reducción con DTT. La cromatografía de fase inversa desnaturizante se realizó en un sistema HPLC Agilent 1260 con muestreador automático termostatzado (10 °C). Las muestras (5 µg de proteína total cargada) se analizaron con una × columna Agilent AdvanceBio RP-mAb Difenil 2,1 de 50 mm (partículas de 3,5 µm con poros superficiales de 450 Å) utilizando una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. La elución en gradiente se realizó a 80 °C con 30–70% de fase móvil 'B' (0,1% (vol./vol.) de TFA en acetonitrilo) durante 10 minutos y fase móvil 'A' compuesta de 0,1% (vol./vol.) de TFA en agua. La detección de UV se controló a 220, 280 y 370 nm, con resta de línea base de la señal a 405 nm (para 220 y 280 nm) o 600 nm (para la señal de detección de 370 nm). Como se sabe en la técnica, los tiempos de retención dependen de la hidrofobicidad del compuesto. En comparación con la cadena pesada sin enlazador-fármaco (H_0), la cadena pesada conjugada con un enlazador-fármaco (H_1), dos enlazadores-fármacos (H_2) y tres enlazadores-fármacos

(H₃) fueron progresivamente más hidrófobas. En comparación con la cadena ligera sin enlazador-fármaco (L₀), la cadena ligera conjugada con un enlazador-fármaco (L₁) fue más hidrófoba. Para cada ADC, los picos detectados en los cromatogramas RP-HPLC se asignaron a L₀, L₁, H₀, H₁, H₂ y H₃ mediante la comparación de los tiempos de retención con L₀ y H₀ del anticuerpo monoclonal original, la comparación de la señal de detección de 280 nm y 370 nm (aquí se describe que las cargas útiles del enlazador absorben a 370 nm) y la comparación con los valores conocidos de DAR de LC/MS de cadenas pesadas y ligeras. Las cadenas pesadas y ligeras se eluyeron en el siguiente orden: L₀, L₁, H₀, H₁, H₂ y H₃. Para los ADC para los cuales se determinó DAR según el procedimiento RP-HPLC, las áreas de pico respectivas de L₀, L₁, H₀, H₁, H₂ y H₃ detectadas a 280 nm se normalizaron mediante los respectivos coeficientes de extinción de cada especie de DAR (L₀, L₁, H₀, H₁, H₂ y H₃) a 280 nm. Como se sabe en la técnica, los coeficientes de extinción molar L₀ y H₀ se estimaron en función de la secuencia de aminoácidos respectiva para cada anticuerpo monoclonal (M⁻¹cm⁻¹). El coeficiente de extinción molar de las cargas útiles del enlazador a 280 nm se estimó utilizando la ley de Beer, 5000-6100 M⁻¹cm⁻¹. Coeficiente de extinción molar L₁ = (coeficiente de extinción molar L₀ + 1x coeficiente de extinción molar enlazador-carga útil). Coeficiente de extinción molar H₁ = (coeficiente de extinción molar H₀ + 1x coeficiente de extinción molar enlazador-carga útil), Coeficiente de extinción molar H₂ = (coeficiente de extinción molar H₀ + 2x coeficiente de extinción molar enlazador-carga útil), Coeficiente de extinción molar H₃ = (coeficiente de extinción molar H₀ + 3x coeficiente de extinción molar enlazador-carga útil). El número promedio de moléculas de fármaco conjugadas al anticuerpo se determinó para cada conjugado de fármaco y anticuerpo utilizando las siguientes fórmulas y áreas de pico normalizadas por los respectivos coeficientes de extinción: Carga activa promedio del enlazador conjugada a la cadena ligera = (área de pico de L₀ x 0/(1 x área de pico de L₁ + 0 x área de pico de L₀)) + (área de pico de L₁ x 1/(1 x área de pico de L₁ + 0 x área de pico de L₀)). Carga útil promedio del enlazador conjugada a la cadena pesada = área de pico de H₀ x 0/ (0 x área de pico de H₀ + 1 x área de pico de H₁ + 2 x área de pico de H₂ + 3 x área de pico de H₃)) + (área de pico de H₁ x 1/ (0 x área de pico de H₀ + 1 x área de pico de H₁ + 2 x área de pico de H₂ + 3 x intensidad de área de H₃)) + (área de pico de H₂ x 2/ (0 x área de pico de H₀ + 1 x área de pico de H₁ + 2 x área de pico de H₂ + 3 x área de pico de H₃)) + (área de pico de H₃ x 3/ (0 x área de pico de H₀ + 1 x área de pico de H₁ + 2 x área de pico de H₂ + 3 x área de pico de H₃)). La cantidad de promedio de moléculas de fármaco conjugadas a anticuerpo compuesto de dos subunidades de cadena ligera y dos de cadena pesada = (2x average linker drug conjugated to light chain + 2x promedio de fármaco y anticuerpo conjugado con la cadena pesada).

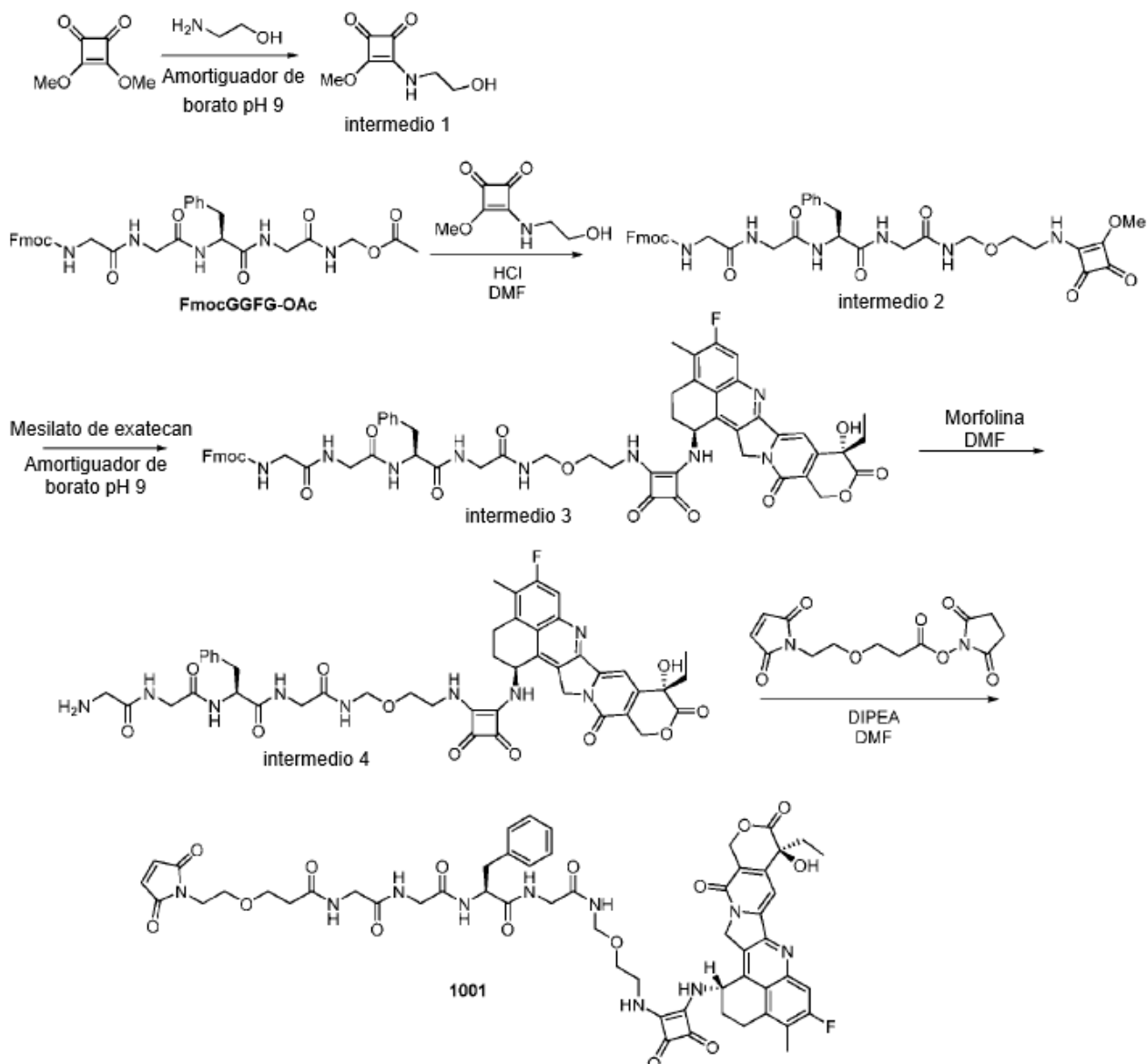
Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 2



[00151] Intermedio 1. Una mezcla de etanolamina (23 mg, 0,4142 mmol) y dimetoxiescuarato (3 equiv., 177 mg, 1,242 mmol) se suspendió en 10 mL de amortiguador borato 1 M (pH = 9) y la mezcla se agitó a 55 °C durante 16 horas. Se agregaron 2 mL de DMF y se evaporaron los solventes a presión reducida hasta un volumen final de aproximadamente 3 mL. La mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 50 % de ACN en H₂O). El producto deseado se recuperó como un polvo blanco, después de la liofilización a partir de agua (46 mg, 65 %). Cálculo MS para C₇H₁₀NO₄: 172,06, observado: 172,25, [M+H]⁺.

[00152] Compuesto 2. El mesilato de exatecan (20 mg, 0,0377 mmol) y el intermedio 1 previamente sintetizado (1,5 equiv., 9,7 mg, 0,0564) se suspendieron en 5 mL de amortiguador de borato 1 M (pH = 9) y la mezcla se agitó a 55 °C durante 16 horas. Se añadieron 2 mL de DMF y los disolventes se evaporaron a presión reducida hasta un volumen final de aprox. 3 mL. La mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 50 % de ACN en H₂O). El producto deseado se recuperó como un polvo blanco después de la liofilización de agua (12 mg, 57 %). MS calc. para C₃₀H₂₈FN₄O₇: 575,19, observado: 575,45, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,45 (s, 1H), 7,83 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 5,79 (s, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,29 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 3,68 – 3,43 (m, 4H), 3,23 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 2,42 (d, *J* = 1,9 Hz, 3H), 2,33 (td, *J* = 5,7, 4,8, 2,9 Hz, 1H), 1,96 – 1,78 (m, 2H), 1,76 (s, 1H), 1,26 – 1,15 (m, 2H), 0,87 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto 1001



[00153] Intermedio 1. Se disolvieron etanolamina (100 mg, 1,637 mmol) y dimetoxiescarato (1,2 equiv., 1,964 mmol, 279 mg) en 10 mL de amortiguador de borato 1 M (pH 9). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El disolvente se evaporó a presión reducida, el sólido resultante se redisolvió en DMF y se cargó directamente en la columna. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 40 g de C18 y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 20 % ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco, después de la liofilización a partir de agua (205 mg, 73 %). MS calc. para $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_4$: 172,06, observado: 172,17, $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[00154] Intermedio 2. El intermedio 1 (10 mg, 0,058 mmol) y el péptido de partida FmocGGFG-OAc (1 equiv., 0,058 mmol, 37 mg) se disolvieron en 2 mL de DMF anhidro en atmósfera de argón y se

añadieron 100 µL de HCl (2 M en Et₂O). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna semipreparativa que contenía 25 g de C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 80 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (25 mg, 58 %). Cálculo MS para C₃₈H₄₀N₆NaO₁₀: 763,27, observado: 763,80, [M + Na]⁺.

[00155] Intermedio 3. El intermedio 2 (25 mg, 0,0338 mmol) y mesilato de exatecan (1,5 equiv., 0,508 mmol, 27 mg) se suspendieron en 4 mL de amortiguador de borato 1 M (pH 9) y la mezcla de reacción se agitó a 55 °C durante 4 horas. Se añadió DMF (2 mL) y se evaporaron los disolventes a presión reducida hasta un volumen final de aproximadamente 2 mL. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 100 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua y dioxano (11 mg, 28 %). Cálculo MS para C₆₁H₅₉FN₉O₁₃: 1144,42: 1144,42, observado: 1144,01, [M + H]⁺.

[00156] Intermedio 4. El intermedio 3 (11 mg, 0,0096 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF y se añadió morfolina (20 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm y se cargó directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 100 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido amarillento después de la liofilización de agua y dioxano (7,5 mg, 88 %). MS calc. para C₄₆H₅₀FN₉O₁₁: 923,36, observado: 923,75, [M + H]⁺.

[00157] Compuesto 1001. El intermedio 4 (7,5 mg, 0,0081 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se añadieron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2 equiv., 0,0163 mmol, 5 mg) y DIPEA (20 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, la mezcla se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm y se cargó directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 80 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (7 mg, 77 %). MS calc. para C₅₅H₅₈FN₁₀O₁₅: 1117,41, observado: 1117,44, [M + H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,80 (s, 1H), 8,62 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,15 (d, *J* = 33,5 Hz, 1H), 8,02 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,82 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,36 – 7,20 (m, 4H), 7,19 – 7,12 (m, 2H), 6,68 (s, 1H), 6,05 (t, *J* = 20,7 Hz, 1H), 5,86 (s, 1H), 5,75 (s, 1H), 5,30 (d, *J* = 23,9 Hz, 1H), 5,18 (m, 2H), 4,85 (d, *J* = 11,1 Hz, 2H), 4,66 – 4,54 (m, 1H), 4,54 (s, 2H), 4,44 (m, 1H), 3,85 – 3,79 (m, 1H), 3,70 – 3,65 (m, 3H), 3,56 – 3,47 (m, 2H), 3,47 – 3,42 (m, 1H), 3,41 – 3,36 (m, 1H),

3,17 (s, 1H), 3,07 – 2,97 (m, 2H), 2,85 – 2,69 (m, 4H), 2,67 – 2,52 (m, 2H), 2,44 – 2,36 (m, 3H), 2,33 – 2,23 (m, 1H), 1,97 (m, 2H), 1,82 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 1,23 (s, 2H), 0,87 – 0,81 (m, 3H).

Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto 3002

[00158] El compuesto 3002 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales del Ejemplo 1 utilizando 13 equivalentes molares del compuesto de carga útil del enlazador 1001 para el anticuerpo monoclonal anti-HER2 IgG1. La relación fármaco-anticuerpo (DAR) para el conjugado fármaco-anticuerpo anti-HER2 basada en RPLC-MS fue 3,7 con base en un peso molecular del enlazador-fármaco de 1117 Da.

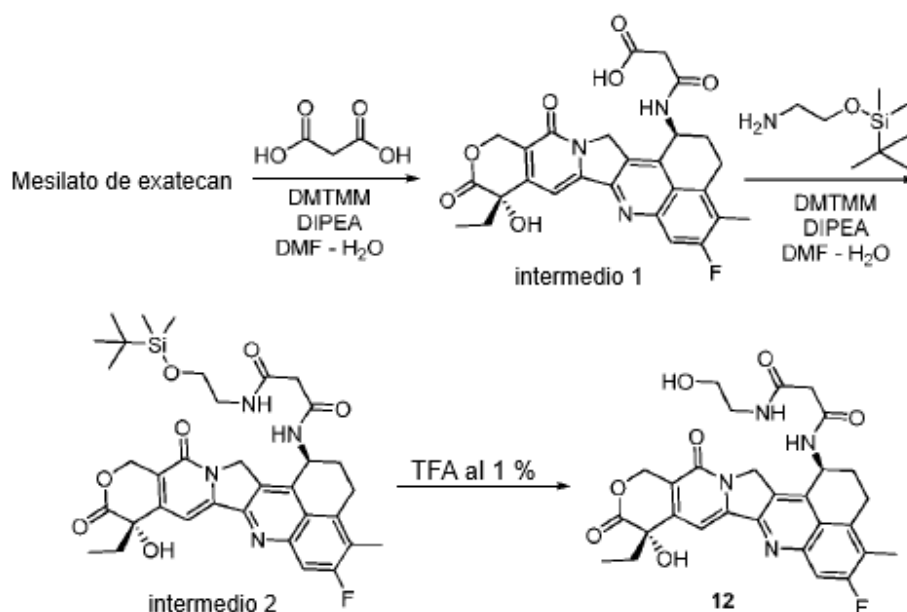
Ejemplo 5: Síntesis de los compuestos 3028A y 3028B

[00159] El Compuesto 3028A se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 21 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1001 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. El DAR basado en RPLC-MS fue de 4,21 basado en un peso molecular del fármaco enlazador de 1117 Da. Cuando se preparó de acuerdo con el Procedimiento B usando 39 equivalentes molares del compuesto de carga útil del enlazador 1001 al anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2, se logró una DAR de 7,5 para proporcionar el compuesto 3028B.

Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 3050

[00160] El Compuesto 3050 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 13 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1001 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 4,5 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1117 Da.

Ejemplo 7: Síntesis del Compuesto 12



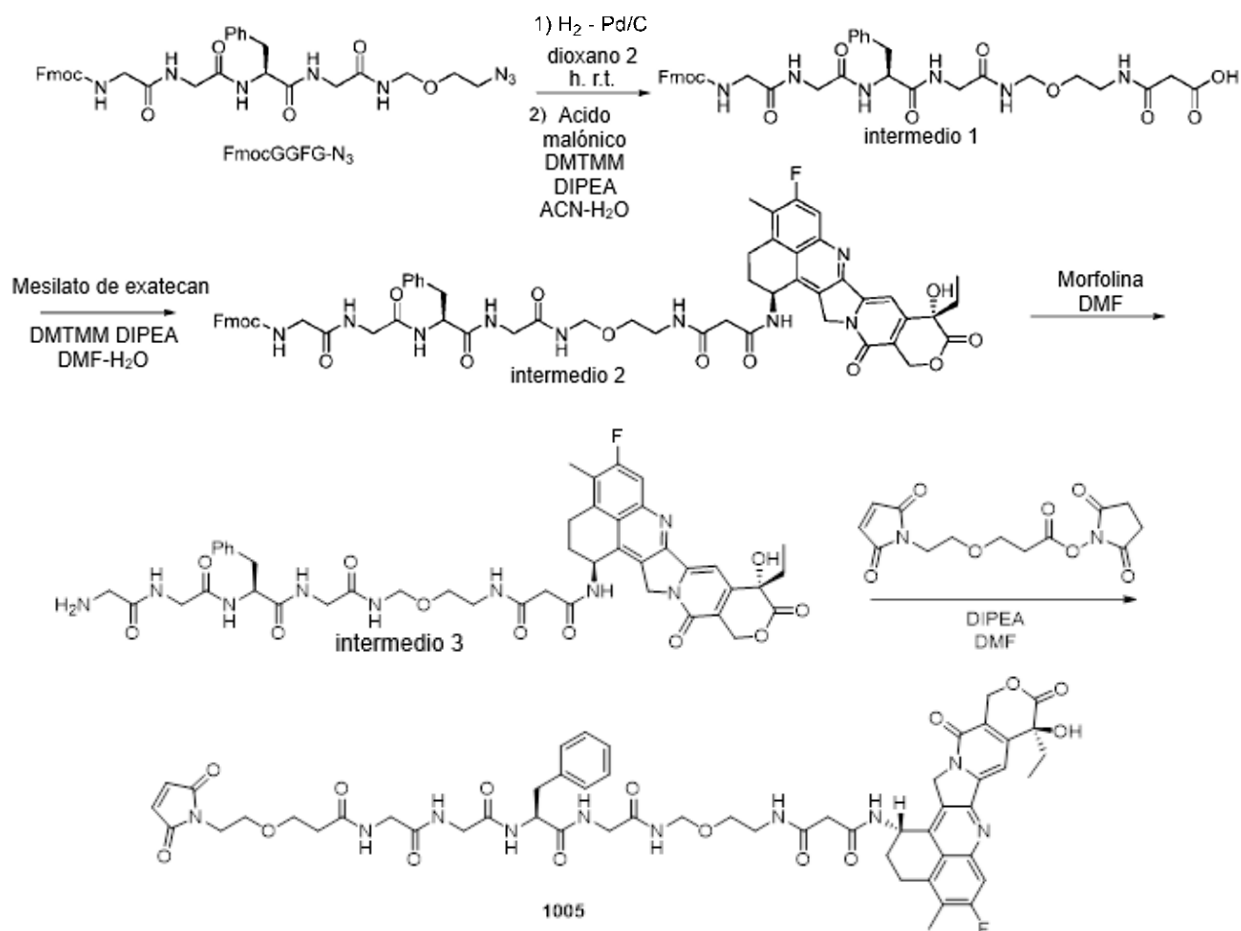
[00161] Intermedio 1. Se disolvieron mesilato de exatecan (39 mg, 0,0737 mmol), ácido malónico (5 equiv., 0,3687 mmol, 38 mg) y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio (DMTMM, 5 equiv., 0,3687 mmol, 102 mg) en una mezcla 5:1 de DMF y agua (6 mL). Se agregó trietilamina (50 equiv., 3,6873 mmol, 514 μ L) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas.

Los disolventes se evaporaron a presión reducida y la mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y usando un gradiente de ACN en TFA al 1 % de (0 $\rightarrow$ 40 % de ACN en TFA al 1 %). El producto deseado se recuperó como un polvo blanco después de la liofilización de agua (34 mg, 88 %). Cálculo MS para $C_{27}H_{23}FN_3O_7$: 520,15, encontrado: 520,49 $[M-H]^-$.

[00162] Intermedio 2. El intermedio 1 previamente sintetizado (24 mg, 0,0461 mmol), 2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etan-1-amina (5 equiv., 0,2303 mmol, 48 μ L) y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio (DMTMM, 5 equiv., 0,2303 mmol, 64 mg) se disolvieron en una mezcla 5:1 de DMF y agua (6 mL). Se agregó trietilamina (50 equiv., 2,303 mmol, 321 μ L) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 hora. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y la mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y usando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 70 % de ACN en H_2O). El producto deseado se recuperó como una espuma amarillenta, después de la liofilización a partir de agua y DMF (7 mg, 22 %). MS calc. para $C_{35}H_{44}FN_4O_7Si$: 679,30, encontrado: 679,00, $[M+H]^+$.

[00163] Compuesto 12. El intermedio 2 previamente sintetizado (7 mg, 0,0103 mmol) se suspendió en TFA al 1 % (2 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción en bruto se cargó directamente en la columna y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y usando un gradiente de ACN en TFA al 1 % (0 $\rightarrow$ 40 % de ACN en TFA al 1 %). El producto deseado se recuperó como un polvo amarillento, después de la liofilización a partir de agua (3 mg, 53 %). MS calc. para $C_{29}H_{30}FN_4O_7$: 565,21, observado: 565,70, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,62 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 8,05 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 7,80 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 5,58 – 5,54 (m, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,26 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 3,38 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 3,18 (s, 2H), 3,15 – 3,04 (m, 2H), 2,58 – 2,52 (m, 2H), 2,46 (m, 3H), 2,25 – 2,16 (m, 1H), 2,11 (s, 1H), 1,87 (m, 2H), 1,76 (s, 2H), 0,88 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

Ejemplo 8: Síntesis del Compuesto 1005



[00164] Intermedio 1. Se disolvió FmocGGFG-N₃ (23 mg, 0,0350 mmol) en 2 mL de dioxano. Se suspendió Pd/C (10 % p/p, 5 mg) en la mezcla y se burbujeó H₂ usando un globo en la suspensión mientras se agitaba a temperatura ambiente durante 2 h. La suspensión se tomó con una jeringa y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 μm directamente en un matraz que contenía una solución previamente preparada de ácido malónico (5 equiv., 0,1750 mmol, 18 mg), DMTMM (5 equiv., 0,1750 mmol, 48 mg) y DIPEA (100 μL) en ACN (2 mL) y agua (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los disolventes se evaporaron a presión reducida, el sólido resultante se redisolvió en DMF y se cargó directamente en una columna. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 40 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (15 mg, 60 %). Cálculo MS para C₃₆H₄₁N₆O₁₀: 715,27, encontrado: 715,55 [M - H]⁻.

[00165] Intermedio 2. El intermedio 1 (14 mg, 0,0195 mmol) se disolvió en una mezcla de DMF (2 mL) y agua (0,5 mL). A la solución se añadieron mesilato de exatecan (1,5 equiv., 0,0293 mmol, 16 mg),

DMTMM (3 equiv., 0,0587 mmol, 16 mg) y DIPEA (20 μ L), y la mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. Los disolventes se evaporaron a presión reducida, el sólido resultante se redisolvió en DMF y se cargó directamente en una columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 100 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido amarillo después de la liofilización de agua (15 mg, 66 %). MS calc. para $C_{60}H_{61}FN_9O_{13}$: 1134,44, encontrado: 1134,40 [M + H]⁺.

[00166] Intermedio 3. El Intermedio 2 (15 mg, 0,0132 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF y se agregó morfolina (20 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 μ m y se cargó directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 100 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido amarillo después de la liofilización de agua y dioxano (10 mg, 83 %). MS calc. para $C_{45}H_{51}FN_9O_{11}$: 912,37, encontrado: 912,91 [M + H]⁺.

[00167] Compuesto 1005. El Intermedio 3 (10 mg, 0,0110 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2 equiv., 0,0219 mmol, 7 mg) y DIPEA (20 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, la mezcla se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 μ m y se cargó directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 80 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido amarillo después de la liofilización de agua y dioxano (11 mg, 90 %). MS calc. para $C_{54}H_{60}FN_{10}O_{15}$: 1107,42, observado: 1107,50 [M + H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,67 (m, 1H), 8,61 (m, 1H), 8,52 (m, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,12 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 7,81 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,28 (m, 4H), 7,25 – 7,24 (m, 2H), 7,212 (s, 1H), 7,15 (m, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,09 – 6,00 (m, 1H), 5,58 – 5,47 (m, 1H), 5,19 – 5,08 (m, 2H), 4,88 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 4,65 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 4,50 (dd, *J* = 11,7, 6,6 Hz, 1H), 4,47 (m, 2H), 3,78 – 3,63 (m, 3H), 3,63 – 3,52 (m, 4H), 3,19 (m, 3H), 3,11 – 3,01 (m, 4H), 2,63 (p, *J* = 1,9 Hz, 5H), 2,43 – 2,36 (m, 6H), 2,24 – 2,14 (m, 1H), 1,75 (m, 2H), 1,23 (s, 2H), 0,85 (dd, *J* = 7,9, 6,3 Hz, 3H).

Ejemplo 9: Síntesis del Compuesto 3003

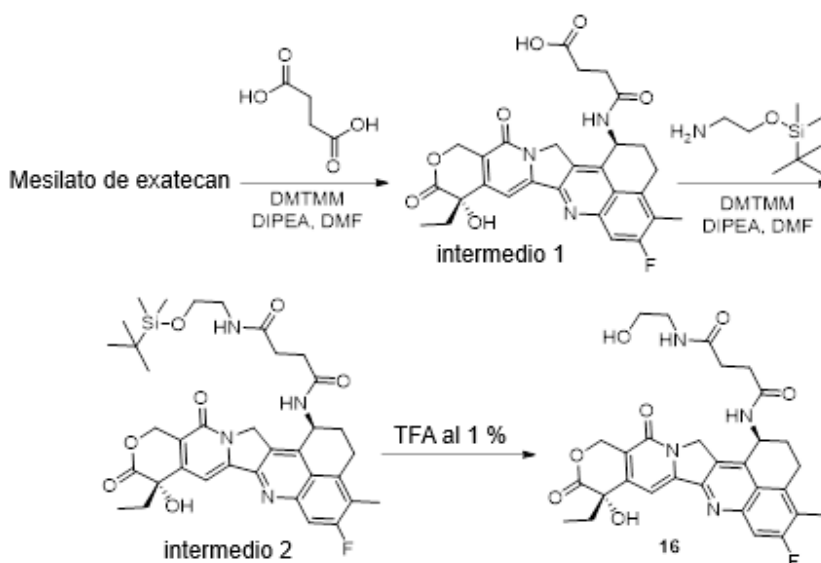
[00168] El Compuesto 3003 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 2 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1005 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 2,1 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1107 Da.

Ejemplo 10: Síntesis de los compuestos 3029A y 3029B

[00169] El Compuesto 3029A se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 2 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1005 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 1,2 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1107 Da. Cuando se utilizaron 27 equivalentes molares del compuesto de carga útil del enlazador 1005 con el anticuerpo monoclonal anti-TROP2 IgG1, se logró un DAR de 4,4 para proporcionar el compuesto 3029B.

Ejemplo 11: Síntesis de los Compuestos 3051A y 3051B

[00170] El Compuesto 3051A se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 2 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1005 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 1,9 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1107 Da. Cuando se usaron 27 equivalentes molares de compuesto de carga de enlazador 1005 al anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1, se logró una DAR de 3,14 para proporcionar el compuesto 3051B.

Ejemplo 12: Síntesis del Compuesto 16

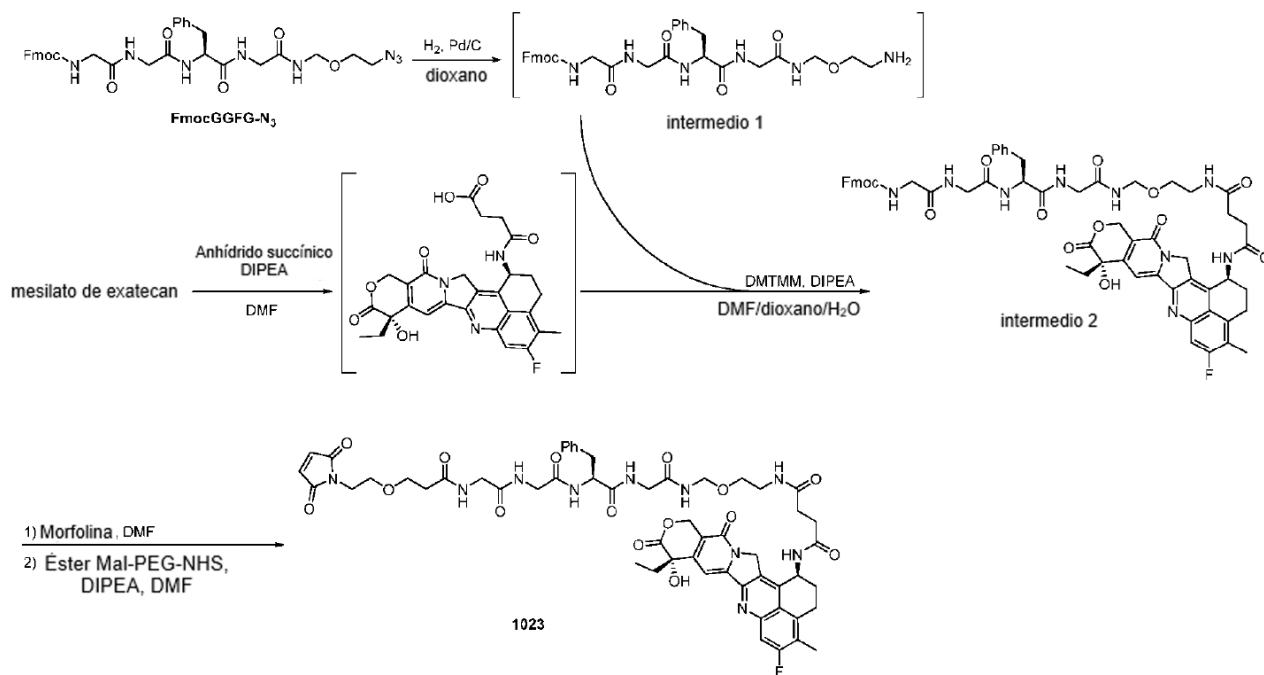
[00171] Intermedio 1. Se disolvieron mesilato de exatecan (20 mg, 0,0376 mmol), ácido succínico (5 equiv., 0,1881 mmol, 22 mg) y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolino (DMTMM, 5 equiv., 0,1881 mmol, 53 mg) en una mezcla 5:1 de DMF y agua (4 mL). Se agregó trietilamina (200 µL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y la mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y usando un gradiente de ACN en TFA al 1 % de (0 → 40 % de ACN en TFA al 1 %). El producto deseado se recuperó como un

polvo marrón, después de la liofilización a partir de agua y dioxano (18 mg, 89 %). Cálculo MS para $C_{28}H_{25}FN_3O_7$: 534,17, encontrado: 534,80 $[M-H]^-$.

[00172] Intermedio 2. El intermedio 1 previamente sintetizado (15 mg, 0,0424 mmol), 2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etan-1-amina (3 equiv., 0,1272 mmol, 22 mg) y hexafluorofosfato de azabenzotriazol tetrametil uronio (HATU, 3 equiv., 0,1272 mmol, 48 mg) se disolvieron en DMF (1 mL). Se agregó diisopropiletilamina (50 μ L) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y la mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y usando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 80 % de ACN en H_2O). El producto deseado se recuperó como una espuma amarilla después de la liofilización de agua y dioxano (22 mg, 74 %). MS calc. para $C_{36}H_{46}FN_4O_7Si$: 693,31, encontrado: 693,55, $[M+H]^+$.

[00173] Compuesto 16. El intermedio 2 previamente sintetizado (22 mg, 0,0317 mmol) se suspendió en TFA al 1 % (2 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción en bruto se cargó directamente en la columna y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y usando un gradiente de ACN en TFA al 1 % (0 $\rightarrow$ 40 % de ACN en TFA al 1 %). El producto deseado se recuperó como un polvo blanco después de la liofilización de agua (11 mg, 60 %). MS calc. para $C_{30}H_{32}FN_4O_7$: 579,23, observado: 579,25, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,46 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,82 (m, 1H), 7,79 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 5,56 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,30 – 5,10 (m, 2H), 3,47 (m, 2H), 3,35 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,18 (m, 2H), 3,07 (td, J = 6,1, 4,4 Hz, 2H), 2,56 – 2,52 (m, 2H), 2,42 – 2,32 (m, 5H), 2,12 (q, J = 5,3 Hz, 2H), 1,95 – 1,79 (m, 2H), 0,88 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 13: Síntesis del Compuesto 1023



[00174] Intermedio 1. A la solución de FmocGGFG-N₃ (1,0 equiv., 26 mg, 0,040 mmol) en dioxano (1,5 ml) se añadió Pd/C (10 % p/p, 5 mg) y la suspensión resultante se hidrogenó. La mezcla de reacción se hidrogenó (globo) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. El análisis por LC-MS confirmó el consumo completo del material de partida. La suspensión se filtró y el intermedio 1 se obtuvo como solución en dioxano, que se utilizó directamente en el siguiente paso. Cálculo de MS para C₃₃H₃₉N₆O₇: 631,29, encontrado: 631,30, [M+H]⁺.

[00175] Intermedio 2. A la mezcla de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 20 mg, 0,037 mmol) y anhídrido succínico (1,1 equiv., 4,1 mg, 0,041 mmol) se añadió DMF (0,5 mL) y diisopropiletilamina (2,2 equiv., 14 µL, 0,082 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadió la solución del intermedio 1 en dioxano (obtenida en el paso anterior) a la mezcla de reacción, seguido de la adición de DMTMM (1,0 equiv., 11 mg, 0,037 mmol), diisopropiletilamina (1,0 equiv., 7 µL, 0,037 mmol) y agua (0,25 mL), y la solución resultante se agitó 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se concentró en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 60% ACN/ TFA al 0,1 % ac.) para obtener el producto intermedio 2 (15 mg, 35 %) como un sólido amarillo pálido después de la liofilización. Cálculo MS para C₆₁H₆₃FN₉O₁₃: 1148,45, encontrado: 1148,45, [M+H]⁺.

[00176] Compuesto 1023. Se añadió morfolina (35 µL) a la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 15 mg, 0,013 mmol) en DMF (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Luego, el DMF y el exceso de morfolina se evaporaron utilizando un evaporador rotatorio. El

residuo se volvió a disolver en DMF (0,5 mL), seguido de la adición de éster Mal-PEG-NHS (1,1 equiv., 4,4 mg, 0,014 mmol) y diisopropiletilamina (1,1 equiv., 2,5 µL, 0,014 mmol), y la solución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 70% ACN/ TFA al 0,1 % ac.) ofreció el compuesto del producto deseado 1023 (7 mg, 48 %) como un sólido de color amarillo pálido después de la liofilización. MS calc. para $C_{52}H_{62}FN_{10}O_{15}$: 1121,44, observado: 1121,45, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 8,53 – 8,42 (m, 2H), 8,29 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 8,14 – 8,07 (m, 2H), 7,99 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 7,89 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 7,79 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,27 – 7,20 (m, 4H), 7,20 – 7,12 (m, 1H), 6,99 (s, 2H), 5,55 (dt, J = 9,2, 4,8 Hz, 1H), 5,47 – 5,37 (m, 2H), 5,28 – 5,08 (m, 2H), 4,57 – 4,44 (m, 4H), 3,80 – 3,62 (m, 6H), 3,53 – 3,40 (m, 4H), 3,35 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 3,16 (dq, J = 17,4, 5,8 Hz, 4H), 3,04 (dd, J = 13,9, 4,7 Hz, 1H), 2,87 – 2,73 (m, 2H), 2,43 – 2,35 (m, 7H), 2,32 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,21 – 2,02 (m, 2H), 1,93 – 1,78 (m, 2H), 0,87 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 14: Síntesis del Compuesto 3004

[00177] El Compuesto 3004 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 17 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1023 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 4,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1121 Da.

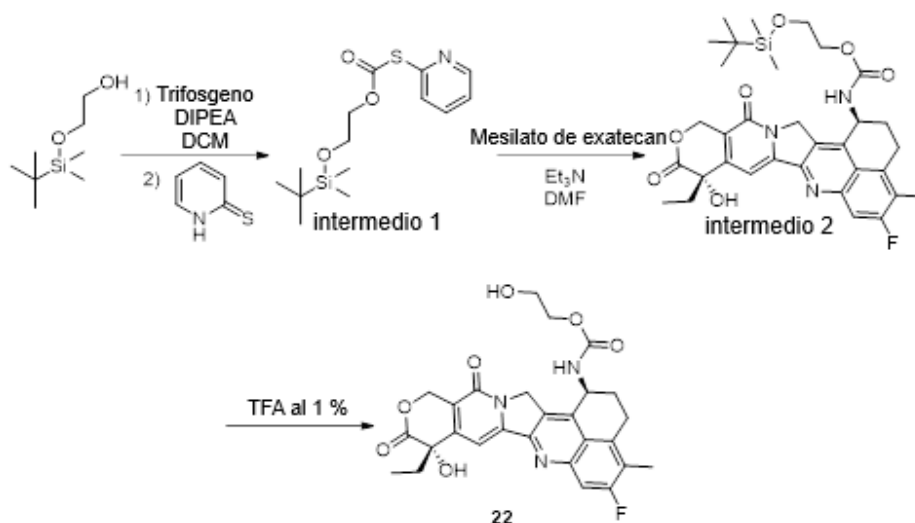
Ejemplo 15: Síntesis del Compuesto 3030

[00178] El Compuesto 3030 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 17 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1023 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,6 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1121 Da.

Ejemplo 16: Síntesis del Compuesto 3052

[00179] El Compuesto 3052 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 17 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1023 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,6 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1121 Da.

Ejemplo 17: Síntesis del Compuesto 22

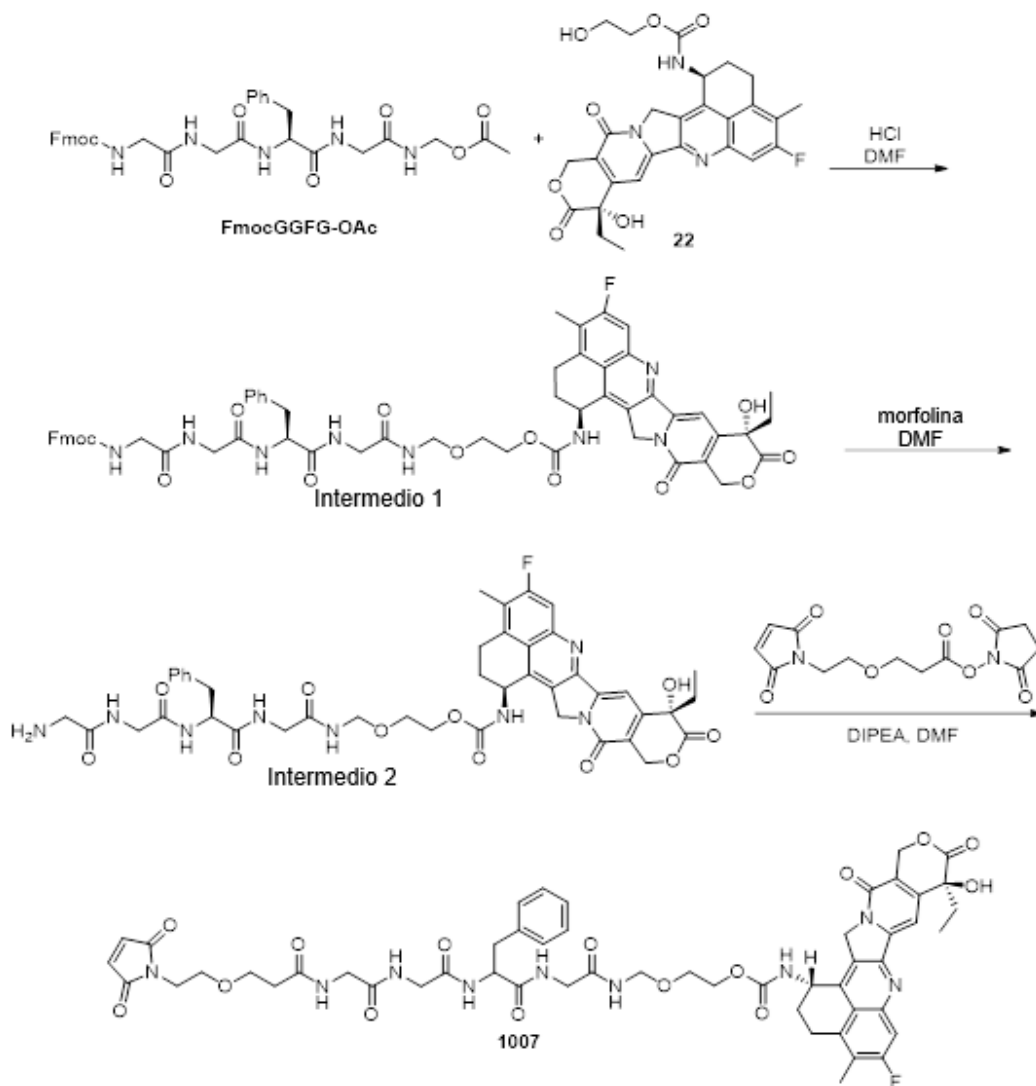


[00180] Intermedio 1. Se disolvió 2-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]etanol (1,14 mmol, 200 mg) en 4 mL de diclorometano anhidro en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió diisopropiletilamina (1,1 equiv., 1,25 mmol, 218 µL), seguida de trifosgeno (1,2 equiv., 0,45 mmol, 135 mg). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h. Se añadió más diisopropiletilamina (1,2 equiv., 1,25 mmol, 218 µL), seguida de 2-mercaptopiridina (1,1 equiv., 1,25 mmol, 155 mg). Después de agitar durante 2 horas más a 0 °C, la mezcla de reacción se diluyó con 20 mL de diclorometano y se añadió NH₄Cl saturado (10 mL). La fase orgánica se lavó con solución saturada de NH₄Cl (2 x 100 mL) y salmuera (100 mL). La cromatografía ultrarrápida en gel de sílice, utilizando un gradiente de EtOAc en ciclohexano (0 → 50% de EtOAc en ciclohexano), proporcionó el producto deseado (100 mg, 28%). Cálculo MS para C₁₄H₂₄NO₃SSi: 314,12, encontrado: 314,10, [M+H]⁺.

[00181] Compuesto 22. Se disolvieron mesilato de exatecan (0,0376 mmol, 20 mg) y trietilamina (2 equiv., 0,0752 mmol, 11 µL) en 2 mL de DMF anhidro bajo atmósfera de argón. Se añadió el intermedio 1 (1,5 equiv., 0,0752 mmol, 18 mg) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y la mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y usando un gradiente de ACN en agua (0 → 40 % de ACN en H₂O). Las fracciones que contenían el producto de reacción deseado (intermedio 2) se evaporaron, el sólido se resuspendió en TFA al 1 % y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El producto deseado Sc-122 se volvió a purificar mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol, y usando un gradiente de ACN en 1% TFA (0 → 40% ACN en 1% TFA), y se recuperó como un polvo blanco, después de la liofilización a partir de agua (16 mg, 81 % en 2 pasos, calculado en Exatecan). MS calc. para C₂₇H₂₇FN₃O₇: 524,18, observado: 524,20, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,97 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,32 –

5,16 (m, 2H), 4,11 (m, 2H), 3,33 (s, 1H), 3,25 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 3,11 (d, $J = 18,7$ Hz, 1H), 2,68 (m, 1H), 2,55 (m, 2H), 2,39 – 2,29 (m, 4H), 2,24 – 2,12 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 0,88 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Ejemplo 18: Síntesis del Compuesto 1007



- 5 **[00182] Intermedio 1.** El compuesto 22 (28 mg, 0,0535 mmol) y FmocGGFG-OAc (2 equiv., 0,107 mmol, 67 mg) se disolvieron en 1 mL de DMF anhidro. Se agregó HCl (100 μ L, 2 M en Et₂O) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se cargó directamente en la columna. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna que contenía 25 g de C18 y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 70 % de ACN en agua). El
- 10 producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (23 mg, 39 %). Cálculo MS para C₅₈H₅₈FN₈O₁₃: 1093,41, encontrado: 1093,63, [M + H]⁺.

[00183] Intermedio 2. El intermedio 1 (23 mg, 0,0211 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF anhidra y se

añadió morfolina (100 μ L). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía 25 g de C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 100 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (16 mg, 85 %). MS calc. para $C_{43}H_{48}FN_8O_{11}$: 871,34, encontrado: 871,44, $[M + H]^+$.

[00184] Compuesto 1007. El Intermedio 2 (16 mg, 0,0179 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2 equiv., 0,0358 mmol, 11 mg) y DIPEA (20 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, la mezcla se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 μ m y se cargó directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 100 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (7 mg, 37 %). MS calc. para $C_{52}H_{57}FN_9O_{15}$: 1066,40, observado: 1065,98, $[M + H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,79 (s, 1H), 8,65 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 8,58 – 8,49 (m, 1H), 8,45 (m, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,31 – 8,22 (m, 1H), 8,15 – 8,08 (m, 2H), 8,07 – 7,96 (m, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,79 (t, J = 11,5 Hz, 2H), 7,34 – 7,28 (m, 1H), 7,25 – 7,17 (m, 3H), 7,01 (d, J = 10,9 Hz, 2H), 6,67 (s, 1H), 6,61 – 6,46 (m, 1H), 5,42 (s, 1H), 5,39 – 5,28 (m, 1H), 5,26 – 5,23 (m, 2H), 5,15 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 4,57 (m, 2H), 4,49 (d, J = 11,1 Hz, 2H), 4,18 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 3,77 – 3,63 (m, 3H), 3,61 (m, 2H), 3,58 – 3,42 (m, 3H), 3,25 – 3,17 (m, 1H), 3,04 (s, 2H), 2,77 (dd, J = 8,5, 5,5 Hz, 1H), 2,47 – 2,29 (m, 4H), 2,20 – 2,11 (m, 1H), 2,00 (m, 1H), 1,86 (m, 2H), 1,23 (s, 2H), 0,97 – 0,82 (m, 3H).

Ejemplo 19: Síntesis del Compuesto 3005

[00185] El Compuesto 3005 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 12 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1007 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 4,7 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1066 Da.

Ejemplo 20: Síntesis del Compuesto 3031

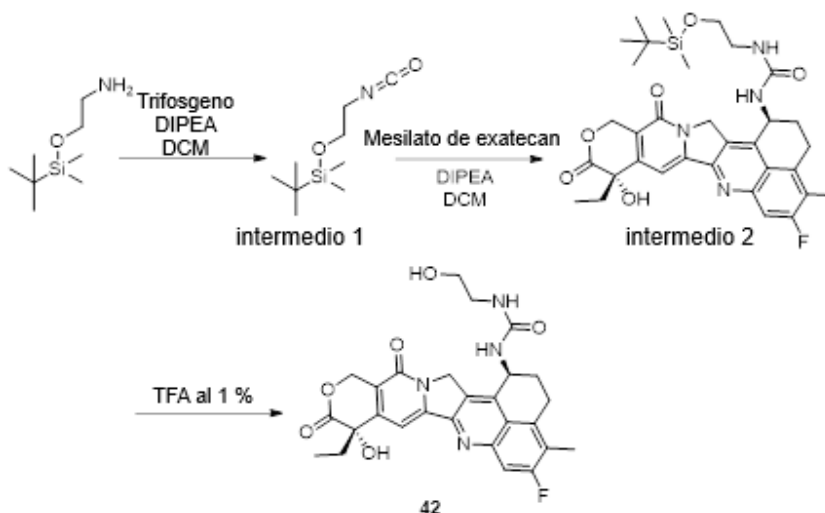
[00186] El Compuesto 3031 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1007 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,2 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1066 Da.

Ejemplo 21: Síntesis de los compuestos 3053A y 3053B

[00187] El Compuesto 3053A se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos

generales en el Ejemplo 1 con 12 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1007 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 3,5 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1066 Da. Las relaciones molares de mAb y carga útil del enlazador se ajustaron para lograr un DAR de 7,7 (compuesto 3053B).

5 **Ejemplo 22: Síntesis del Compuesto 42**

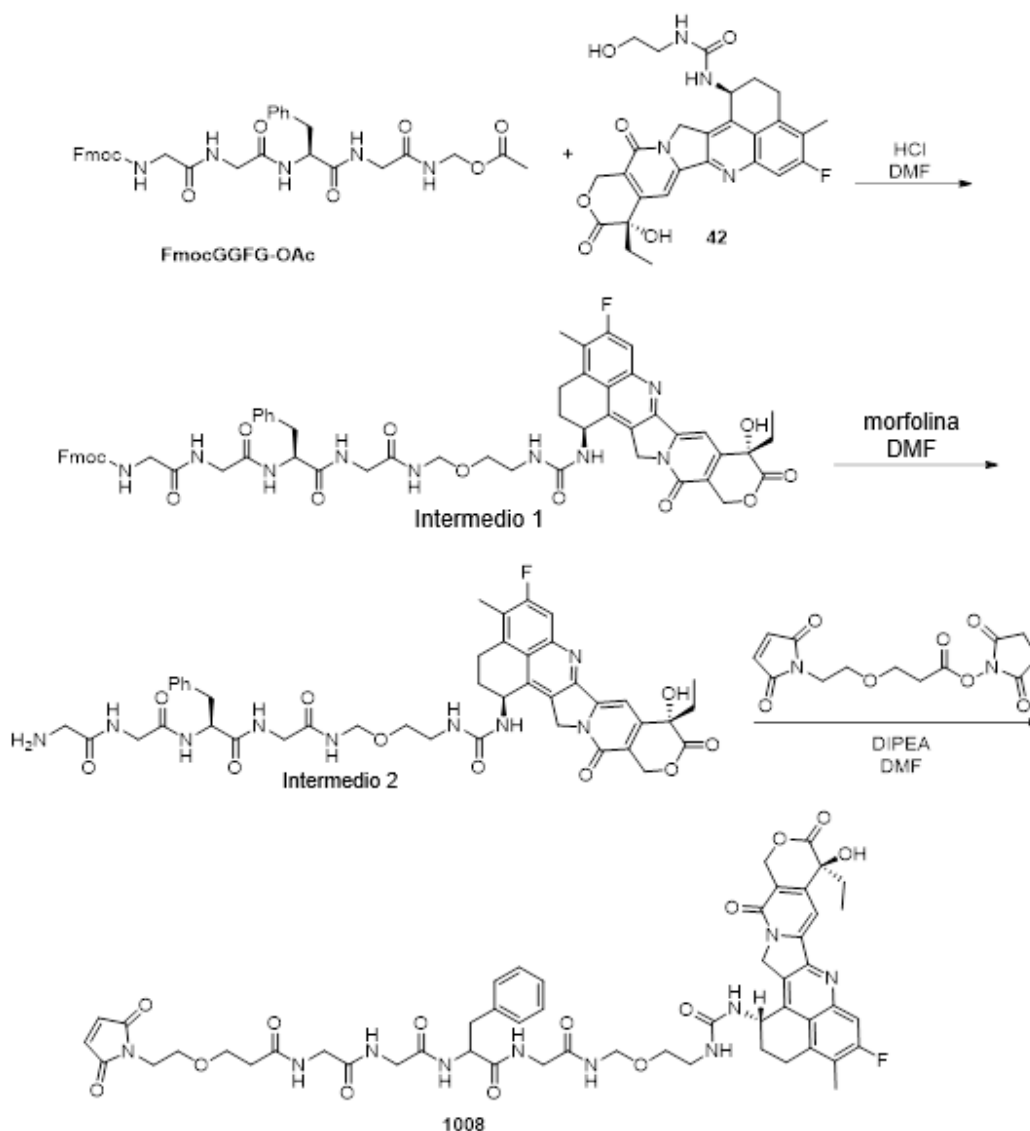


[00188] Intermedio 1. Se disolvieron 2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etan-1-amina (21 mg, 0,121 mmol), trifosgeno (0,95 equiv., 0,0383 mmol, 11 mg) y diisopropiletilamina (5 equiv., 0,605 mmol, 105 μ L) en diclorometano (2 mL) bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La conversión completa de la reacción para obtener el intermedio 1 se confirmó mediante análisis LCMS. El producto en bruto se utilizó directamente en el paso siguiente sin purificación adicional.

[00189] Compuesto 42. Se disolvieron mesilato de exatecan (0,0602 mmol, 32 mg) y diisopropiletilamina (2 equiv., 0,120 mmol, 21 μ L) en 1 mL de DMF anhidro y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió una solución de diclorometano del intermedio de isocianato 1 previamente preparado (2 mL, 0,1150 mmol) a 0 °C y se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. Los disolventes se evaporaron a presión reducida y la mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y usando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 60 % de ACN en H₂O). Las fracciones que contenían el producto de reacción deseado (intermedio 2) se evaporaron, el sólido se resuspendió en TFA al 1 % y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se volvió a purificar el producto deseado mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna que contiene 25 g de C18 modificado con diol y se usó un gradiente de ACN en TFA al 1% (0 $\rightarrow$ 40 % ACN en TFA al 1 %), y se recuperó como polvo blanco después de la liofilización de agua (15 mg, 48 % en 3 pasos, se calcula a

partir de exatecan). MS calc. para $C_{27}H_{28}FN_4O_6$: 523,20, observado: 523,25, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,76 (dd, $J = 11,0, 2,0$ Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,82 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,61 (m, 1H), 5,43 (d, $J = 2,6$ Hz, 2H), 5,40 – 5,30 (m, 2H), 5,22 (s, 1H), 5,17 (s, 1H), 3,48 – 3,40 (m, 2H), 3,21 – 3,01 (m, 3H), 2,38 (d, $J = 1,9$ Hz, 3H), 2,23 – 2,06 (m, 2H), 1,96 – 1,80 (m, 2H), 1,76 (s, 2H), 0,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

5 Ejemplo 23: Síntesis del Compuesto 1008



[00190] Intermedio 1. El compuesto 48 (17 mg, 0,0325 mmol) y FmocGGFG-OAc (3 equiv., 0,0976 mmol, 61 mg) se disolvieron en 1 mL de DMF anhidra. Se agregó HCl (100 μ L, 2 M en Et₂O) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se cargó directamente en la columna. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna que contenía 25 g de C18 y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 80 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (15 mg, 44 %).

MS calc. para $C_{58}H_{59}FN_9O_{12}$: 1092,43, observado: 1093,03, $[M + H]^+$.

[00191] Intermedio 2. El Intermedio 1 (15 mg, 0,0135 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF anhidra y se agregó morfolina (100 μ L). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía 25 g de C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 100 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (10 mg, 87 %). MS calc. para $C_{43}H_{49}FN_9O_{10}$: 870,36, encontrado: 870,88, $[M + H]^+$.

[00192] Compuesto 1008. El Intermedio 2 (10 mg, 0,0118 mmol) se disolvió en 1 mL de DMF. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2 equiv., 0,0237 mmol, 7 mg) y DIPEA (20 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, la mezcla se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 μ m y se cargó directamente en la columna. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 $\rightarrow$ 100 % de ACN en agua). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (4 mg, 32 %). Cálculo MS para $C_{52}H_{58}FN_{10}O_{14}$: 1065,41, encontrado: 1065,79, $[M + H]^+$.

Ejemplo 24: Síntesis del Compuesto 3007

[00193] El Compuesto 3007 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 9 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1008 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 4,9 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1065 Da.

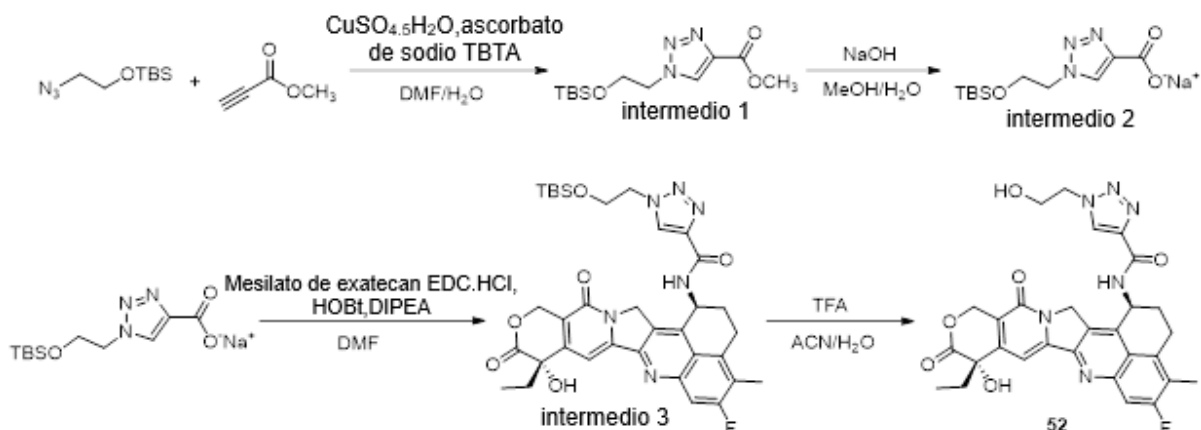
Ejemplo 25: Síntesis del Compuesto 3032

[00194] El Compuesto 3032 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1008 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,6 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1065 Da.

Ejemplo 26: Síntesis del Compuesto 3054

[00195] El Compuesto 3054 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 9 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1008 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 4,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1065 Da.

Ejemplo 27: Síntesis del Compuesto 52



[00196] Intermedio 1. A una solución de propiolato de metilo (1,0 equiv., 55 mg, 0,65 mmol), (2-azidoetoxi)(*terc*-butil)dimetilsilano (1,15 equiv., 150 mg, 0,74 mmol) y tris[(1-benciltriazol-4-il)metil]amina (0,15 equiv., 50 mg, 0,094 mmol) en DMF (3 ml) se añadió CuSO₄·5H₂O acuoso 1 M (0,1 equiv., 0,06 mmol, 60 µL) y ascorbato de sodio acuoso 2 M (0,2 equiv., 0,12 mmol, 60 µL) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporó el DMF y el residuo se tomó en EtOAc y la fase orgánica se lavó con agua, HCl acuoso 0,2 M, NH₄Cl acuoso saturado y salmuera, y se secó con Na₂SO₄. La purificación por cromatografía ultrarrápida (sílice, 0% a 30% EtOAc/ciclohexano) ofreció el intermedio de triazol 1 (158 mg, 85%) como un sólido blanco.

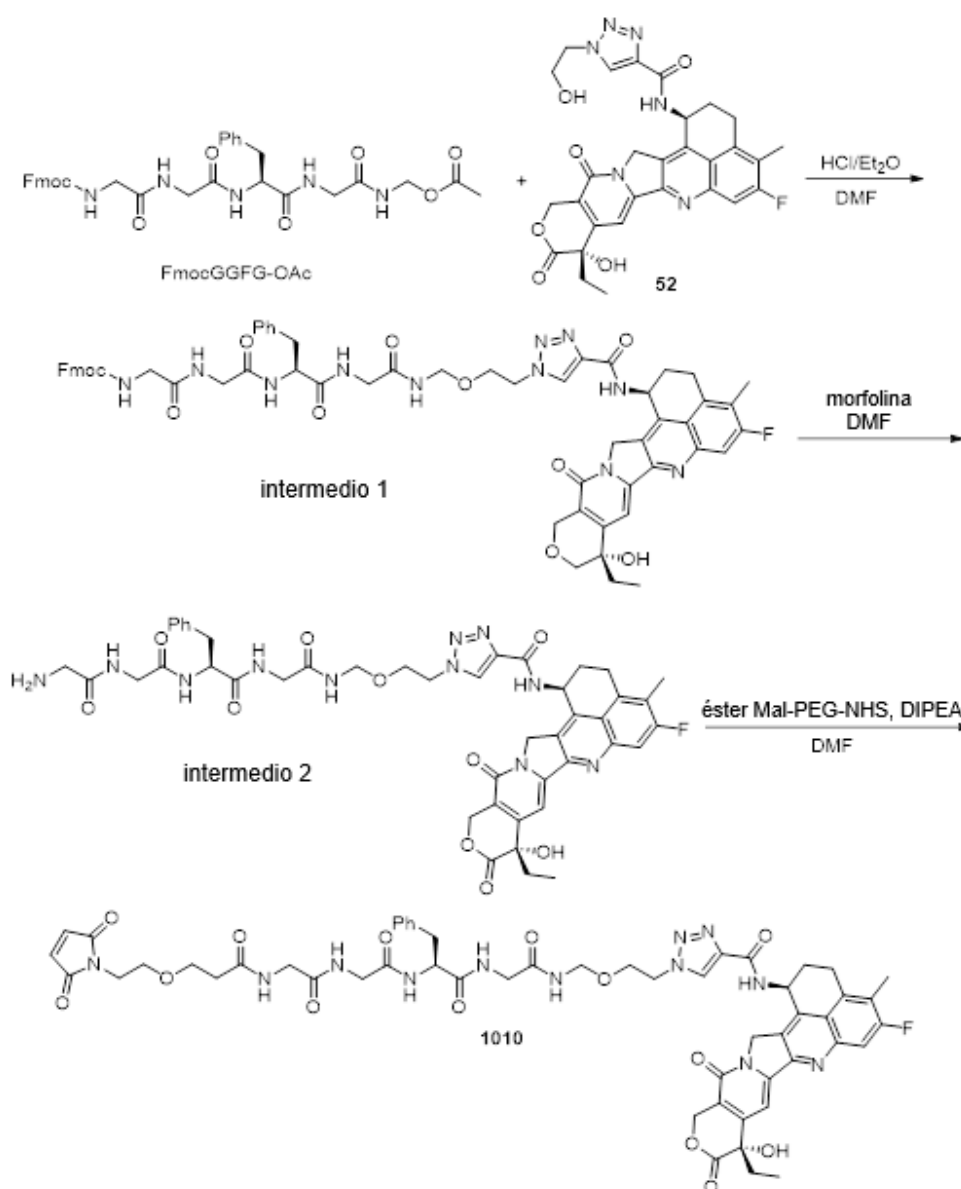
[00197] Intermedio 2. A una solución de intermedio de triazol 1 (1,0 equiv., 158 mg, 0,55 mmol) en MeOH (2 mL) se añadió NaOH acuoso 2 M (1,0 equiv., 0,55 mL) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Luego se evaporaron los disolventes y el residuo se volvió a evaporar dos veces con tolueno, se suspendió en EtOAc y se filtró. El material sólido se lavó con Et₂O y se secó al vacío, obteniéndose el intermedio triazol 2 (135 mg, 84%) como un sólido blanco.

[00198] Intermedio 3. A una suspensión de mesilato de exatecan (15 mg, 0,028 mmol), intermedio de triazol 2 (2,1 equiv., 0,06 mmol, 17 mg), clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2,0 equiv., 0,056 mmol, 11 mg) y 1-hidroxibenzotriazol (2,0 equiv., 0,056 mmol, 8 mg) en DMF (1 mL) se añadió diisopropiletilamina (5,0 equiv., 0,14 mmol, 18 mg, 25 µL) bajo una atmósfera de argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La cromatografía líquida-espectrometría de masas LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La purificación de la mezcla mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 % a 75 % de ACN/H₂O) proporcionó el intermedio triazólico 3 (14 mg, 73 %) en forma de polvo blanco tras la liofilización.

[00199] Compuesto 52. El intermedio de triazol 3 (14 mg, 0,02 mmol) se disolvió en ACN/0,1 % ac. Mezcla de TFA (1:1, 2 ml), seguida de la adición de 2 gotas de TFA y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La LC-MS indicó el consumo total del intermedio 1 y los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida de

fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 50% ACN/H₂O), dando el compuesto 52 (10 mg, 85 %) como un polvo blanco después de la liofilización. MS calc. para C₂₉H₂₈FN₆O₆: 575,20, observado: 575,25, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,63 (s, 1H), 7,77 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 5,73 (dd, *J* = 7,7, 5,3 Hz, 1H), 5,36 (s, 2H), 5,14 (d, *J* = 3,7 Hz, 2H), 4,48 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H), 3,81 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H), 3,33 (s, 2H), 3,32 – 3,21 (m, 1H), 3,19 – 3,07 (m, 1H), 2,38 (d, *J* = 1,9 Hz, 3H), 2,34 – 2,20 (m, 2H), 1,93 – 1,76 (m, 2H), 0,85 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 28: Síntesis del Compuesto 1010



- 10 **[00200]** Intermedio 1. La mezcla de compuesto 52 (1,0 equiv., 30 mg, 0,052 mmol) y FmocGGFG-OAc (2,0 equiv., 0,104 mmol, 66 mg) se disolvió en DMF anhidro (1,5 mL), seguido de la adición de 2 M

HCl/Et₂O (150 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y durante ese tiempo, se añadieron varias porciones (aproximadamente 0,5 equiv. cada una) de FmocGGFG-OAc a la mezcla de reacción. Luego, la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0% a 75% ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron y el residuo (producto + impurezas coeluyentes) se utilizó directamente en el siguiente paso. Cálculo MS para C₆₀H₅₉FN₁₁O₁₂: 1144,43, encontrado: 1144,40, [M+H]⁺.

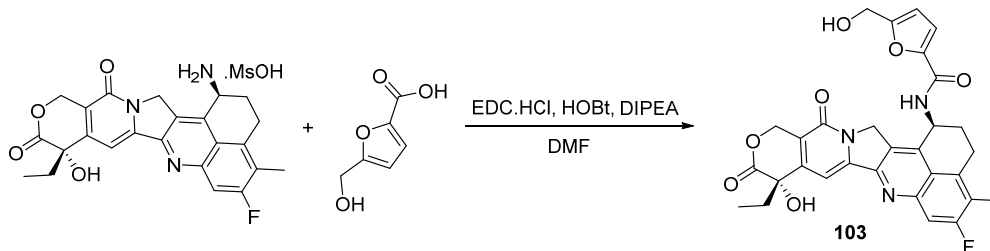
[00201] Intermedio 2. Se añadió morfolina (140 µL) a la solución del intermedio 1 (obtenido en el paso anterior) en DMF anhidra (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 % a 60 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (20 mg, 42 %, 2 pasos). Cálculo MS para C₄₅H₄₉FN₁₁O₁₀: 922,36, encontrado: 922,35, [M+H]⁺.

[00202] Compuesto 1010. Se agregaron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,022 mmol, 6,7 mg) y DIPEA (2,4 equiv., 0,053 mmol, 7 mg, 9 µL) a la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 20 mg, 0,022 mmol) en DMF anhidro (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, mientras la LC-MS indicaba el consumo total del material de partida. La purificación mediante HPLC ultrarrápida de fase reversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 % a 60 % ACN/H₂O) proporcionó el producto deseado como un sólido blanco tras la liofilización (7,5 mg, 31 %). MS calc. para C₅₄H₅₈FN₁₂O₁₄: 1117,42, observado: 1117,35, [M + H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9,28 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H), 8,65 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,56 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 8,32 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,15 – 8,08 (m, 2H), 8,00 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,31 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 7,28 – 7,21 (m, 5H), 7,20 – 7,15 (m, 1H), 7,00 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,78 – 5,71 (m, 1H), 5,41 – 5,33 (m, 2H), 5,25 – 5,11 (m, 2H), 4,63 – 4,60 (m, 2H), 4,58 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H), 4,53 – 4,47 (m, 1H), 3,86 – 3,83 (m, 2H), 3,74 (td, *J* = 17,3, 5,8 Hz, 2H), 3,67 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,64 – 3,50 (m, 5H), 3,46 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,18 – 3,11 (m, 1H), 3,05 (dd, *J* = 14,0, 4,6 Hz, 1H), 2,84 – 2,75 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,33 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,30 – 2,23 (m, 3H), 1,93 – 1,78 (m, 2H), 0,90 – 0,83 (m, 3H).

Ejemplo 29: Síntesis del Compuesto 3006

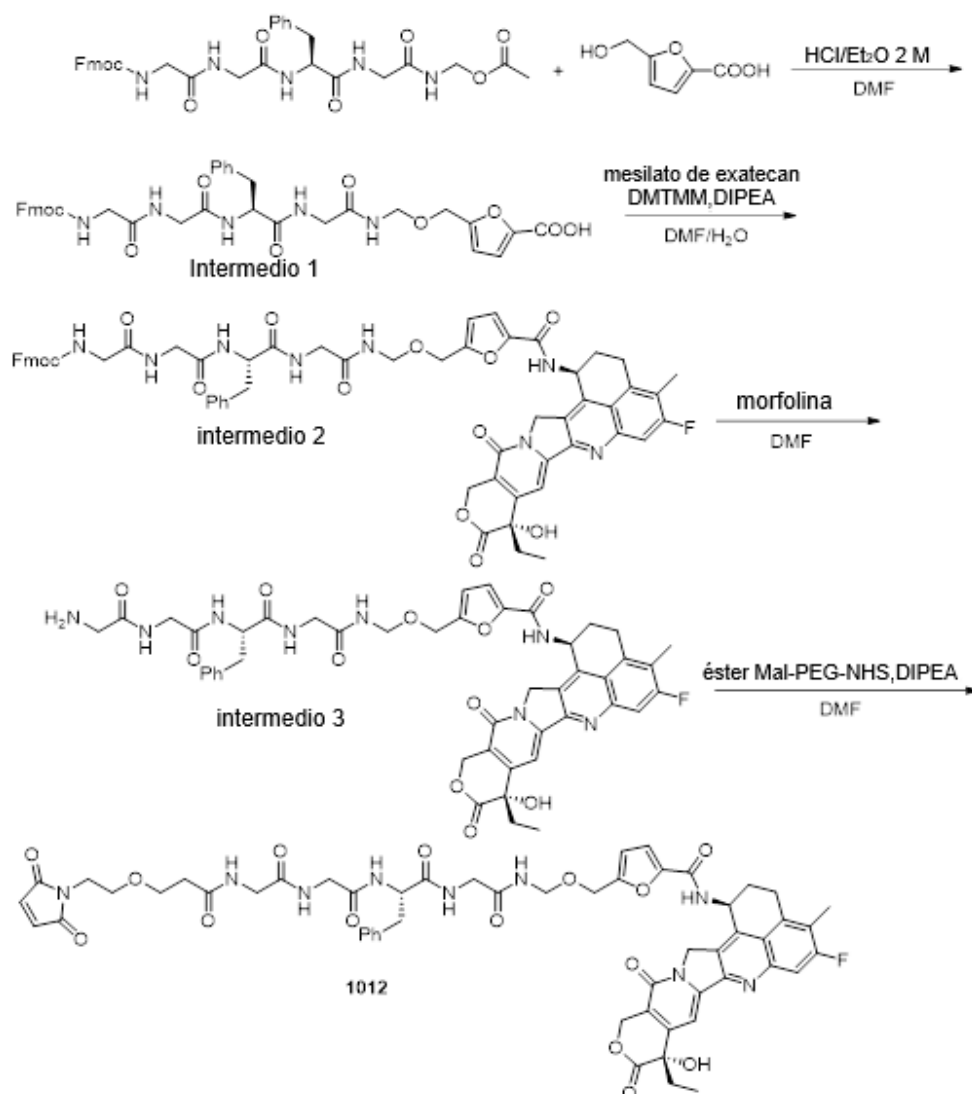
[00203] El Compuesto 3006 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 40 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1010 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 6,9 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1117 Da.

Ejemplo 30: Síntesis del compuesto 103



[00204] Compuesto 103. A la suspensión de mesilato de exatecan (10 mg, 0,019 mmol), ácido 5-(hidroximetil)furan-2-carboxílico (3 equiv., 8 mg, 0,057 mmol), clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2,5 equiv., 10 mg, 0,048 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (2,5 equiv., 7 mg, 0,048 mmol) en DMF (1 mL) se añadió diisopropiletilamina (5 equiv., 17 μ L, 0,095 mmol) en una atmósfera de argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. La cromatografía líquida-espectrometría de masas LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 70 % ACN/H₂O), seguida de otra purificación en una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 70 % ACN/H₂O), proporcionó el producto (7 mg, 66 %) en forma de polvo amarillento tras la liofilización. MS calc. para C₃₀H₂₇FN₃O₇: 560,18, observado: 560,15, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8,90 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,79 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,17 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 6,50 (s, 1H), 6,45 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 5,77–5,67 (m, 1H), 5,40 – 5,33 (m, 3H), 5,18 (d, *J* = 18,9 Hz, 1H), 5,10 (d, *J* = 19,0 Hz, 1H), 4,44 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,29 – 3,09 (m, 1H), 2,40 (d, *J* = 1,9 Hz, 3H), 2,24 (q, *J* = 6,2 Hz, 2H), 0,94–1,75 (m, 2H), 0,86 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 31: Síntesis del Compuesto 1012



[00205] Intermedio 1. A la solución de FmocGGFGG-OAc (1,0 equiv., 50 mg, 0,079 mmol) y ácido 5-(hidroximetil)furan-2-carboxílico (1,2 equiv., 14 mg, 0,095 mmol) en DMF anhidro (0,5 ml) se añadió HCl 2 M/Et₂O (70 µL) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminaron los volátiles y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O), dando el intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (23 mg, 41 %). Cálculo MS para C₃₇H₃₆FN₅O₁₀: 710,25, encontrado: 710,25, [M-H]⁻.

[00206] Intermedio 2. A la mezcla del intermedio 1 (1,05 equiv., 23 mg, 0,032 mmol), mesilato de exatecan (1,0 equiv., 16,3 mg, 0,031 mmol) y DMTMM (1,05 equiv., 8,9 mg, 0,032 mmol), se le añadió DMF/agua (5:1, 1,2 ml) y diisopropiletilamina (2,1 equiv., 12 µL, 0,065 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de

fase reversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 75 % ACN/H₂O), obteniéndose el intermedio 2 como un sólido blanco tras la liofilización (27 mg, 77 %). Cálculo MS para C₆₁H₅₈FN₈O₁₃: 1129,41, encontrado: 1129,45, [M+H]⁺.

[00207] Intermedio 3. Se agregó morfolina (50 µL) a la solución de intermedio 2 (1,0 equiv., 27 mg, 0,024 mmol) en DMF anhidra (1 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (15 mg, 69 %). Cálculo MS para C₄₆H₄₈FN₈O₁₁: 907,34, encontrado: 907,35, [M+H]⁺.

[00208] Compuesto 1012. Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,017 mmol, 5,2 mg) y DIPEA (1,05 equiv., 0,0173 mmol, 3,05 µL) a la solución del intermedio 3 (1,0 equiv., 15 mg, 0,017 mmol) en DMF anhidra (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, mientras LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La purificación mediante HPLC ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O) ofreció el producto deseado como un sólido blanco después de la liofilización (11 mg, 60 %). MS calc. para C₅₅H₅₇FN₉O₁₅: 1102,40, observado: 1102,45, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9,06 – 8,93 (m, 1H), 8,59 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 8,31 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,16 – 8,05 (m, 2H), 8,04 – 7,94 (m, 1H), 7,80 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,27 – 7,11 (m, 7H), 6,99 (s, 1H), 6,59 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,78 – 5,63 (m, 1H), 5,38 (s, 2H), 5,28 – 4,97 (m, 2H), 4,59 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H), 4,53 – 4,37 (m, 3H), 3,84 – 3,63 (m, 5H), 3,63 – 3,48 (m, 5H), 3,45 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,29 – 3,22 (m, 1H), 3,20 – 3,08 (m, 1H), 3,04 (dd, *J* = 13,9, 4,6 Hz, 1H), 2,79 (dd, *J* = 13,9, 9,6 Hz, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,32 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,27 – 2,19 (m, 2H), 1,96 – 1,77 (m, 2H), 0,86 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

Ejemplo 32: Síntesis del Compuesto 3008

[00209] El Compuesto 3008 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1012 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 6,7 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1102 Da.

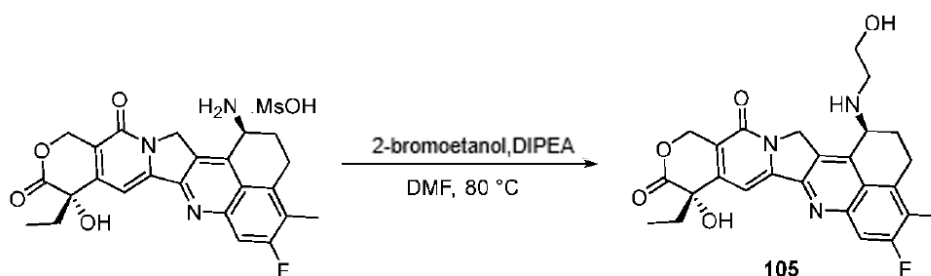
Ejemplo 33: Síntesis del Compuesto 3033

[00210] El Compuesto 3033 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1012 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 4,5 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1102 Da.

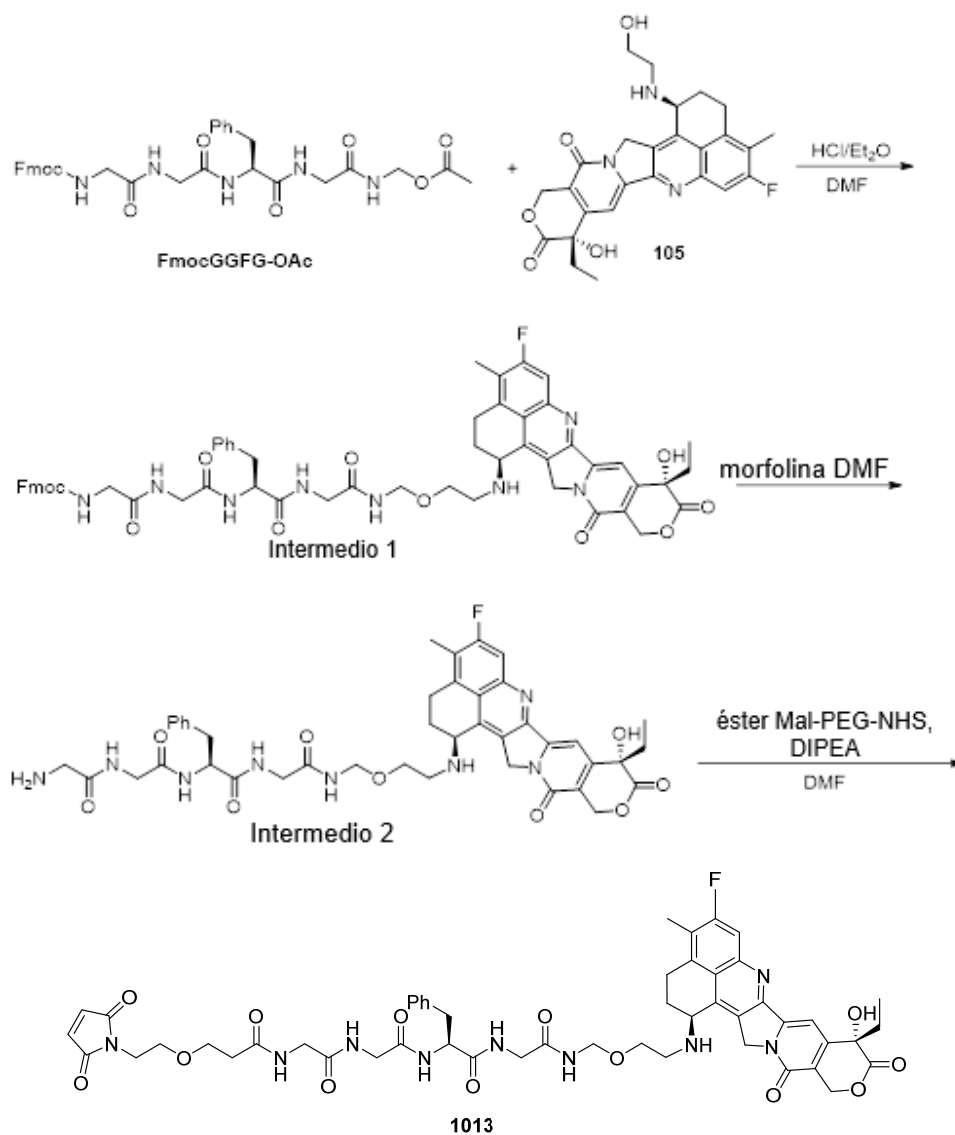
Ejemplo 34: Síntesis del Compuesto 3055

[00211] El Compuesto 3055 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1012 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 7,3 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1102 Da.

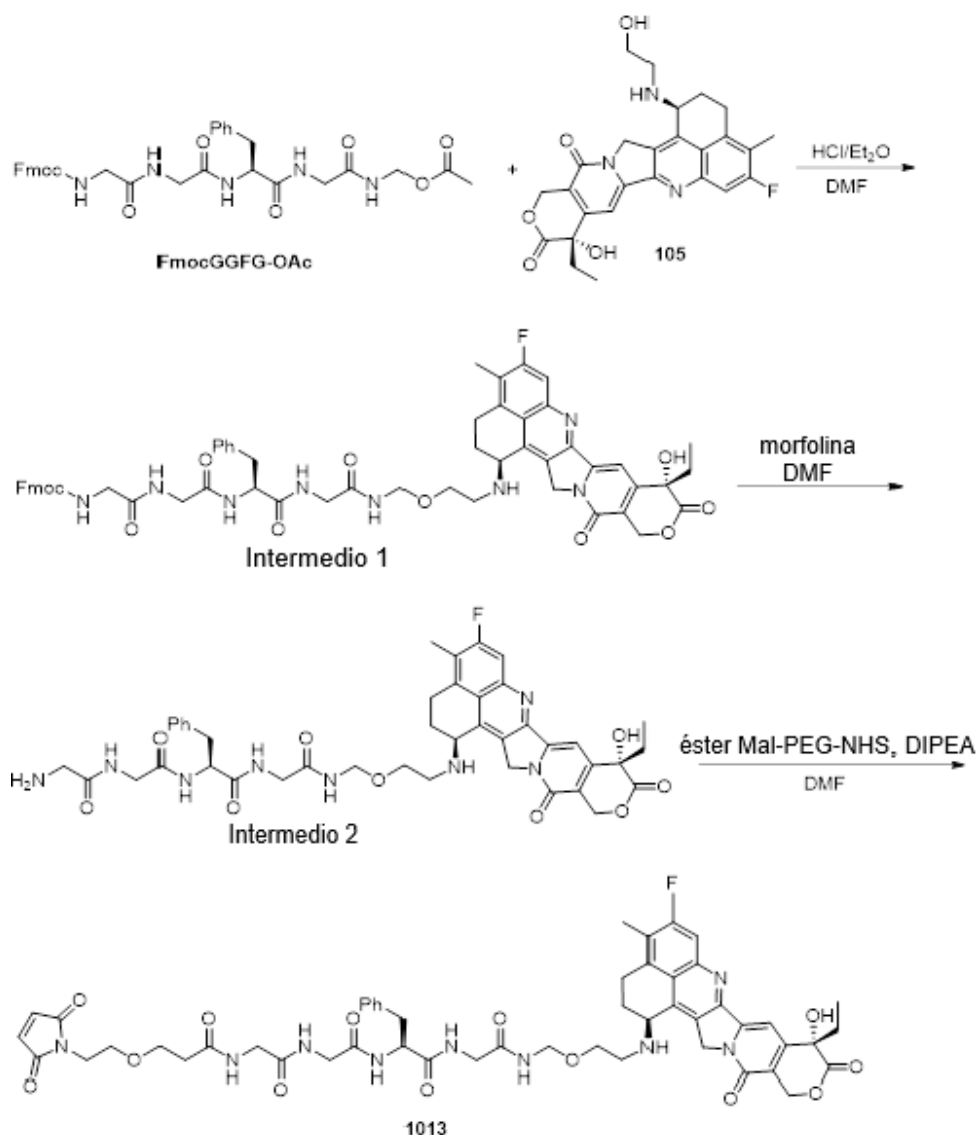
5 **Ejemplo 35: Síntesis del Compuesto 105**



[00212] Compuesto 105. A la suspensión de mesilato de exatecan (30 mg, 0,056 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron diisopropiletilamina (3,5 equiv., 0,196 mmol, 34 μ L) y 2-bromoetanol (2 equiv., 0,112 mmol, 14 mg, 8 μ L) bajo atmósfera de argón y la mezcla se calentó a 80 °C durante 2 días. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa en columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/TFA al 1 % en H₂O) ofreció el producto (16 mg, 48 %) como un polvo blanco después de la liofilización. MS calc. para C₂₆H₂₇FN₃O₅: 480,19, observado: 480,25, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9,03 (s br, 1H), 8,80 (s br, 1H), 7,88 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,34 (s, 1H), 6,57 (s, 1H), 5,57 – 5,36 (m, 4H), 5,30 (s, 1H), 5,16 – 5,02 (m, 1H), 3,69 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,31 – 3,06 (m, 3H), 2,84 – 2,71 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,26 – 2,10 (m, 1H), 1,99 – 1,76 (m, 2H), 0,87 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).



Ejemplo 36: Síntesis del Compuesto 1013



[00213] Intermedio 1. La mezcla del compuesto 105 (1,0 equiv., 20 mg, 0,034 mmol) y FmocGGFG-OAc (2,0 equiv., 0,068 mmol, 43 mg) se disolvió en DMF anhidro (1 mL), seguido de la adición de HCl/Et₂O 2 M (100 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y durante ese tiempo, se añadieron varias porciones (aproximadamente 0,5 equiv. cada una) de FmocGGFG-OAc a la mezcla de reacción. Luego, la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 75 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron y el residuo (producto + impurezas coeluyentes) se utilizó directamente en el siguiente paso. Cálculo MS para C₅₇H₅₈FN₈O₁₁: 1049,42, encontrado: 1049,40, [M+H]⁺.

[00214] Intermedio 2. Se agregó morfolina (80 μ L) a la solución de intermedio 1 (como se obtuvo en el paso anterior) en DMF anhidra (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a temperatura

ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (12 mg, 43 %). MS calc. para C₄₂H₄₈FN₈O₉: 827,35, encontrado: 827,30, [M+H]⁺.

- 5 **[00215] Compuesto 1013.** Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,015 mmol, 4,3 mg) y DIPEA (2,2 equiv., 0,032 mmol, 4,2 mg, 5,7 µL) a la solución del intermedio 2 (12 mg, 0,015 mmol) en DMF anhidra (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, mientras LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La purificación mediante HPLC ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 %
- 10 ACN/H₂O) ofreció el producto deseado como un sólido blanco después de la liofilización (6,3 mg, 41 %). MS calc. para C₅₁H₅₇FN₉O₁₃: 1022,41, observado: 1022,40, [M + H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,65 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 8,33 – 8,26 (m, 1H), 8,15 – 8,07 (m, 2H), 8,03 – 7,96 (m, 1H), 7,76 – 7,70 (m, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,26 – 7,18 (m, 5H), 7,18 – 7,12 (m, 1H), 6,99 (s, 2H), 5,49 – 5,24 (m, 3H), 4,81 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 4,71 – 4,55 (m, 3H), 4,48 (ddd, *J* = 9,6, 8,1, 4,5 Hz, 1H), 4,28 (t, *J* = 4,2 Hz, 1H), 3,81 –
- 15 3,67 (m, 3H), 3,65 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,62 – 3,47 (m, 6H), 3,47 – 3,41 (m, 2H), 3,22 – 3,12 (m, 1H), 3,06 – 2,90 (m, 2H), 2,87 – 2,71 (m, 2H), 2,38 – 2,29 (m, 5H), 2,26 – 1,98 (m, 4H), 1,26 – 1,16 (m, 1H), 0,90 – 0,82 (m, 3H).

Ejemplo 37: Síntesis del Compuesto 3009

- [00216]** El Compuesto 3009 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1013 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1022 Da.
- 20

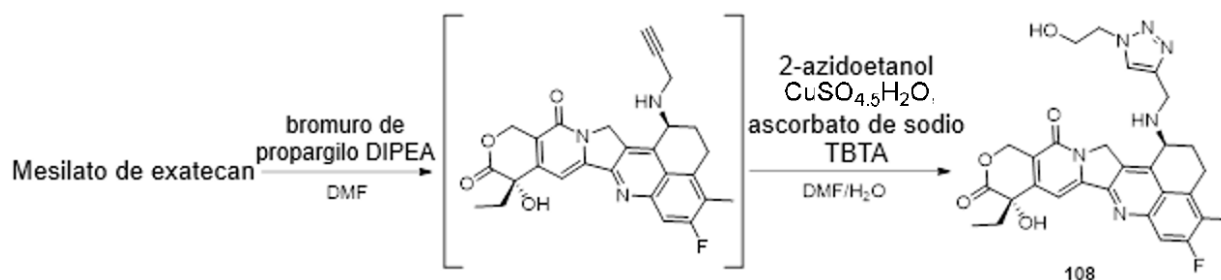
Ejemplo 38: Síntesis del Compuesto 3034

- [00217]** El Compuesto 3034 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1013 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,2 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1022 Da.
- 25

Ejemplo 39: Síntesis del Compuesto 3056

- [00218]** El Compuesto 3056 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 4 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1013 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 3,9 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1022 Da.
- 30

Ejemplo 40: Síntesis del Compuesto 108



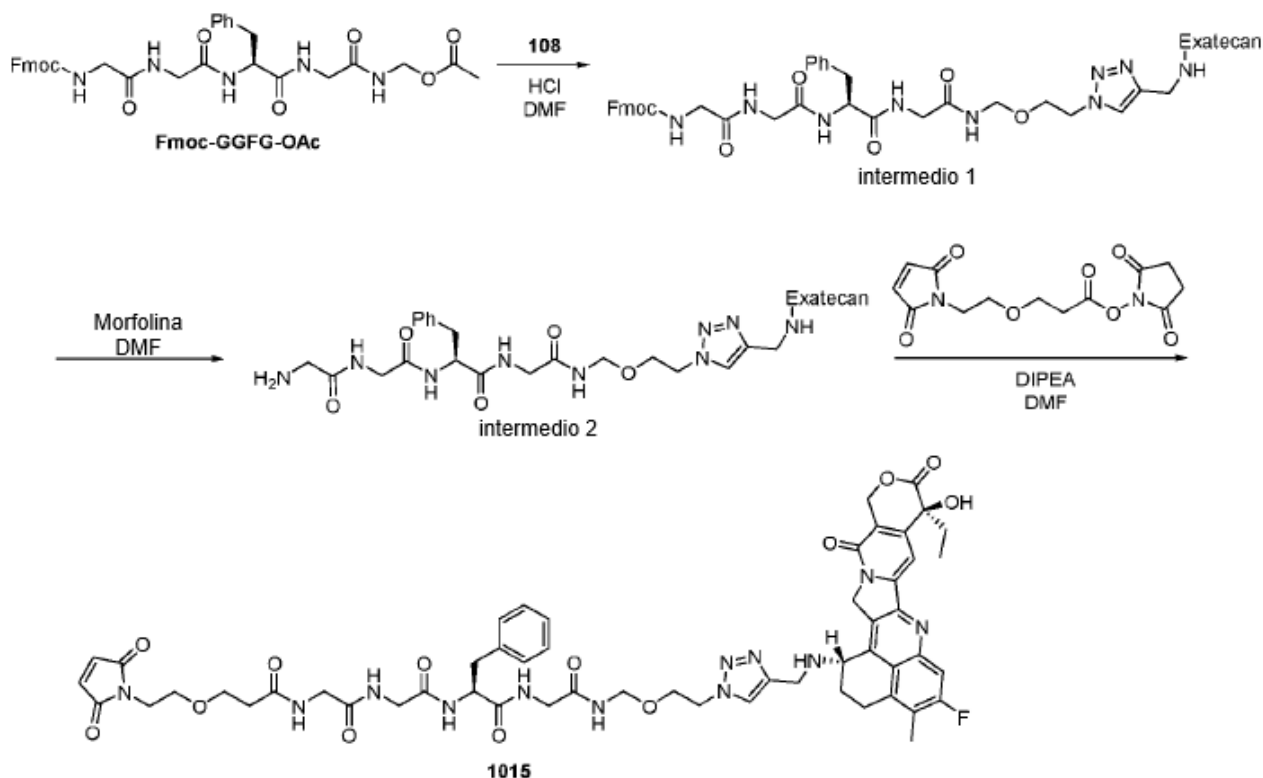
[00219] Se añadieron diisopropiletilamina (2,5 equiv., 0,07 mmol, 9 mg, 13 μL) y bromuro de propargilo (2,5 equiv., 0,07 mmol, 8,5 mg, 9 μL solución al 80% en tolueno) a la suspensión de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 15 mg, 0,028 mmol) en DMF (0,2 ml) y la solución resultante se agitó durante 48 horas.

5 Luego, se agregaron sucesivamente a la mezcla de reacción 2-azidoetanol (5,0 equiv., 0,14 mmol, 12 mg, 11 μL), tris(benciltriazolilmetil)amina (1,5 equiv., 0,042 mmol, 22 mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,0 equiv., 0,028 mmol, 140 μL de solución acuosa 2 M) y ascorbato de sodio (2,0 equiv., 0,056 mmol, 56 μL de solución acuosa 1 M) y la solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción cruda se cargó directamente en la columna y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0% a 50% ACN/ H_2O), ofreciendo el compuesto 108 (12 mg, 77%) como un polvo blanco después de la liofilización. MS calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{FN}_6\text{O}_5$: 561,23, observado: 561,30, $[\text{M}+\text{H}]^+$. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7,97 (s, 1H), 7,72 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,28 (d, $J = 19,0$ Hz, 1H), 5,19 (d, $J = 19,0$ Hz, 1H), 4,39 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 4,25 (t, $J = 4,1$ Hz, 1H), 3,97 (q, $J = 13,9$ Hz, 2H), 3,80 – 3,75 (m, 2H), 3,33 (s, 2H), 3,24 (ddd, $J = 15,8, 10,4, 4,3$ Hz, 1H), 3,01 (dt, $J = 16,8, 4,8$ Hz, 1H), 2,39 – 2,27 (m, 6H), 2,09 – 1,98 (m, 1H), 1,95 – 1,78 (m, 2H), 0,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

10

15

Ejemplo 41: Síntesis del Compuesto 1015



[00220] Intermedio 1. Se disolvieron el Compuesto 108 (1,0 equiv., 30 mg, 0,0536 mmol) y FmocGGFG-OAc (2,0 equiv., 0,107 mmol, 67 mg) en DMF anhidra (1,5 mL), seguida de la adición de HCl/Et₂O 2 M (150 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y durante ese tiempo, se añadieron varias porciones (aproximadamente 0,5 equiv. cada una) de FmocGGFG-OAc a la mezcla de reacción. Luego, la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 75 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron y el residuo (producto + impurezas coeluyentes) se utilizó directamente en el siguiente paso. Cálculo MS para C₆₀H₆₁FN₁₁O₁₁: 1130,45, encontrado: 1130,40, [M+H]⁺.

[00221] Intermedio 2. Se agregó morfolina (100 µL) a la solución de intermedio 1 Sc-260-F1 (como se obtuvo en el paso anterior) en DMF anhidra (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 50 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (14 mg, 29 % en 2 pasos). Cálculo MS para C₄₅H₅₁FN₁₁O₉: 908,39, encontrado: 908,55, [M+H]⁺.

[00222] Compuesto 1015. Se agregaron éster Mal-PEG-NHS (1 equiv., 0,0154 mmol, 5 mg) y DIPEA (2,5 equiv., 0,039 mmol, 5 mg, 6,6 µL) a la solución de intermedio 2 Sc-260-F1 (1 equiv., 14 mg, 0,0154 mmol) en DMF anhidro (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, mientras LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La purificación mediante HPLC

ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/H₂O) ofreció el producto deseado como un sólido blanco después de la liofilización de agua y acetonitrilo (7 mg, 41 %). MS calc. para C₅₄H₆₀FN₁₂O₁₃: 1103,44, observado: 1103,61, [M + H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,54 (m, 1H), 8,30 (m, 1H), 8,12 (m, 2H), 8,01 (m, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,25 – 7,17 (m, 4H), 7,17 – 7,12 (m, 1H), 7,01 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 6,99 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,43 (s, 1H), 5,34 – 5,06 (m, 2H), 4,55 (m, 2H), 4,51 (m, 1H), 4,49 – 4,43 (m, 1H), 4,25 (d, *J* = 17,1 Hz, 1H), 4,10 – 3,88 (m, 2H), 3,80 (q, *J* = 4,9 Hz, 2H), 3,76 – 3,63 (m, 5H), 3,45 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,22 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 3,04 – 2,98 (m, 2H), 2,87 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 2,82 – 2,73 (m, 2H), 2,59 (s, 1H), 2,36 (m, 4H), 2,32 (m, 2H), 2,06 – 1,97 (m, 2H), 1,86 (m, 1H), 1,29 – 1,21 (m, 2H), 0,86 (m, 3H).

Ejemplo 42: Síntesis del Compuesto 3010

[00223] El Compuesto 3010 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 15 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1015 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 6,6 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1103 Da.

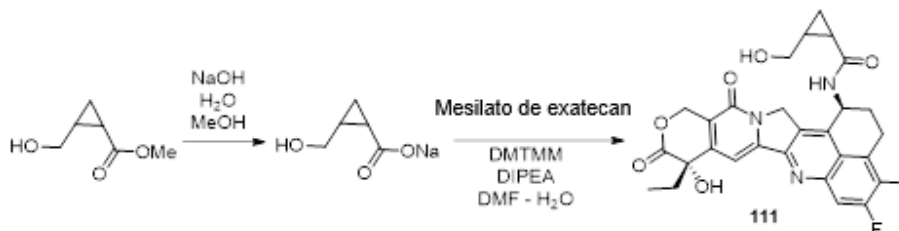
Ejemplo 43: Síntesis del Compuesto 3035

[00224] El Compuesto 3035 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 15 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1015 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,3 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1103 Da.

Ejemplo 44: Síntesis del Compuesto 3057

[00225] El Compuesto 3057 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 15 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1015 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,0 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1103 Da.

Ejemplo 45: Síntesis del compuesto 111



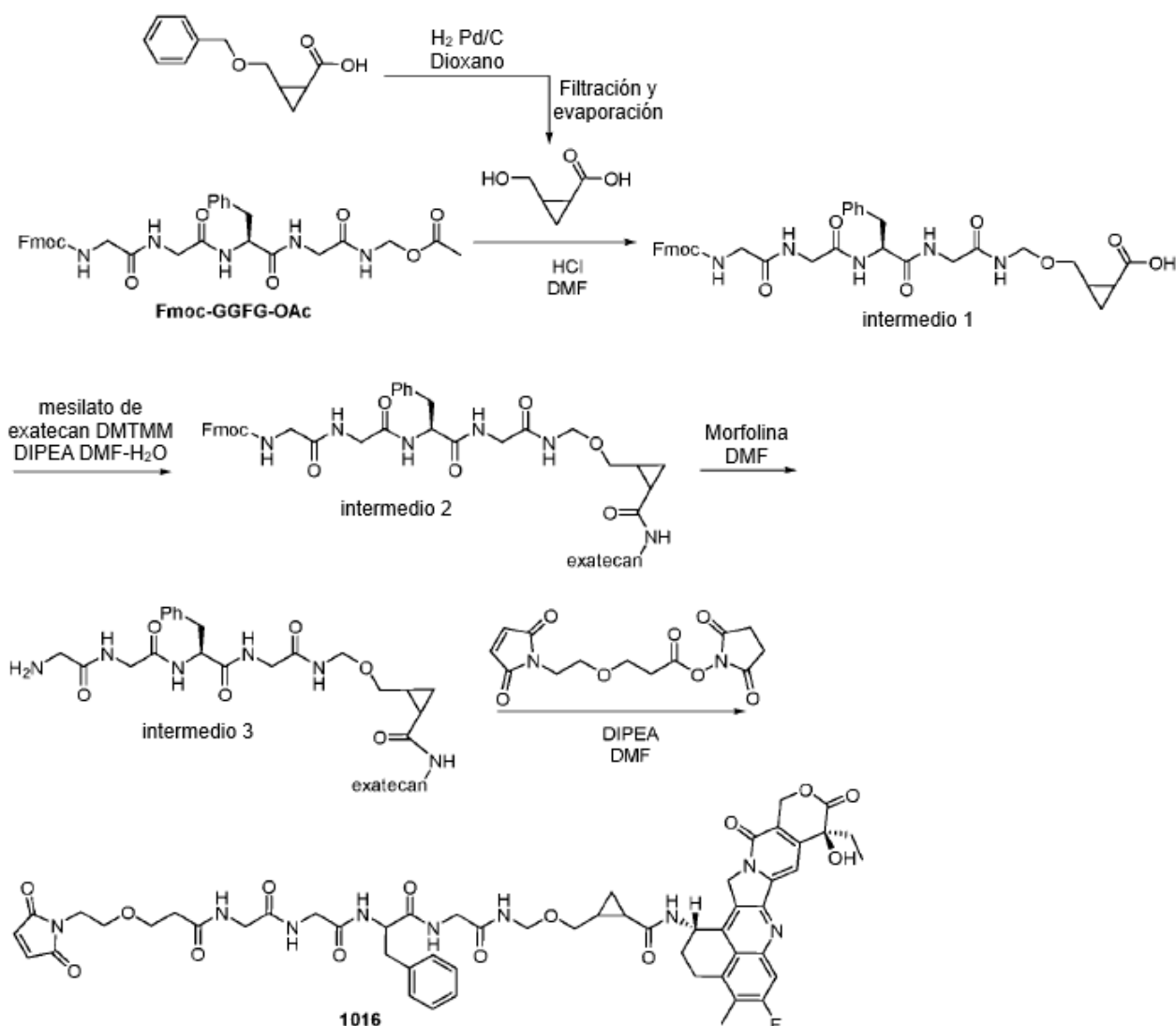
[00226] Compuesto 111. Se disolvió 2-(hidroximetil)ciclopropano-1-carboxilato de metilo (25 mg, 0,175 mmol) en 1 mL de metanol y se añadieron 870 µL de NaOH 1 M (1 equiv.). La mezcla se agitó a

temperatura ambiente durante 5 h, luego se evaporaron los solventes y el producto crudo se liofilizó a partir de agua. Al sólido obtenido se le añadieron mesilato de exatecan (46 mg, 0,5 equiv., 0,874 mmol), DMTMM (48 mg, 1 equiv., 0,175 mmol) y 10 mL de una mezcla de DMF/agua 4:1. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Los disolventes se evaporaron a presión reducida hasta un volumen final de aproximadamente 2 mL. La mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna que contenía 25 g de C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 60 % de ACN en H₂O). Se realizó una segunda purificación utilizando una columna semipreparativa cargada con C18 modificado con diol y utilizando un gradiente de ACN en agua (0 → 80% ACN en H₂O). Se separaron dos isómeros durante la purificación semipreparativa. El producto se recuperó por separado como polvo blanco, después de la liofilización a partir de agua/dioxano (42 mg en total, 91 % calculado a partir de exatecan). Cálculo MS para C₂₉H₂₉FN₃O₆: 534,20, encontrado: 534,10, [M+H]⁺.

[00227] Para el isómero A: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,67 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,56 (q, *J* = 6,6 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,16 (d, *J* = 2,9 Hz, 2H), 4,63 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 3,48 – 3,38 (m, 1H), 3,31 – 3,25 (m, 2H), 3,21 – 3,08 (m, 1H), 2,30 (m, 2H), 2,24 – 2,07 (m, 2H), 1,96 – 1,77 (m, 2H), 1,58 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 1,49 (m, 1H), 0,99 (dt, *J* = 8,4, 4,3 Hz, 1H), 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 0,71 (m, 1H).

[00228] Para el isómero B (contiene 7 % de isómero A, con base en integraciones de RMN): RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,72 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 6,53 (s, 1H), 5,56 (m, 2H), 5,44 (s, 2H), 5,31 – 5,05 (m, 2H), 4,52 (dd, *J* = 6,1, 5,0 Hz, 1H), 3,45 (m 1H), 3,26 (m, 1H), 3,20 – 3,08 (m, 1H), 2,38 (m, 2H), 2,24 – 2,00 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,76 (s, 1H), 1,60 – 1,48 (m, 1H), 1,01 (m, 1H), 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 0,75 (m, 1H).

Ejemplo 46: Síntesis del Compuesto 1016



[00229] Intermedio 1. El ácido 2-((benciloxi)metil)ciclopropano-1-carboxílico (27,6 mg, 0,1338 mmol) se disolvió en 3 mL de dioxano anhidro. Se añadió Pd/C (10%) y se burbujeó hidrógeno en la solución durante 5 h, mientras se agitaba a temperatura ambiente. La solución se filtró con filtros de jeringa de 0,2 μm y el matraz se lavó con acetonitrilo. El filtrado se evaporó, se redisolvió en dioxano y se liofilizó durante la noche. El filtrado crudo se redisolvió en 2 mL de DMF anhidro y se añadió FmocGGFG-OAc (1 equiv., 0,1338 mmol, 90 mg), seguido de 200 μL de una solución de HCl 2 M en éter etílico. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se hizo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 a 75 % ACN/ H_2O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron a partir de agua (35 mg, 51%). MS calc. para $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_9$: 686,28, encontrado: 686,66, $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[00230] Intermedio 2. A una solución del intermedio 1 previamente preparado (35 mg, 0,0505 mmol)

en DMF (2 mL) se añadieron mesilato de exatecan (1 equiv., 0,0505 mmol, 27 mg), DMTMM (1,2 equiv., 0,0607 mmol, 17 mg), DIPEA (10 µL) y agua (200 µL). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se hizo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 a 60 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (28 mg, 50 %). MS calc. para C₆₀H₆₀FN₈O₁₂: 1103,43, encontrado: 1103,88, [M+H]⁺.

[00231] Intermedio 3. El intermedio 2 previamente preparado (28 mg, 0,0254 mmol) se disolvió en DMF (2 ml) y se añadió morfolina (100 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 a 100 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (11 mg, 51 %). MS calc. para C₄₅H₅₀FN₈O₁₀: 881,36, encontrado: 881,12, [M+H]⁺.

[00232] Compuesto 1016. El intermedio 3 previamente preparado (11 mg, 0,0130 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF anhidro. Se añadieron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,1 equiv., 0,0143 mmol, 4 mg) y DIPEA (1,1 equiv., 0,0143 mmol, 2,5 µL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 a 100 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (7 mg, 50 %). MS calc. para C₅₄H₅₉FN₉O₁₄: 1076,42, observado: 1076,56, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,80 – 8,70 (m, 2H), 8,53 (m, 1H), 8,45 (m, 1H), 8,27 (m, 1H), 8,10 (m, 2H), 7,99 (m, 2H), 7,93 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,80 (m, 2H), 7,34 – 7,20 (m, 2H), 7,18 – 7,08 (m, 2H), 6,67 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,62 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 5,55 (s, 2H), 5,43 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 5,19 – 5,07 (m, 3H), 5,06 – 5,02 (m, 1H), 4,74 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 4,61 – 4,44 (m, 3H), 3,72 (m, 2H), 3,57 (m, 2H), 3,16 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 3,08 – 3,00 (m, 1H), 2,79 (m, 2H), 2,39 (m, 3H), 2,34 (d, *J* = 1,8 Hz, 3H), 2,24 – 2,07 (m, 2H), 1,96 – 1,77 (m, 2H), 1,55 (m, 1H), 1,51 – 1,44 (m, 1H), 0,99 (m, 1H), 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 0,83 – 0,71 (m, 1H).

Ejemplo 47: Síntesis del Compuesto 3012

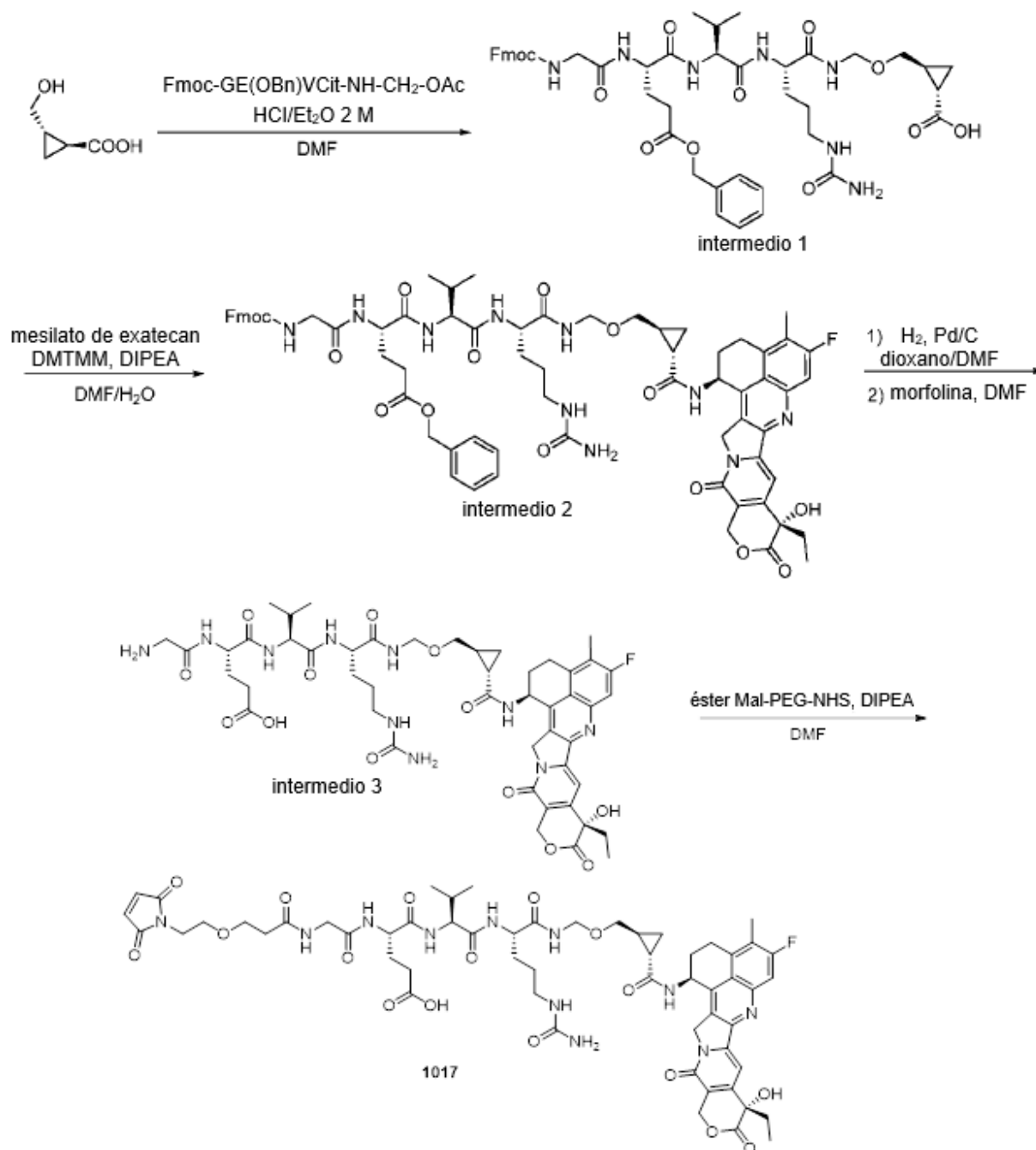
[00233] El Compuesto 3012 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 6 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1016 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC fue de 2 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1076 Da.

Ejemplo 48: Síntesis del Compuesto 3037

[00234] El Compuesto 3037 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 6 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1016 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC fue de 1,45 con base en un peso

molecular de enlazador-fármaco de 1076 Da.

Ejemplos 49: Síntesis del Compuesto 1017



- 5 **[00235] Intermedio 1.** A la solución de ácido (1S,2S)-2-(hidroximetil)ciclopropano-1-carboxílico (1,0 equiv., 5,7 mg, 0,049 mmol), Fmoc-GE(OBn)VCit-NH-CH₂-OAc (1,5 equiv., 62 mg, 0,074 mmol) en DMF anhidro (0,7 ml) se le añadió HCl 2 M/Et₂O (100 µl) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo completo del material de partida. La

mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 75 % ACN/0,1 % HCl). Las fracciones que contenían el producto (coeluyendo con la impureza) se liofilizaron para obtener 31 mg de intermedio impuro 1, que se utilizó directamente en el siguiente paso. Cálculo MS para $C_{46}H_{56}FN_7O_{12}$: 898,40, encontrado: 898,40, $[M-H]^-$.

[00236] Intermedio 2. A la mezcla de intermedio 1 (1,0 equiv., 31 mg, 0,034 mmol), mesilato de exatecan (0,9 equiv., 17 mg, 0,031 mmol) y DMTMM (1,0 equiv., 10 mg, 0,034 mmol) se le añadió DMF/agua (5:1, 1,2 ml) y diisopropiletilamina (2,0 equiv., 12 μ l, 0,068 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 75 % ACN/ H_2O), lo que ofrece el intermedio 2 como un sólido blanco después de la liofilización (25 mg, 39 % (2 pasos)). Cálculo MS para $C_{70}H_{78}FN_{10}O_{15}$: 1317,56, encontrado: 1317,55, $[M+H]^+$.

[00237] Intermedio 3. A la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 25 mg, 0,019 mmol) en la mezcla de dioxano (1,0 ml) y DMF (0,5 ml) se añadió 10% Pd/C (5 mg) y la mezcla de reacción se hidrogenó (globo) durante 2 horas a temperatura ambiente. La LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se filtró a través de celita y el filtrado se concentró en un rotavapor para eliminar el dioxano. Luego se añadió morfolina (40 μ l) a la solución obtenida y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La purificación por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/ H_2O) ofreció el producto intermedio 3 como un sólido blanco después de la liofilización (8 mg, 42 %). Cálculo MS para $C_{48}H_{62}FN_{10}O_{13}$: 1005,43, encontrado: 1005,40, $[M+H]^+$.

[00238] Compuesto 1017. Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,008 mmol, 2,5 mg) y DIPEA (1,05 equiv., 0,008 mmol, 1,5 μ L) a la solución del intermedio 3 (1,0 equiv., 8 mg, 0,008 mmol) en DMF anhidra (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, mientras LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 70 % ACN/TFA al 0,1 %) ofreció el producto deseado como un sólido amarillo pálido después de la liofilización (5 mg, 52 %). MS calc. para $C_{57}H_{71}FN_{11}O_{17}$: 1200,50, observado: 1200,50, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 12,09 (s br, 1H), 8,71 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,58 – 8,49 (m, 1H), 8,05 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 8,01 – 7,92 (m, 2H), 7,83 – 7,70 (m, 2H), 7,31 (s, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,58 (s br, 1H), 5,92 (s, 1H), 5,62 – 5,49 (m, 1H), 5,50 – 5,33 (m, 2H), 5,28 – 5,12 (m, 2H), 4,60 – 4,40 (m, 2H), 4,39 – 4,25 (m, 1H), 4,21 – 4,02 (m, 2H), 3,77 – 3,62 (m, 3H), 3,31 – 3,19 (m, 2H), 3,20 – 3,09 (m, 1H), 3,04 – 2,82 (m, 2H), 2,40 (s, 3H), 2,35 – 2,26 (m, 2H), 2,27 – 2,10 (m, 4H), 1,99 – 1,79 (m, 4H), 1,76 – 1,64 (m, 1H), 1,63 – 1,41 (m, 4H), 1,40 – 1,23 (m, 3H), 1,05 – 0,93 (m, 1H), 0,92 – 0,84 (m, 3H), 0,84 – 0,75 (m, 6H), 0,75 – 0,69 (m, 2H).

Ejemplo 50: Síntesis del Compuesto 3013

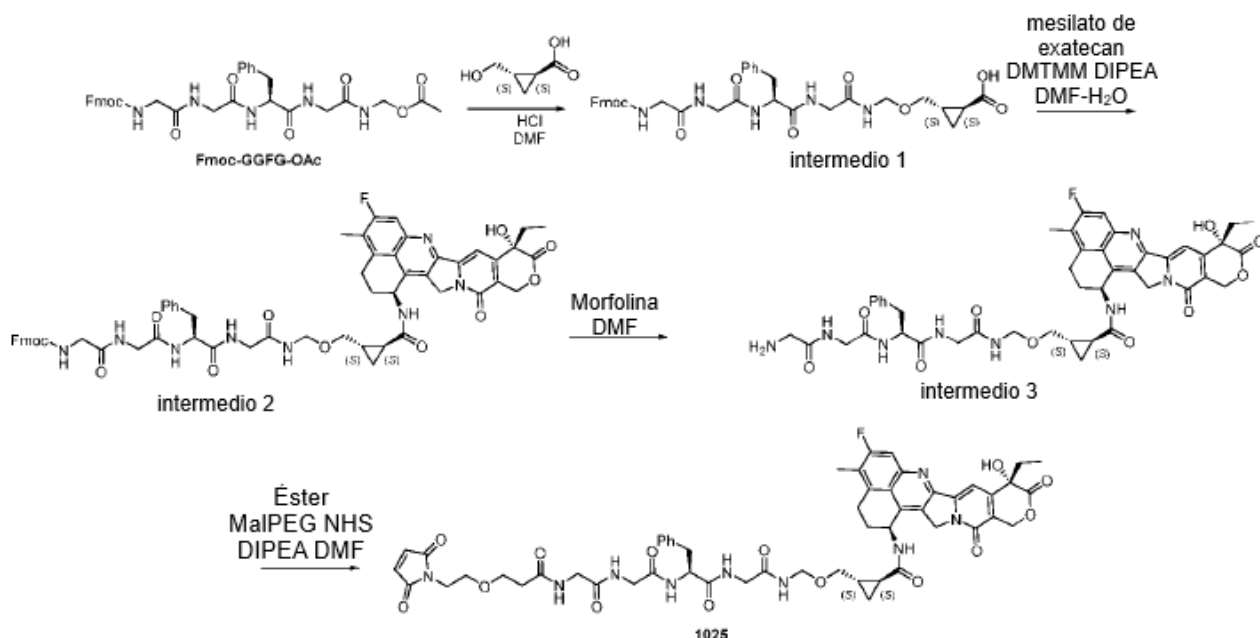
[00239] El Compuesto 3013 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 37 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1017 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 6,6 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1200 Da.

Ejemplo 51: Síntesis del Compuesto 3038

[00240] El Compuesto 3038 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 37 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1017 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,6 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1200 Da.

Ejemplo 52: Síntesis del Compuesto 3059

[00241] El Compuesto 3059A se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 37 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1017 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1200 Da. Se ajustaron las relaciones molares de mAb y carga de enlazador para lograr una DAR de 7,7 (compuesto 3059B).

Ejemplo 53: Síntesis del Compuesto 1025

[00242] **Intermedio 1.** Se disolvió FmocGGFG-OAc (1 equiv., 0,0892 mmol, 60 mg) en 2 mL de DMF y se añadió ácido (1S,2S)-2-(hidroximetil)ciclopropano-1-carboxílico (2 equiv., 0,1784 mmol, 21 mg), seguido de 10 µL de una solución de HCl 4 M en dioxano. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora

a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se hizo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (43 mg, 70 %). MS calc. para C₃₆H₄₀N₅O₉: 686,28, observado: 686,34, [M+H]⁺.

- 5 **[00243] Intermedio 2.** A una solución del intermedio 1 previamente preparado (43 mg, 0,0628 mmol) en DMF (2 mL) se añadieron mesilato de exatecan (1,1 equiv., 0,0691 mmol, 37 mg), DMTMM (1,2 equiv., 0,0754 mmol, 21 mg), DIPEA (20 µL) y agua (400 µL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se hizo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/TFA al 0/1 %). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (41 mg, 59 %). MS calc. para C₆₀H₆₀FN₈O₁₂: 1103,43, observado: 1103,40, [M+H]⁺.

- 15 **[00244] Intermedio 3.** Se disolvió el intermedio 2 previamente preparado (41 mg, 0,0372 mmol) en DMF (2 mL) y se agregó morfolina (100 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (14 mg, 44 %). MS calc. para C₄₅H₅₀FN₈O₁₀: 881,36, observado: 881,65, [M+H]⁺.

- 20 **[00245] Compuesto 1025.** Se disolvió el intermedio 3 previamente preparado (14 mg, 0,0160 mmol) en 2 mL de DMF anhidra. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,1 equiv., 0,0175 mmol, 5,4 mg) y DIPEA (2,5 µL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (7 mg, 41 %). MS calc. para C₅₄H₅₉FN₉O₁₄: 1076,42, observado: 1076,42, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,73 (t, *J* = 9,3 Hz, 1H), 8,42 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 8,25 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,10 (q, *J* = 7,5, 6,4 Hz, 2H), 7,99 (q, *J* = 6,7, 5,8 Hz, 1H), 7,79 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,29 – 7,19 (m, 4H), 7,19 – 7,12 (m, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,56 (m, 1H), 5,49 – 5,38 (m, 2H), 5,19 (s, 2H), 5,16 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 4,56 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,52 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,48 (m, 1H), 3,78 – 3,69 (m, 2H), 3,67 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,57 (d, *J* = 5,8 Hz, 3H), 3,53 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,46 (t, *J* = 5,8 Hz, 3H), 3,26 (m, 1H), 3,14 (m, 1H), 3,02 (m, 1H), 2,80 – 2,75 (m, 1H), 2,39 (d, *J* = 3,9 Hz, 3H), 2,32 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,14 (m, 2H), 1,86 (m, 2H), 1,61 – 1,49 (m, 2H), 1,03 (m, 1H), 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 0,77 (p, *J* = 4,1 Hz, 1H).

Ejemplo 54: Síntesis del Compuesto 3011

[00246] El Compuesto 3011 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1025 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado

de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 5,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1076 Da.

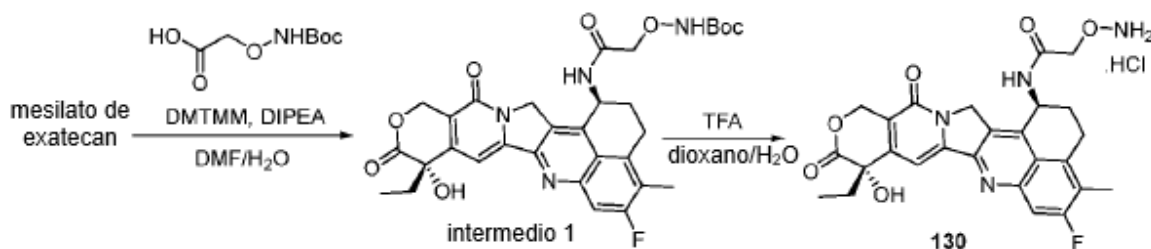
Ejemplo 55: Síntesis del Compuesto 3036

[00247] El Compuesto 3036 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1025 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1076 Da.

Ejemplo 56: Síntesis de los compuestos 3058A y 3058B

[00248] El Compuesto 3058A se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1025 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 7,1 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1076 Da. Se ajustaron las relaciones molares de mAb y carga de enlazador para lograr una DAR de 3,1 (compuesto 3058B).

Ejemplo 57: Síntesis del compuesto 130

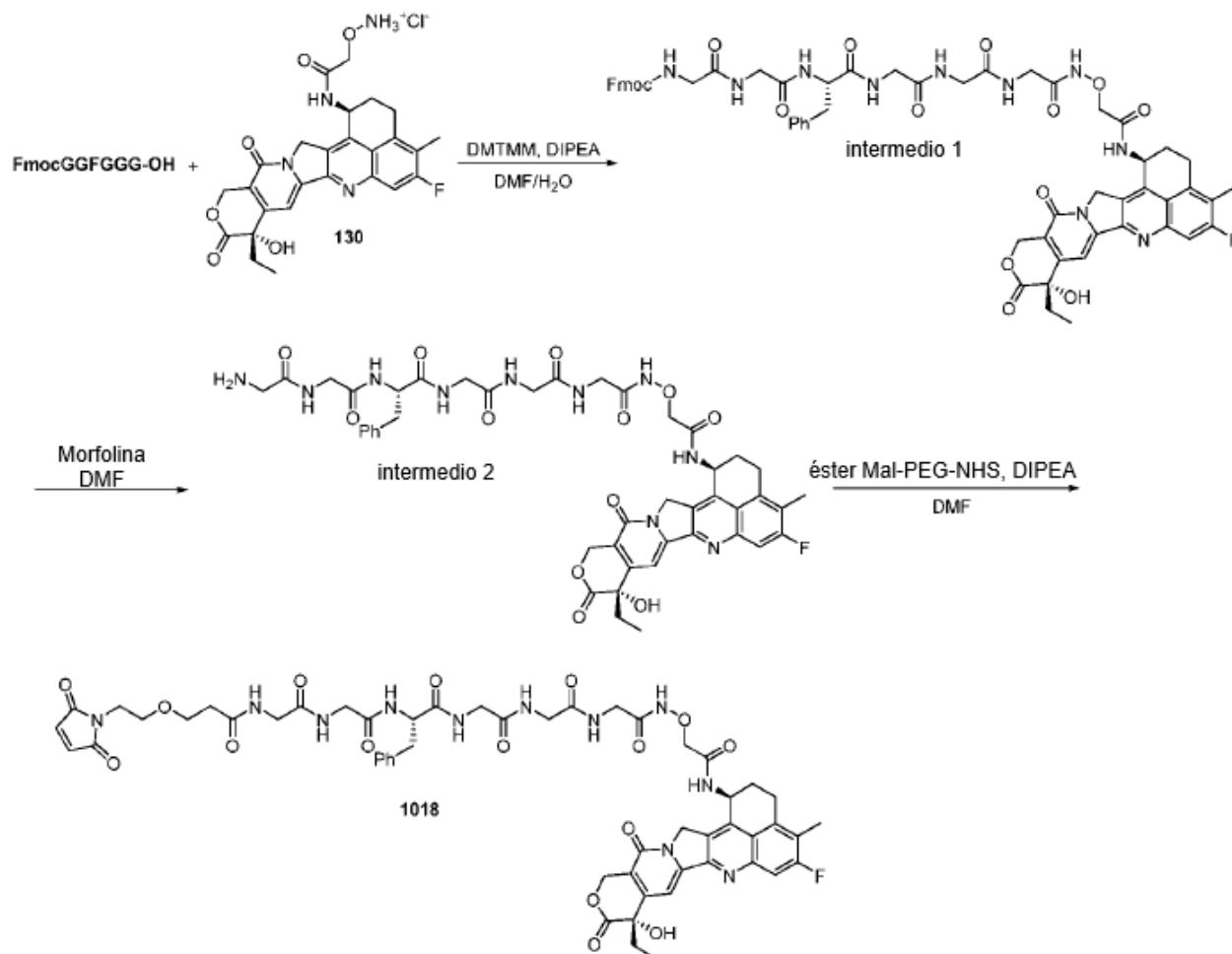


[00249] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de exatecan (1 equiv., 40 mg, 0,075 mmol), ácido 2-(((*tert*-butoxicarbonil)amino)oxi)acético (1,2 equiv., 18 mg, 0,090 mmol) y DMTMM (1,2 equiv., 25 mg, 0,090 mmol) se añadió DMF/agua (5:1, 2 ml) y diisopropiletilamina (2,2 equiv., 0,165 mmol, 29 μ L) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/H₂O) ofreció el intermedio 1 (43 mg, 94 %) como un polvo blanco después de la liofilización.

[00250] Compuesto 130. El intermedio 1 (43 mg, 0,070 mmol) se disolvió en HCl 4 M/dioxano (2 ml) y la mezcla se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró y los sólidos se lavaron con dioxano y Et₂O para dar el clorhidrato del compuesto 130 (35 mg, 90 %) como un polvo amarillo. MS calc. para C₂₆H₂₆FN₄O₆: 509,18, observado: 509,20, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10,98 (s br, 3H), 8,89 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,81 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 5,62 (dt, *J* = 8,5, 4,2 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,37 – 5,24 (m, 2H), 4,63 – 4,52 (m, 2H), 3,20 (dd, *J* = 7,9, 4,7 Hz, 2H), 2,41 (d, *J* = 1,9 Hz, 3H), 2,32 – 2,21 (m, 1H), 2,21 – 2,09 (m, 1H), 1,96 – 1,77 (m, 2H), 0,87 (t, *J* = 7,3

Hz, 3H).

Ejemplo 58: Síntesis del Compuesto 1018



[00251] Intermedio 1. A la mezcla de compuesto 130 (1,0 equiv., 30 mg, 0,055 mmol),
 5 FmocGGFGGG-OH (1,25 equiv., 47 mg, 0,069 mmol) y DMTMM (1,25 equiv., 19 mg, 0,069 mmol) se le
 añadió DMF/agua (5:1, 2,4 ml) y diisopropiletilamina (2,25 equiv., 22 µL, 0,124 mmol) y la mezcla
 resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el
 consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía
 ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 75 % ACN/H₂O), lo que ofrece el
 10 intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (48 mg, 75 %). MS calc. para
 C₆₀H₆₀FN₁₀O₁₄: 1163,43, observado: 1163,40, [M+H]⁺.

[00252] Intermedio 2. Se agregó morfolina (100 µL) a la solución de intermedio 1 (1,0 equiv., 48 mg,
 0,041 mmol) en DMF anhidra (1,5 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura
 ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente
 15 mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O),

lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (26 mg, 67 %). Cálculo MS para $C_{45}H_{50}FN_{10}O_{12}$: 941,36, encontrado: 941,40, $[M+H]^+$.

[00253] Compuesto 1018. Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,027 mmol, 8,4 mg) y DIPEA (1,1 equiv., 0,030 mmol, 5,2 μ L) a la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 26 mg, 0,027 mmol) en DMF anhidra (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, hasta que la LC-MS indicó el consumo total del material de partida. Se eliminó la DMF y el residuo se concentró de la mezcla de solución acuosa al 0,1 %. ACN y TFA ac. La purificación mediante HPLC ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 60 % ACN/ H_2O) ofreció el producto deseado como un sólido blanco después de la liofilización (17 mg, 55 %). MS calc. para $C_{54}H_{59}FN_{11}O_{16}$: 1136,41, observado: 1136,45, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11,45 (s, 1H), 8,96 – 8,68 (m, 1H), 8,26 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 8,22 – 8,04 (m, 3H), 8,04 – 7,93 (m, 2H), 7,87 – 7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,23 (d, J = 6,9 Hz, 4H), 7,19 – 7,12 (m, 1H), 6,99 (s, 1H), 6,59 – 6,44 (m, 1H), 5,64 – 5,54 (m, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,35 – 5,10 (m, 2H), 4,50 (td, J = 9,8, 9,1, 4,6 Hz, 1H), 4,45 – 4,28 (m, 2H), 3,79 – 3,39 (m, 17H), 3,25 – 3,10 (m, 2H), 3,09 – 2,99 (m, 1H), 2,88 – 2,72 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,32 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,27 – 2,02 (m, 2H), 1,96 – 1,78 (m, 2H), 0,86 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 59: Síntesis del Compuesto 3015

[00254] El Compuesto 3015 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1018 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1136 Da.

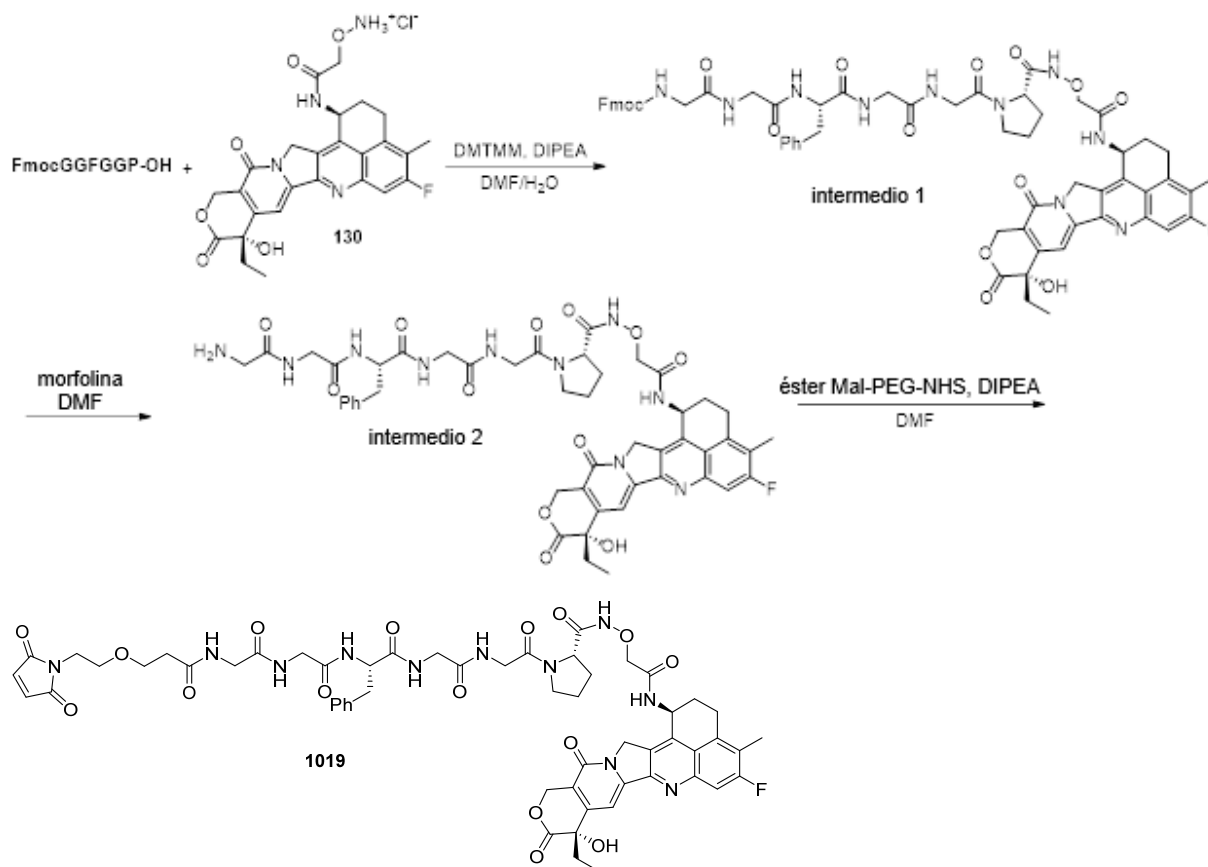
Ejemplo 60: Síntesis del Compuesto 3040

[00255] El Compuesto 3040 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1018 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 4,8 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1136 Da.

Ejemplo 61: Síntesis del compuesto 3061

[00256] El Compuesto 3061 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1018 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 6,3 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1136 Da.

Ejemplo 62: Síntesis del Compuesto 1019



[00257] Intermedio 1. La mezcla de compuesto 130 (1,0 equiv., 35 mg, 0,064 mmol), FmocGGFGGP-OH (1,2 equiv., 55 mg, 0,077 mmol) y DMTMM (1,2 equiv., 22 mg, 0,077 mmol) se le añadió DMF/agua (5:1, 2,4ml) y diisopropiletilamina (2,2 equiv., 25 μ L, 0,141 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g de C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 75 % ACN/H₂O), lo que ofrece el intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (65 mg, 84 %). Cálculo MS para C₆₃H₆₄FN₁₀O₁₄: 1203,46, encontrado: 1203,50, [M+H]⁺.

[00258] Intermedio 2. Se agregó morfolina (130 μ L) a la solución de intermedio 1 (1,0 equiv., 65 mg, 0,054 mmol) en DMF anhidra (1,7 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 60 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (34 mg, 64 %). MS calc. para C₄₈H₅₄FN₁₀O₁₂: 981,39, observado: 981,40, [M+H]⁺.

[00259] Compuesto 1019. Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,035 mmol, 10,8 mg) y DIPEA (1,05 equiv., 0,037 mmol, 6,4 μ L) a la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 34 mg, 0,035 mmol)

en DMF anhidra (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h hasta que LC-MS indicó el consumo total del material de partida. Se removió la DMF y se concentró el residuo de la mezcla con ACN y TFA ac. al 0,1 %. La purificación mediante HPLC ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O) ofreció el producto deseado como un sólido blanco después de la liofilización (18 mg, 44 %). MS calc. para C₅₇H₆₃FN₁₁O₁₆: 1176,44, observado: 1176,45, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11,50 (s, 1H), 8,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 8,31 – 8,25 (m, 1H), 8,16 – 8,02 (m, 3H), 7,96 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,88 – 7,77 (m, 2H), 7,74 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 7,35 – 7,28 (m, 2H), 7,28 – 7,18 (m, 5H), 7,18 – 7,11 (m, 1H), 6,99 (s, 1H), 6,57 – 6,46 (m, 1H), 5,70 – 5,58 (m, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,35 – 5,11 (m, 3H), 4,54 – 4,46 (m, 1H), 4,32 (s, 2H), 4,08 – 4,03 (m, 1H), 3,90 – 3,39 (m, 14H), 3,24 – 3,10 (m, 2H), 3,03 (dd, *J* = 13,9, 4,4 Hz, 1H), 2,77 (dd, *J* = 13,9, 9,8 Hz, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,32 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,26 – 2,11 (m, 2H), 1,97 – 1,77 (m, 3H), 1,69 – 1,51 (m, 1H), 0,86 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H).

Ejemplo 63: Síntesis del compuesto 3014

[00260] El Compuesto 3014 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1019 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 5,2 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1176 Da.

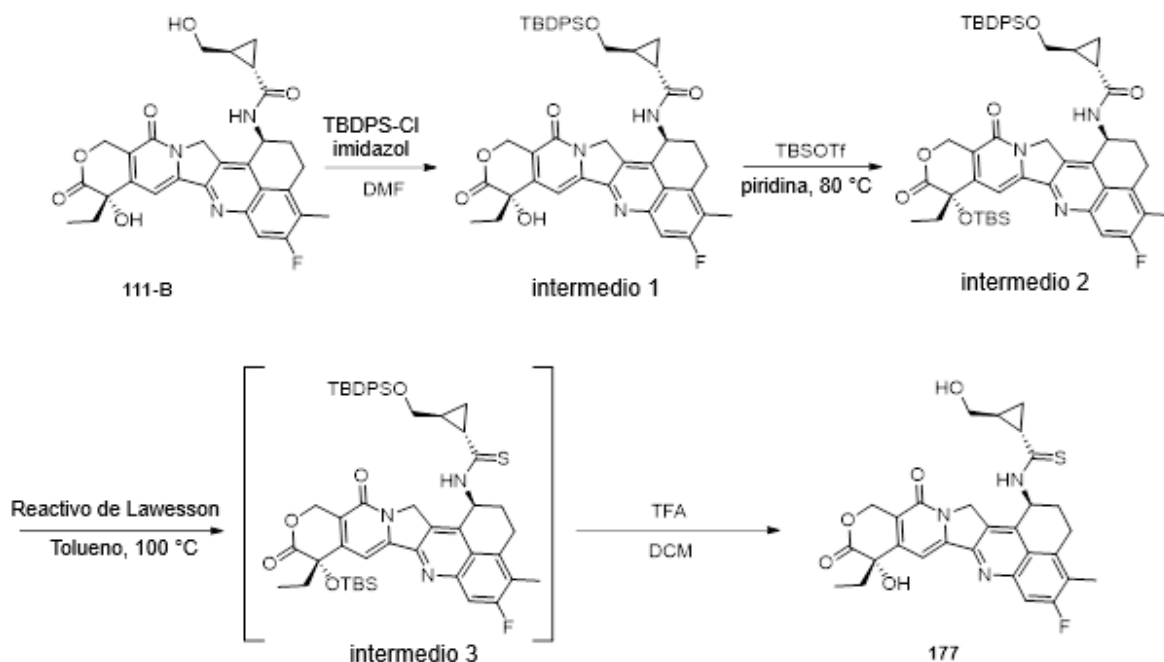
Ejemplo 64: Síntesis del Compuesto 3039

[00261] El Compuesto 3039 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1019 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1176 Da.

Ejemplo 65: Síntesis del Compuesto 3060

[00262] El Compuesto 3060 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1019 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC-MS fue de 7,8 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1176 Da.

Ejemplo 66: Síntesis del compuesto 177



[00263] Intermedio 1. A la solución del compuesto 111-B (1,0 equiv., 20 mg, 0,036 mmol) e imidazol (2,5 equiv., 0,094 mmol, 6,4 mg) en DMF (2 mL) se añadió *tert*-butil(cloro)difenilsilano (2 equiv., 0,075 mmol, 19,5 μ L) bajo una atmósfera de argón y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La purificación por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 80 % ACN/H₂O) ofreció el producto intermedio 1 (22 mg, 79 %) como un polvo blanquecino después de la liofilización.

[00264] Intermedio 2. A la solución del intermedio 1 (22 mg, 0,029 mmol) en piridina seca (2 mL) se añadió trifluorometanosulfonato *de tert*-butildimetilsililo (0,436 mmol, 100 μ L) bajo una atmósfera de argón y la mezcla se calentó a 80 °C durante 4 horas. Luego, se concentró en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/H₂O), dando el producto intermedio 2 (23 mg, 89 %) como un polvo blanco después de la liofilización.

[00265] Compuesto 177. A la mezcla de intermedio 2 (23 mg, 0,026 mmol) y reactivo de Lawesson (1,0 equiv., 0,026 mmol, 10,5 mg) se añadió tolueno anhidro (8 ml) y la mezcla resultante se calentó a 100 °C durante 1 hora. El progreso de la reacción se controló mediante LC-MS. Luego, los componentes volátiles se eliminaron en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100% ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el intermedio 3 se combinaron y se concentraron en un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en DCM (2 ml) y ácido trifluoroacético (1 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas y se controló el progreso de la reacción mediante LC-MS. Luego, los solventes se eliminaron en

Ejemplo 67: Síntesis del compuesto 1034



15

[00267] Intermedio 2. A la solución del intermedio 1 (1,0 equiv., 11 mg, 0,010 mmol) en DMF (0,75 ml) se añadió morfolina (40 µl) y la mezcla se agitó 45 min a temperatura ambiente. Luego, la mezcla de

reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/ TFA al 0,1 % ac.), dando el intermedio 2 (4,5 mg, 45 %) como un sólido amarillo pálido. MS calc. para $C_{45}H_{50}FN_8O_9S$: 897,34, observado: 897,35, $[M+H]^+$.

- 5 **[00268] Compuesto 1034.** Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,05 equiv., 1,45 mg, 0,0047 mmol) y DIPEA (2,1 equiv., 2,0 μ l, 0,0095 mmol) a la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 4,5 mg, 0,0045 mmol) en DMF anhidro (0,5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La purificación por cromatografía ultrarrápida de fase inversa usando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 70 % ACN/ H_2O) dio el compuesto del producto 1034 (4,2 mg, 85 %) como un
- 10 sólido blanco después de la liofilización. MS calc. para $C_{54}H_{59}FN_9O_{13}S$: 1092,39, observado: 1092,35, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10,66 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,48 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 8,28 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 8,14 – 8,06 (m, 2H), 8,00 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 7,83 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 7,35 – 7,30 (m, 1H), 7,28 – 7,12 (m, 5H), 7,00 (s, 2H), 6,52 (s, 1H), 6,45 – 6,34 (m, 1H), 5,42 (s, 1H), 5,21 – 5,02 (m, 3H), 4,58 – 4,52 (m, 2H), 4,52 – 4,44 (m, 1H), 3,78 – 3,63 (m, 5H), 3,62 – 3,50 (m, 6H), 3,46 (t, J = 5,8 Hz,
- 15 2H), 3,22 – 3,17 (m, 2H), 3,09 – 2,99 (m, 1H), 2,84 – 2,74 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,36 – 2,30 (m, 2H), 2,30 – 2,22 (m, 2H), 2,13 – 2,06 (m, 1H), 1,95 – 1,79 (m, 3H), 1,47 – 1,37 (m, 1H), 1,05 – 0,94 (m, 1H), 0,87 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

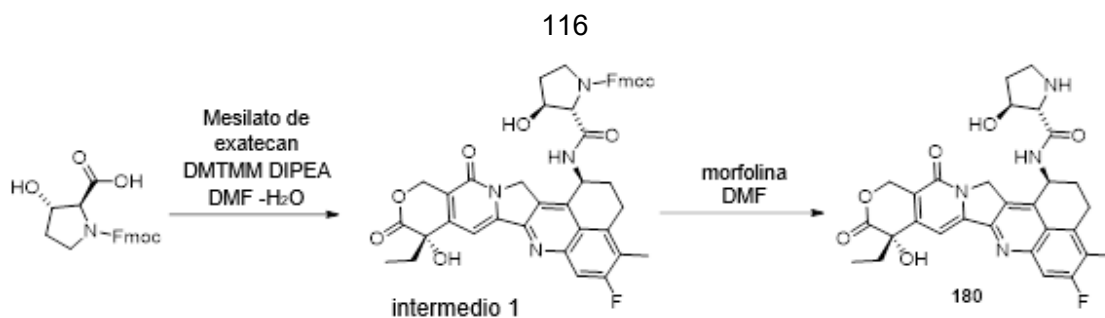
Ejemplo 68: Síntesis del Compuesto 3100

- [00269]** El Compuesto 3100 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos
- 20 generales en el Ejemplo 1 con 6 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1034 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC fue de 3,6 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1092 Da.

Ejemplo 69: Síntesis del Compuesto 3101

- 25 **[00270]** El Compuesto 3101 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 6 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1034 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC-MS fue de 3,7 con base en un peso molecular de fármaco y enlazador de 1092 Da.

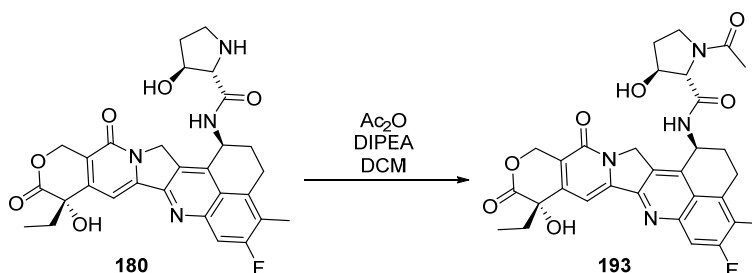
Ejemplo 70: Síntesis del compuesto 180



[00271] Intermedio 1. Se disolvieron mesitato de exatecan (90 mg, 0,17 mmol), ácido *N*-1-Fmoc-(2*S*,3*S*)-3-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (90 mg, 0,26 mmol) y DIPEA (100 μ L) en DMF (3 mL) y agua (1 mL). Se añadió DMTMM (70 mg, 0,26 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se hizo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/H₂O(TFA)). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (107 mg, 82 %). MS calc. para C₄₄H₄₀FN₄O₈⁺: 771,28, encontrado: 771,35 [M+H]⁺.

[00272] Compuesto 180. A una solución del intermedio 1 (33 mg, 0,0428 mmol) en DMF (2 ml), se añadió morfolina (100 μ L) y la mezcla se agitó 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 60 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que da el compuesto 180 (15 mg, 57 %) como un polvo blanco después de la liofilización. MS calc. para C₂₉H₃₀FN₄O₆: 549,21, observado: 549,48 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,62 (s, 1H), 9,26 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 8,81 (s, 1H), 7,83 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 6,54 (s, 1H), 5,67 (s, 1H), 5,61 (m, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,30 (d, *J* = 18,7 Hz, 1H), 5,08 (d, *J* = 18,7 Hz, 1H), 4,42 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 4,05 (s, 1H), 3,45 (s, 2H), 3,22 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,42 (d, *J* = 1,8 Hz, 3H), 2,29 – 2,15 (m, 1H), 2,10 – 1,97 (m, 1H), 1,87 (m, 3H), 0,89 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

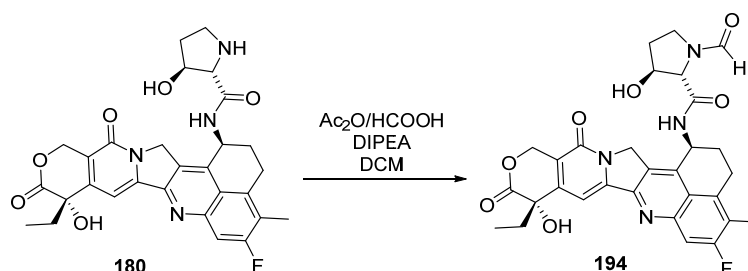
Ejemplo 71: Síntesis del compuesto 193



[00273] Compuesto 193. El compuesto 180 (10 mg, 0,018 mmol) y DIPEA (5 μ L) se disolvieron en DCM (2 mL). Se añadió Ac₂O(2,6 μ L, 0,027) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificada con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (4,9 mg, 46 %). MS calc. para C₃₁H₃₂FN₄O₇⁺: 591,22, observado: 591,25

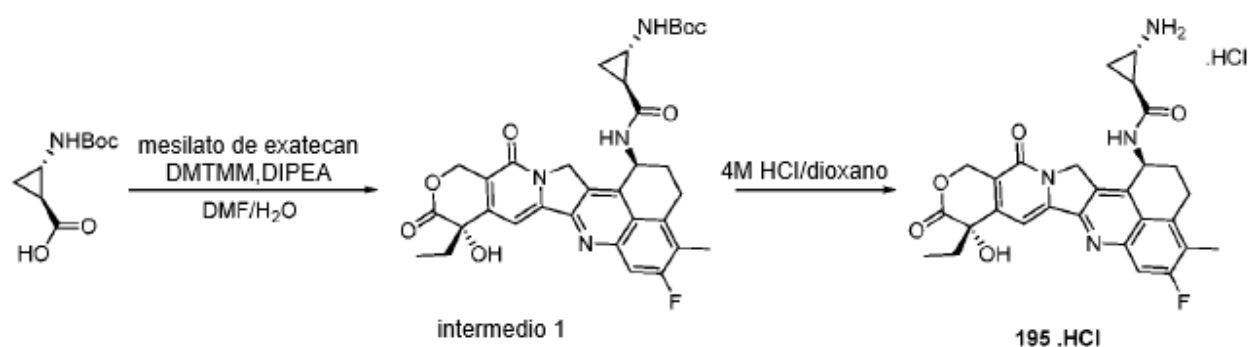
[M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,54 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,81 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,52 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 5,51 (m, 2H), 5,44 (m, 3H), 5,30 (d, *J* = 18,7 Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,25 (s, 1H), 4,17 (s, 1H), 3,58 (m, 2H), 3,17 (d, *J* = 8,1 Hz, 3H), 2,41 (m, 3H), 2,17 (s, 1H), 2,09 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), 1,88 (m, 3H), 1,76 (s, 1H), 0,90 (q, *J* = 7,3, 6,7 Hz, 3H).

5 **Ejemplo 72: Síntesis del compuesto 194**



[00274] Compuesto 194. Se añadieron anhídrido acético fórmico (2,2 equiv., 0,048, 4,2 μL) y diisopropiletilamina (2,5 equiv., 0,055 mmol, 10 μL) a la solución del compuesto 180 (1,0 equiv., 15 mg, 0,027 mmol) en DCM (2 ml) y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego, la mezcla se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 → 50 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (5,5 mg, 46 %). MS calc. para C₃₀H₃₀FN₄O₇⁺: 577,20, observado: 577,25 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,85 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 8,59 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 8,20 – 8,12 (m, 1H), 7,80 (m, 1H), 7,32 (d, *J* = 0,9 Hz, 2H), 6,67 (s, 1H), 5,62 – 5,50 (m, 1H), 5,22 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 4,39 – 4,26 (m, 2H), 3,66 – 3,61 (m, 1H), 3,17 (d, *J* = 5,7 Hz, 4H), 2,41 (d, *J* = 1,8 Hz, 3H), 2,21 – 2,12 (m, 1H), 2,06 – 1,96 (m, 1H), 1,93 – 1,84 (m, 2H), 1,76 (s, 2H), 0,93 – 0,85 (m, 3H).

Ejemplo 73: Síntesis del compuesto 195

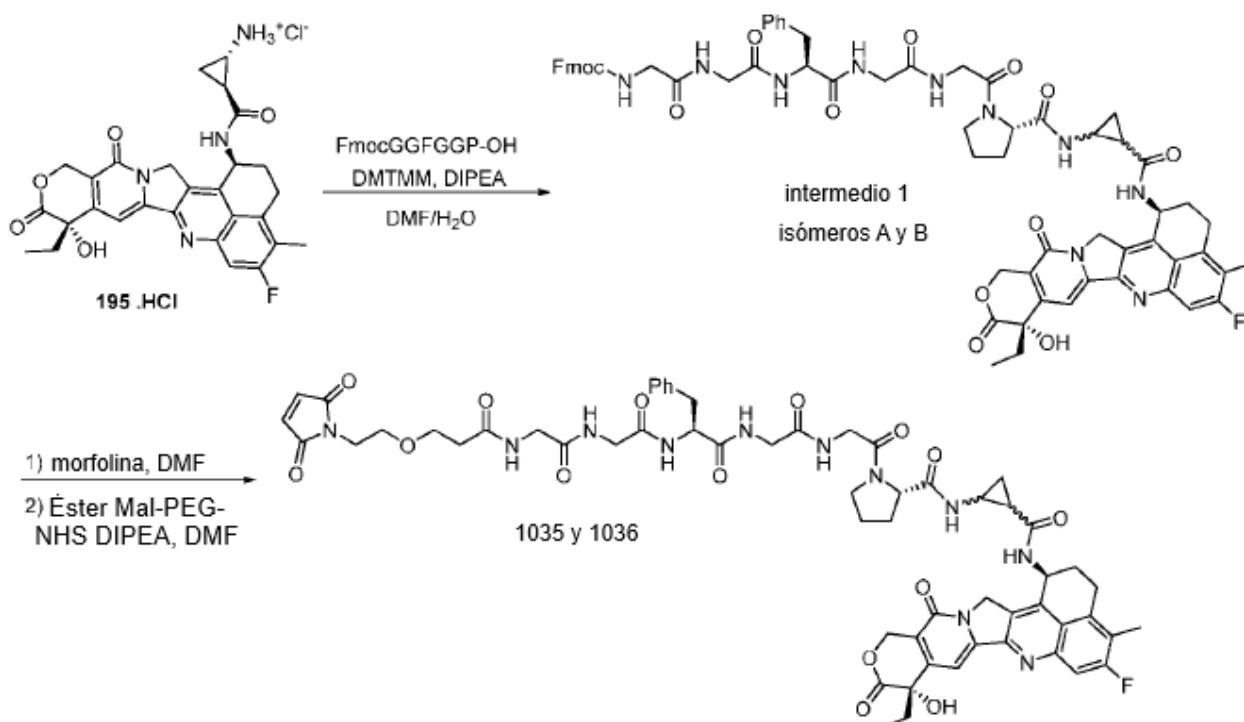


[00275] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 40 mg, 0,075 mmol), ácido (1*S*,2*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)ciclopropano-1-carboxílico (1,2 equiv., 18 mg, 0,090 mmol) y DMTMM (1,2 equiv., 25 mg, 0,090 mmol) se añadió DMF/agua (5:1, 1,8 ml) y diisopropiletilamina (2,2 equiv., 29 μl, 0,165 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos,

mientras que el análisis LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 75 % ACN/H₂O), ofreciendo el intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (38 mg, 82 %). Cálculo MS para C₃₃H₃₆FN₄O₇: 619,26, encontrado: 619,25, [M+H]⁺.

- 5 **[00276] Compuesto 195.** El intermedio 1 obtenido (38 mg, 0,061 mmol) se disolvió en HCl 4 M/dioxano (3 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró, el material sólido se lavó con dioxano y Et₂O y se secó al vacío, obteniéndose el clorhidrato del compuesto 195 (25 mg, 74 %) como un sólido amarillo. Cálculo de MS para C₂₈H₂₈FN₄O₅: 519,20, encontrado: 519,20, [M+H]⁺. El producto es inestable y sufre descomposición durante la preparación y
- 10 los análisis posteriores.

Ejemplo 74: Síntesis de los compuestos 1035 y 1036



- 15 **[00277] Intermedio 1.** A la mezcla del compuesto 195.HCl (1,0 equiv., 24 mg, 0,039 mmol), Fmoc-GGFGGP-OH (1,0 equiv., 31 mg, 0,039 mmol) y DMTMM (1,1 equiv., 14 mg, 0,043 mmol) se le añadió DMF/agua (5:1, 1,5 ml) y diisopropiletilamina (2,1 equiv., 16 µl, 0,082 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, mientras que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 80 % ACN/ TFA al 0,1 % ac.), ofreciendo el intermedio 1 (dos isómeros separados A y B), ambos como sólidos blancos después
- 20 de la liofilización (isómero A: 19 mg, isómero B: 21 mg, rendimiento combinado: 87 %). Cálculo MS para

$C_{65}H_{66}FN_{10}O_{13}$: 1213,48, encontrado: 1213,45, $[M+H]^+$.

[00278] Compuesto 1035. A la solución del isómero A de intermedio 1 (1,0 equiv., 19 mg, 0,016 mmol) en DMF (1,5 ml) se añadió morfolina (60 μ l) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se redisolvió en DMF seco (1 ml). Luego, se agregaron éster Mal-PEG-NHS (1,1 equiv., 5,4 mg, 0,017 mmol) y DIPEA (1,1 equiv., 3,0 μ l, 0,017 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 65 % ACN/ H_2O) ofreció el producto 1035 como un sólido blanco después de la liofilización (10 mg, 54 %). MS calc. para $C_{59}H_{65}FN_{11}O_{15}$: 1186,46, observado: 1186,40, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 8,30 – 8,18 (m, 1H), 8,14 – 8,02 (m, 3H), 7,96 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 7,91 – 7,78 (m, 1H), 7,74 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,27 – 7,18 (m, 5H), 7,18 – 7,12 (m, 1H), 6,99 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,72 – 5,56 (m, 1H), 5,47 – 5,36 (m, 2H), 5,27 – 5,03 (m, 2H), 4,49 (tt, J = 9,2, 5,4 Hz, 1H), 4,06 – 3,92 (m, 1H), 3,83 – 3,68 (m, 4H), 3,66 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,62 – 3,50 (m, 7H), 3,45 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 3,12 – 2,94 (m, 1H), 2,82 – 2,71 (m, 1H), 2,65 – 2,52 (m, 2H), 2,44 – 2,10 (m, 11H), 1,98 – 1,77 (m, 5H), 1,72 – 1,57 (m, 1H), 1,56 – 1,37 (m, 1H), 0,86 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

[00279] Compuesto 1036. El producto se sintetizó a partir del isómero intermedio 1 B (1,0 equiv., 21 mg, 0,017 mmol) siguiendo el mismo procedimiento que para el isómero A. El compuesto 1036 se obtuvo como un sólido blanco después de la liofilización (11 mg, 55 %). MS calc. para $C_{59}H_{65}FN_{11}O_{15}$: 1186,46, observado: 1186,45, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 8,69 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,26 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 8,11 – 8,06 (m, 2H), 8,02 – 7,92 (m, 1H), 7,84 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 7,76 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,27 – 7,19 (m, 5H), 7,19 – 7,12 (m, 1H), 6,99 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,47 – 5,38 (m, 2H), 5,37 – 5,31 (m, 1H), 5,29 – 5,22 (m, 1H), 5,10 (d, J = 18,6 Hz, 1H), 5,00 (d, J = 18,6 Hz, 1H), 4,54 – 4,43 (m, 1H), 4,22 – 4,15 (m, 1H), 4,04 – 3,93 (m, 1H), 3,92 – 3,80 (m, 1H), 3,79 – 3,69 (m, 4H), 3,68 – 3,63 (m, 2H), 3,62 – 3,50 (m, 7H), 3,50 – 3,42 (m, 3H), 3,19 – 2,97 (m, 2H), 2,82 – 2,70 (m, 1H), 2,43 – 2,22 (m, 8H), 2,21 – 1,97 (m, 2H), 1,95 – 1,72 (m, 4H), 1,72 – 1,59 (m, 1H), 0,87 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

Ejemplo 75: Síntesis del Compuesto 3016

[00280] El Compuesto 3016 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1035 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1186 Da.

Ejemplo 76: Síntesis del compuesto 3041

[00281] El Compuesto 3041 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 6 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1035 a

anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1186 Da.

Ejemplo 77: Síntesis de los compuestos 3062A y 3062B

[00282] El Compuesto 3062A se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1035 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **1**. La DAR con base en RPLC fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1186 Da. Cuando se usaron 25 equivalentes molares de compuesto de carga de enlazador 1035 al anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **1**, se logró una DAR de 4,7 para proporcionar el compuesto 3062B.

Ejemplo 78: Síntesis del Compuesto 3017

[00283] El Compuesto 3017 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1036 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1186 Da.

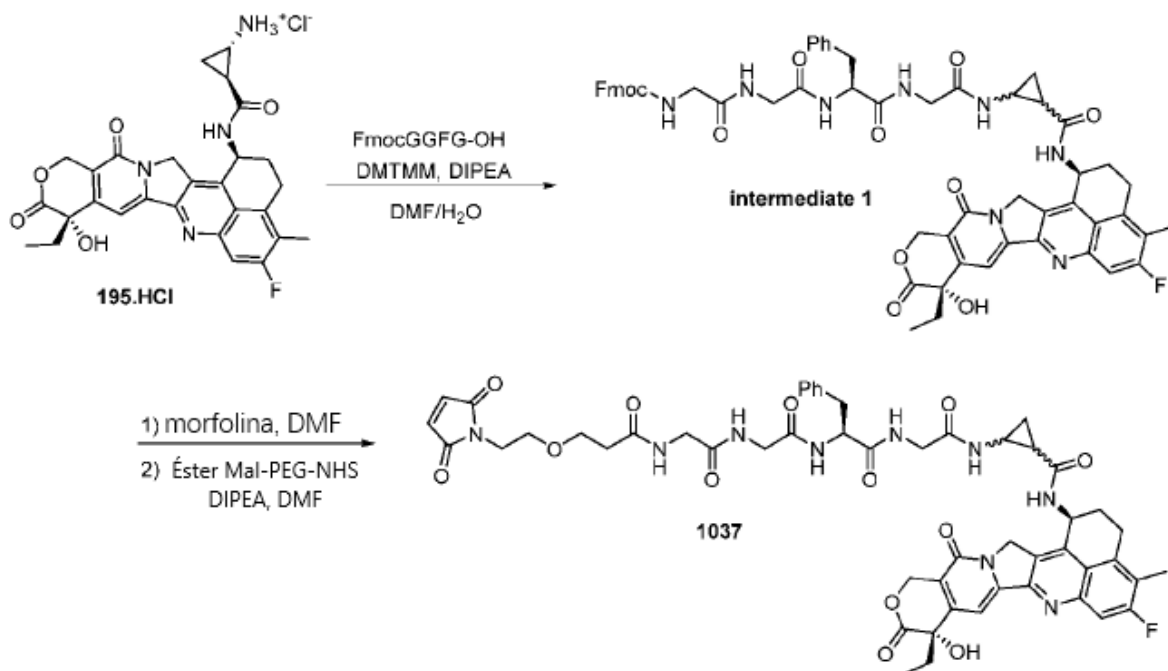
Ejemplo 79: Síntesis del Compuesto 3042

[00284] El Compuesto 3042 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 6 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1036 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1186 Da.

Ejemplo 80: Síntesis del Compuesto 3063

[00285] El Compuesto 3063 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 6 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1036 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **1**. La DAR con base en RPLC-MS fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1186 Da.

Ejemplo 81: Síntesis del compuesto 1037



[00286] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de 195.HCl (1,0 equiv., 15 mg, 0,024 mmol), Fmoc-GGFG-OH (1,05 equiv., 14 mg, 0,025 mmol) y DMTMM (1,05 equiv., 6,9 mg, 0,025 mmol) se le añadió DMF/agua (5:1, 1,5 ml) y diisopropiletilamina (2,05 equiv., 8,6 µl, 0,049 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, mientras que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (C18 modificado con diol, 0 → 80 % ACN/ TFA al 0,1 % ac.), que ofrece el intermedio 1 como un sólido de color amarillo pálido después de la liofilización (12 mg, 47 %). MS calc. para C₅₈H₅₆FN₈O₁₁: 1059,40, observado: 1059,35, [M+H]⁺.

[00287] Compuesto 1037. Se agregó morfolina (45 µl) a la solución de intermedio 1 (1,0 equiv., 12 mg, 0,011 mmol) en DMF (1,25 ml) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad y el residuo se redisolvió en DMF seca (0,75 ml). Luego, se agregaron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 3,4 mg, 0,011 mmol) y DIPEA (1,05 equiv., 2,0 µl, 0,012 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 65 % ACN/H₂O) ofreció el producto 1037 (mezcla de isómeros) como un sólido blanco después de la liofilización (6,6 mg, 58 %). MS calc. para C₅₂H₅₅FN₉O₁₃: 1032,39, observado: 1032,35, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,58 (d, *J* = 9,1 Hz, 0,4H), 8,43 (t, *J* = 6,0 Hz, 0,4H), 8,32 – 8,13 (m, 2,2H), 8,13 – 8,03 (m, 2H), 8,03 – 7,92 (m, 1H), 7,79 – 7,66 (m, 1H), 7,34 (s, 0,4H), 7,31 (s, 0,6H), 7,27 – 7,17 (m, 3H), 7,17 – 7,09 (m, 2H), 6,99 (s, 2H), 6,53 (s, 0,4H), 6,50 (s, 0,6H), 5,85 – 5,75 (m, 0,6H), 5,64 –

5,52 (m, 0,6H), 5,49 – 5,35 (m, 2H), 5,39 – 4,93 (m, 2,8H), 4,52 – 4,42 (m, 0,4H), 4,32 – 4,20 (m, 0,6H), 3,83 – 3,59 (m, 4H), 3,59 – 3,47 (m, 5H), 3,44 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,18 – 2,92 (m, 2H), 2,90 – 2,57 (m, 2H), 2,45 – 2,26 (m, 7H), 2,26 – 2,04 (m, 1H), 1,92 – 1,75 (m, 3H), 1,30 – 1,20 (m, 2H), 0,88 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

5 **Ejemplo 82: Síntesis del Compuesto 3018**

[00288] El Compuesto 3018 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1037 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1032 Da.

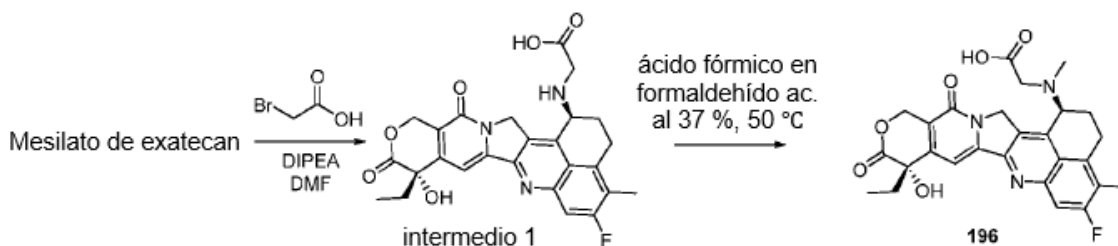
10 **Ejemplo 83: Síntesis del Compuesto 3043**

[00289] El Compuesto 3043 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1037 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La DAR con base en RPLC fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1032 Da.

15 **Ejemplo 84: Síntesis del Compuesto 3064**

[00290] El Compuesto 3064 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1037 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RPLC fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1032 Da.

20 **Ejemplo 85: Síntesis del compuesto 196**

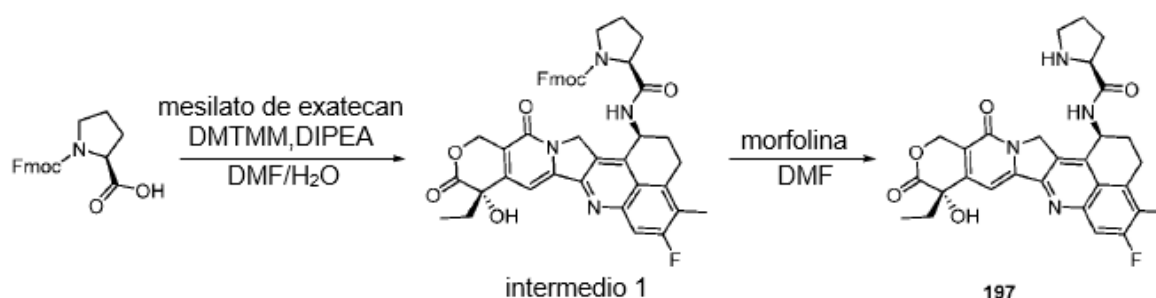


[00291] Intermedio 1. A una solución de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 30 mg, 0,0564 mmol) y diisopropiletilamina (30 μL) en DMF (2 mL) se añadió ácido bromoacético (1,2 equiv., 0,0677 mmol, 9,4 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 60 % ACN/TFA al 0,1 %), dando el intermedio 1 (23 mg, 83 %) como un polvo blanco después de la liofilización. Cálculo MS para $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{FN}_3\text{O}_6$: 492,16, encontrado: 492,11 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

[00292] Compuesto 196. A la solución del intermedio 1 (1,0 equiv., 23 mg, 0,0466 mmol) en ácido

fórmico (1 ml) se añadió formaldehído acuoso al 37% (0,25 ml) y la mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 6 horas. Luego se añadió agua y se concentró la mezcla en un evaporador rotatorio. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que da 196 (14 mg, 61 %) como un polvo blanco después de la liofilización. MS calc. para $C_{27}H_{25}FN_3O_6$: 506,17, observado: 506,08 $[M-H]^-$. RMN ^1H (401 MHz, DMSO- d_6) δ 7,73 (dd, $J = 11,0, 3,8$ Hz, 1H), 7,35 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 5,54 – 5,43 (m, 2H), 5,43 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 4,53 – 4,43 (m, 1H), 3,68 (s, 4H), 3,58 (s, 1H), 3,37 – 3,29 (m, 1H), 2,98 – 2,88 (m, 2H), 2,42 – 2,31 (m, 4H), 1,87 (m, 2H), 0,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

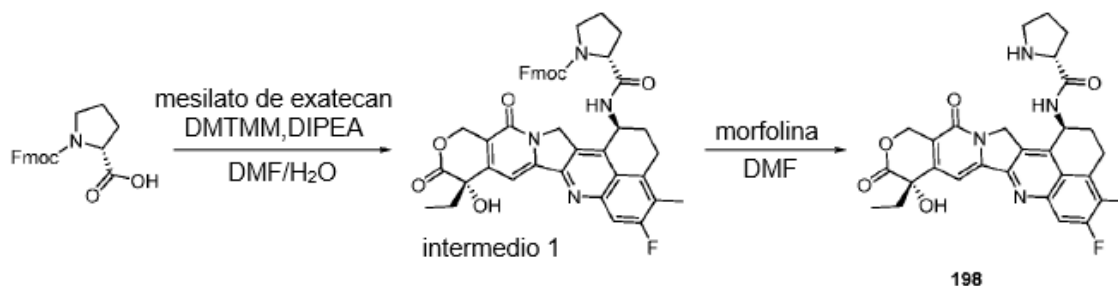
Ejemplo 86: Síntesis del compuesto 197



[00293] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 40 mg, 0,0753 mmol), Fmoc-L-prolina (1,1 equiv., 28 mg, 0,0818 mmol) y DMTMM (1,1 equiv., 23 mg, 0,0818 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 2 ml) y diisopropiletilamina (30 μ l) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, mientras que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 80 % ACN/H₂O), lo que ofrece el intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (45 mg, 79 %). Cálculo MS para $C_{44}H_{39}FN_4O_7$: 755,29, encontrado: 755,56, $[M+H]^+$.

[00294] Compuesto 197. Se agregó morfolina (100 μ l) a la solución de intermedio 1 (45 mg, 0,0595 mmol) en DMF (2 ml) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (columna semipreparativa, C18 modificada con diol, 0 → 60 % ACN/TFA al 0,1 %), dando 197 (26 mg, 82 %) como un sólido blanco. MS calc. para $C_{29}H_{29}FN_4O_5$: 533,22, observado: 533,08, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8,65 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,79 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,54 (s, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,17 (s, 1H), 5,06 (d, $J = 18,8$ Hz, 1H), 3,73 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 2,93 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,18 (m, 3H), 1,88 (m, 3H), 1,72 (m, 1H), 0,89 (t, $J = 7,35$ Hz, 3H).

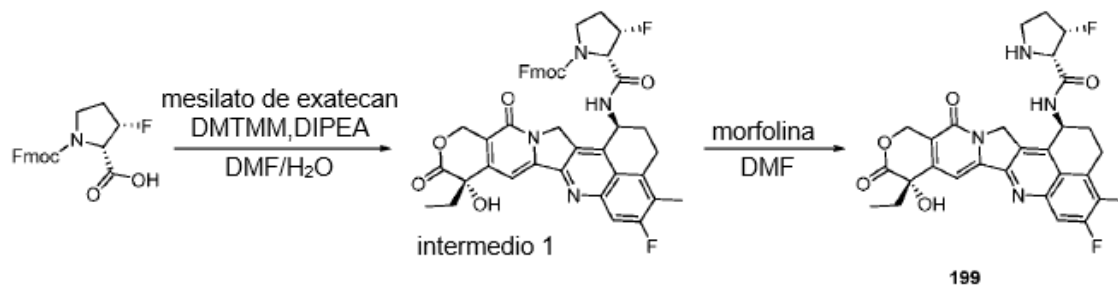
Ejemplo 87: Síntesis del compuesto 198



[00295] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 45 mg, 0,084 mmol), Fmoc-D-prolina (1,1 equiv., 31 mg, 0,092 mmol) y DMTMM (1,1 equiv., 26 mg, 0,092 mmol) se le añadió DMF/agua (5:1, 3 ml) y diisopropiletilamina (2,1 equiv., 30 μ l, 0,176 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 80 % ACN/H₂O), lo que ofrece el intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (59 mg, 93 %). MS calc. para C₄₄H₃₉FN₄O₇: 755,29, observado: 755,25, [M+H]⁺.

[00296] Compuesto 198. Se agregó morfolina (270 μ l) a la solución de intermedio 1 (59 mg, 0,078 mmol) en DMF (3 ml) y la mezcla se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró en un rotavapor seguido de la adición de EtOAc. El producto precipitado se aisló por filtración, se lavó con EtOAc y se secó al vacío, dando 198 (31 mg, 75 %) como un sólido blanco. MS calc. para C₂₉H₂₉FN₄O₅: 533,22, observado: 533,20, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8,56 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 5,58 – 5,46 (m, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,20 (d, *J* = 19,0 Hz, 1H), 5,06 (d, *J* = 18,8 Hz, 1H), 3,67 (dd, *J* = 8,9, 6,0 Hz, 1H), 3,24 – 3,04 (m, 2H), 2,85 (td, *J* = 6,5, 2,6 Hz, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,20 – 1,99 (m, 3H), 1,84 (m, 3H), 1,63 (m, 1H), 0,87 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 88: Síntesis del compuesto 199

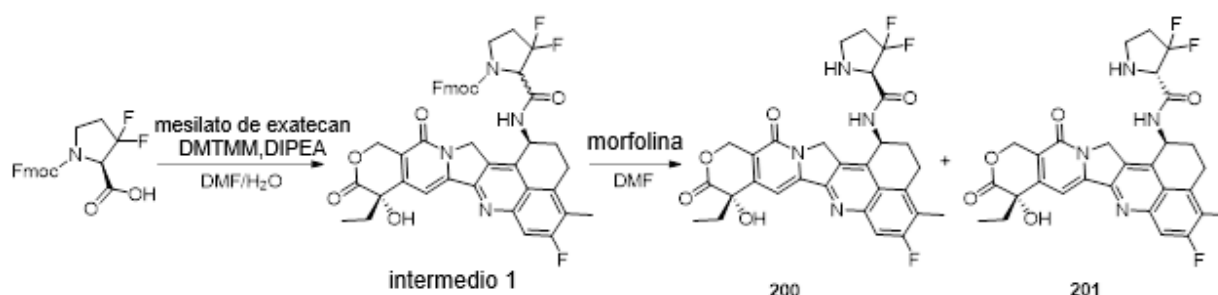


[00297] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de exatecan (1,1 equiv., 38 mg, 0,0711 mmol), Fmoc-3-fluoro-D-prolina (1 equiv., 23 mg, 0,0647 mmol) y DMTMM (1,5 equiv., 27 mg, 0,0971 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 2 ml) y diisopropiletilamina (30 μ l) y la mezcla resultante se agitó a temperatura

ambiente durante 30 minutos, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 80 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que ofrece el intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (40 mg, 73 %). MS calc. para $C_{44}H_{39}F_2N_4O_7$: 773,28, observado: 773,25, $[M+H]^+$.

[00298] Compuesto 199. Se agregó morfolina (100 μ l) a la solución de intermedio 1 (40 mg, 0,0518 mmol) en DMF (2 ml) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que da 199 (20 mg, 69 %) como un polvo blanco después de la liofilización. MS calc. para $C_{29}H_{29}F_2N_4O_5$: 551,21, observado: 551,18 $[M+H]^+$. RMN ^1H (401 MHz, DMSO- d_6) δ 9,22 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,84 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 6,56 (s, 1H), 5,71 – 5,62 (m, 2H), 5,53 – 5,48 (m, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,39 (d, J = 23,3 Hz, 2H), 5,24 (d, J = 19,0 Hz, 1H), 4,50 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 4,43 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 3,26 (m, 1H), 3,18 – 3,05 (m, 1H), 2,42 (d, J = 1,9 Hz, 3H), 2,37 – 2,28 (m, 1H), 2,24 (m, 2H), 2,19 – 2,14 (m, 1H), 1,97 – 1,78 (m, 2H), 0,87 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 89: Síntesis de los compuestos 200 y 201



[00299] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de exatecan (1 equiv., 40 mg, 0,0752 mmol), Fmoc-3,3-difluoro-L-prolina (1,2 equiv., 18 mg, 0,0903 mmol) y DMTMM (1,2 equiv., 25 mg, 0,0903 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 2 ml) y diisopropiletilamina (30 μ l) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN en TFA al 0,1 %), lo que ofrece el intermedio 1 como un sólido amarillo después de la liofilización (45 mg, 76 %). Cálculo MS para $C_{44}H_{38}F_3N_4O_7$: 791,27, encontrado: 791,35, $[M+H]^+$.

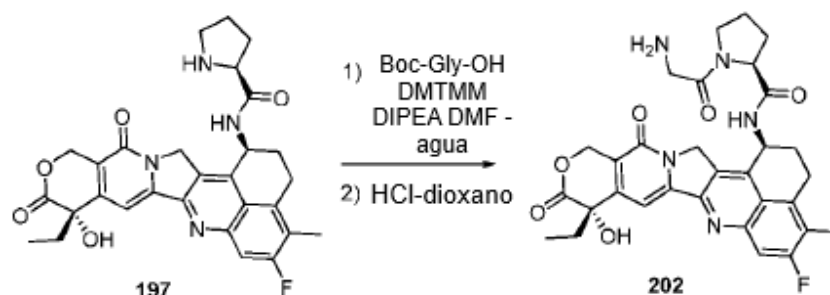
[00300] Compuestos 200 y 201. Se agregó morfolina (100 μ l) a la solución de intermedio 1 (45 mg, 0,0570 mmol) en DMF (2 ml) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN en TFA al 0,1 %). Los dos isómeros 200 (16 mg) y 201 (15

mg) se separaron perfectamente y se liofilizaron (rendimiento total del 95%).

[00301] Compuesto 200. MS calc. para $C_{29}H_{28}F_3N_4O_5$: 569,20, observado: 569,19 $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,73 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 6,53 (s, 1H), 5,58 (dt, J = 8,9, 4,5 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,29 (d, J = 19,1 Hz, 1H), 5,10 (d, J = 19,1 Hz, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,58 (s, 1H), 3,24 – 3,09 (m, 4H), 2,94 (m, 1H), 2,41 (d, J = 1,9 Hz, 3H), 2,29 – 2,19 (m, 2H), 1,87 (hept, J = 7,1 Hz, 2H), 0,88 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

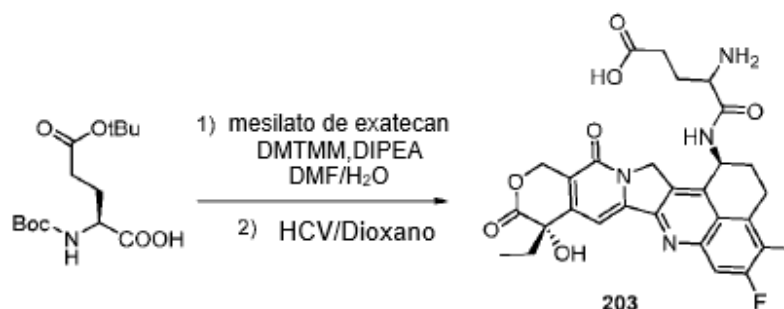
[00302] Compuesto 201. MS calc. para $C_{29}H_{28}F_3N_4O_5$: 569,20, observado: 569,44 $[M+H]^+$. RMN ^1H (401 MHz, DMSO- d_6) δ 9,38 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 7,34 (s, 1H), 6,57 (s, 1H), 5,68 (dt, J = 7,8, 3,5 Hz, 1H), 5,44 (s, 1H), 5,44 – 5,22 (m, 2H), 4,44 (m, 1H), 3,60 – 3,52 (m, 2H), 3,38 – 3,22 (m, 3H), 3,15 – 3,02 (m, 1H), 2,68 – 2,52 (m, 1H), 2,43 (d, J = 1,9 Hz, 3H), 2,25 (m, 1H), 2,20 – 2,06 (m, 1H), 1,95 – 1,83 (m, 2H), 0,87 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 90: Síntesis del Compuesto 202



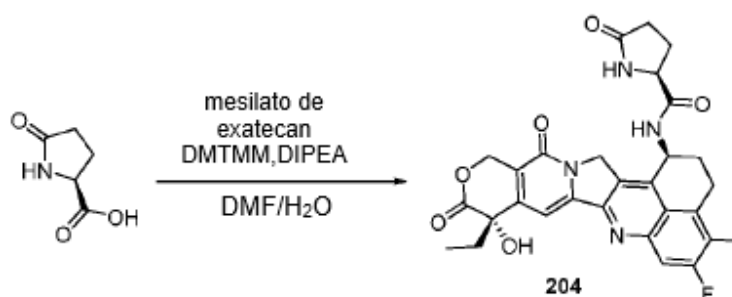
[00303] Compuesto 202. A una mezcla del compuesto 197 (1 equiv., 10 mg, 0,0188 mmol), Boc-Gly-OH (1,1 equiv., 4 mg, 0,0207 mmol) y DMTMM (1,1 equiv., 6 mg, 0,0207 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 2 ml) y diisopropiletilamina (10 μ l). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. Los disolventes se evaporaron y la mezcla de reacción cruda se redisolvió en 4 mL de HCl 2 M en dioxano, manteniéndose en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 80 % ACN/TFA al 0,1 %), dando 202 como un sólido amarillo después de la liofilización (10 mg, 90 %). MS calc. para $C_{31}H_{33}FN_5O_6$: 590,24, observado: 590,25, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, óxido de deuterio) δ 7,23 (t, J = 2,7 Hz, 1H), 7,15 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 5,41 (d, J = 16,0 Hz, 2H), 5,28 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 4,89 – 4,81 (m, 1H), 4,45 (dd, J = 8,1, 5,3 Hz, 1H), 4,41 (s, 1H), 4,16 – 4,06 (m, 1H), 3,97 (s, 2H), 3,73 (m, 1H), 3,70 – 3,66 (m, 1H), 3,66 – 3,56 (m, 2H), 3,11 – 3,04 (m, 1H), 2,87 (s, 1H), 2,34 (m, 2H), 2,14 – 2,02 (m, 6H), 1,87 – 1,83 (m, 2H), 0,85 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 91: Síntesis del compuesto 203



[00304] Compuesto 203. A la mezcla de mesilato de exatecan (1 equiv., 19 mg, 0,0354 mmol), Boc-Glu(OtBu)-OH (1,5 equiv., 16 mg, 0,0531 mmol) y DMTMM (1,5 equiv., 15 mg, 0,0531 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 2 ml) y diisopropiletilamina (10 µl). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, mientras que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido se redisolvió en 2 mL de dioxano. Se añadió HCl (4 M en dioxano, 2 mL) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez completada la reacción, como lo indica el análisis LC-MS, la mezcla de reacción en bruto se volvió a disolver en DMF y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa usando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 50% ACN/TFA al 0,1 %), dando 203 (12 mg, 62 %) como un polvo amarillento después de la liofilización. El producto final consiste en dos isómeros en equilibrio entre sí. MS calc. para $C_{29}H_{30}FN_4O_7$: 565,21, observado: 565,88 $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,01 (m, 1H), 8,26 (m, 2H), 7,84 (m, 1H), 7,34 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 5,62 (m, 1H), 5,44 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 5,43 – 5,26 (m, 2H), 5,06 (d, $J = 18,8$ Hz, 1H), 3,82 – 3,73 (m, 1H), 3,51 – 3,38 (m, 2H), 3,19 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H), 2,42 (d, $J = 2,0$ Hz, 3H), 2,35 (m, 1H), 2,31 (s, 1H), 2,21 – 2,08 (m, 1H), 1,91 (m, 4H), 0,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

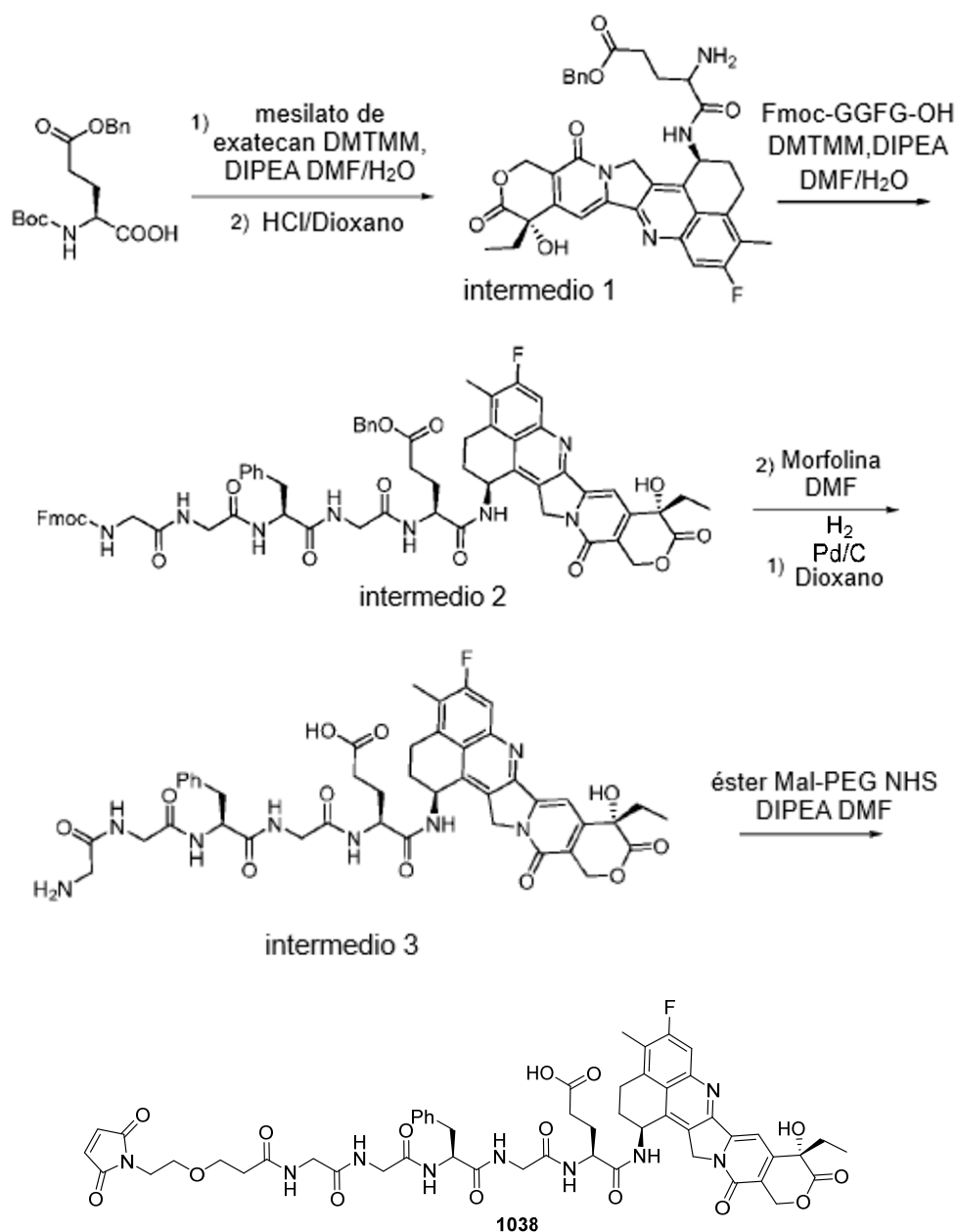
Ejemplo 92: Síntesis del Compuesto 204



[00305] Compuesto 204. A una mezcla de mesilato de exatecan (20 mg, 0,038 mmol), ácido L-pirolglutámico (7,3 mg, 0,056 mmol) y DMTMM (21 mg, 0,076 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 2,5 ml) y diisopropiletilamina (50 µl). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se

purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN en TFA al 0,1 %), obteniéndose 204 como un sólido amarillo tras la liofilización (18,5 mg, 89 %). MS calc. para $C_{29}H_{28}FN_4O_6$: 547,19, observado: 547,10, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,62 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,80 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 5,57 (dt, $J = 9,0, 4,8$ Hz, 1H), 5,43 (d, $J = 1,4$ Hz, 2H), 5,20 (q, $J = 18,8$ Hz, 2H), 4,08 (dd, $J = 8,4, 4,8$ Hz, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,19 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,41 (d, $J = 1,9$ Hz, 3H), 2,29 – 2,22 (m, 1H), 2,21 – 2,12 (m, 2H), 2,00 (m, 1H), 1,86 (h, $J = 7,0$ Hz, 2H), 0,88 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Ejemplo 93: Síntesis del compuesto 1038



[00306] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de exatecan (1 equiv., 40 mg, 0,0753 mmol), Boc-Glu(OBn)-OH (1,5 equiv., 38 mg, 0,113 mmol) y DMTMM (1,5 equiv., 31 mg, 0,113 mmol) se agregaron DMF/agua (3:1, 4 ml) y diisopropiletilamina (25 μ l) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. Se
 5 removió el solvente a presión reducida y el sólido se redisolvió en 3 mL de dioxano. Se agregó HCl (4M en dioxano, 3 mL) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de que se completó la reacción, tal como lo indica un análisis LC-MS, se redisolvió la mezcla de reacción en DMF y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que da el intermedio 1 deseado (43 mg, 87 %) como un polvo amarillento después
 10 de la liofilización. MS calc. para $C_{36}H_{36}FN_4O_7$: 655,26, observado: 655,33 $[M+H]^+$.

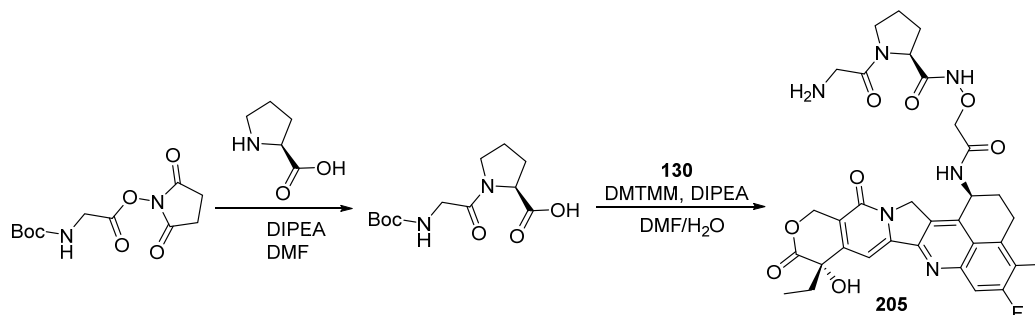
[00307] Intermedio 2. Una solución de intermedio 1 (40 mg, 0,0611 mmol), Fmoc-GGFGG-OH (1,1 equiv., 41 mg, 0,0673 mmol), DMTMM (1,1 equiv., 19 mg, 0,0673 mmol) y diisopropiletilamina (25 μ l) en DMF/agua (3:1, 4 ml) se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de que se completó la
 15 reacción, tal como lo indica un análisis LC-MS, se purificó la mezcla de reacción mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que da el intermedio 2 deseado (52 mg, 71 %) como un polvo amarillo después de la liofilización. Cálculo MS para $C_{66}H_{64}FN_8O_{13}$: 1195,46, encontrado: 1195,77 $[M+H]^+$.

[00308] Intermedio 3. El intermedio 2 previamente preparado (52 mg, 0,0435 mmol) se disolvió en dioxano (10 mL) y se suspendió Pd/C (10 %, 10 mg) en la solución. Se burbujeó hidrógeno en la mezcla
 20 de reacción durante 3 horas, mientras el análisis LC-MS indicaba la desprotección completa del benzoilo. La mezcla se filtró a través de un filtro de jeringa (0,2 μ m) y el dioxano se evaporó a presión reducida. El producto de reacción crudo se redisolvió en DMF (2 mL) y, después de eso, se agregó morfolina (100 μ l), la mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Después de que se completó la reacción, tal como lo indica un análisis LC-MS, se purificó la mezcla de reacción mediante cromatografía
 25 ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que da el intermedio 3 deseado (17 mg, 44 %) como un polvo amarillento después de la liofilización. MS calc. para $C_{44}H_{48}FN_8O_{11}$: 883,34, observado: 883,01 $[M+H]^+$.

[00309] Compuesto 1038. Una solución del intermedio 2 previamente preparado (17 mg, 0,0193 mmol), éster NHS de Mal-PEG (1,2 equiv., 7 mg, 0,0217 mmol) y diisopropiletilamina (2 μ l) en DMF (2
 30 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, mientras el análisis por LC-MS indicaba el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificada con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/TFA al 0,1 %). El compuesto 1038 se recuperó como un polvo blanco después de la liofilización (11 mg, 53 %). MS calc. para $C_{53}H_{57}FN_9O_{15}$: 1078,40, observado: 1078,67 $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz,

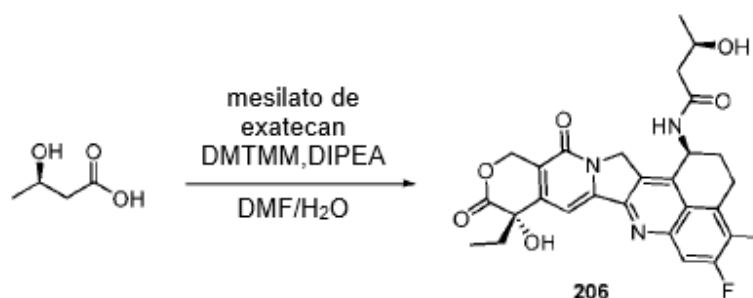
DMSO- d_6) δ : 8,63 (d, J = 12,7 Hz, 1H), 8,47 (m, 1H), 8,10 (m, 3H), 8,03 (m, 2H), 7,90 (m, 1H), 7,82 – 7,72 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,14 – 7,06 (m, 4H), 7,01 (s, 2H), 6,50 (m, 2H), 5,75 (m, 2H), 5,55 (m, 1H), 5,47 – 5,30 (m, 3H), 5,11 – 4,93 (m, 2H), 4,52 – 4,22 (m, 1H), 4,20 (s, 1H), 3,83 – 3,59 (m, 4H), 3,56 (m, 3H), 3,23 (m, 2H), 3,15 (tt, J = 11,7, 4,3 Hz, 2H), 3,10 – 2,92 (m, 3H), 2,90 – 2,57 (m, 2H), 2,42 – 2,38 (m, 4H), 2,06 (m, 1H), 1,94 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,22 – 1,06 (m, 1H), 0,92 (m, 3H).

Ejemplo 94: Síntesis del compuesto 205

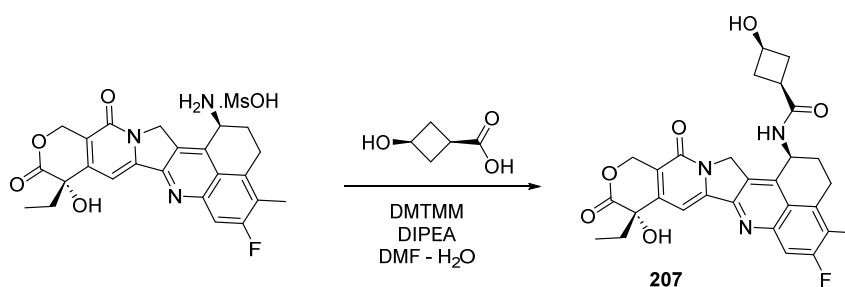


[00310] N-Boc-GlyProOH. A la solución de éster NHS *N*-Boc-Gly (277 mg, 1,02 mmol) y *L*-Pro (117 mg, 1,02 mmol) en DMF (3 ml) se añadió DIPEA (300 μ l) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN), dando *N*-Boc-GlyProOH como un sólido blanco después de la liofilización (270 mg, 97 %). Cálculo MS para $C_{12}H_{21}N_2O_5$: 273,14, encontrado: 273,20, $[M+H]^+$.

[00311] Compuesto 205. A la mezcla de 130.HCl (15 mg, 0,028 mmol), *N*-Boc-GlyProOH (22 mg, 0,081 mmol) y DMTMM (25 mg, 0,089 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 2,5 ml) y DIPEA (30 μ l). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN, TFA al 0,1 %) y las fracciones que contenían el producto se evaporaron. El residuo se disolvió en dioxano (1 ml) y se añadió HCl en dioxano (4 M; 2 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego, el producto se aisló mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100% ACN, TFA al 0,1 %), dando 205 como un sólido amarillo después de la liofilización (7,0 mg, 38 %). MS calc. para $C_{33}H_{36}FN_6O_8$: 663,25, observado: 663,25, $[M+H]^+$. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11,61 (s, 1H), 8,83 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 8,04 (m, 2H), 7,81 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 6,54 (s, 1H), 5,62 (m, 1H), 5,44 (m, 2H), 5,37 – 5,19 (m, 2H), 4,45 – 4,30 (m, 2H), 4,13 (dd, J = 8,7, 3,7 Hz, 1H), 3,36 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,19 (d, J = 6,3 Hz, 3H), 2,53 – 2,52 (m, 2H), 2,41 (d, J = 1,8 Hz, 2H), 2,28 – 2,17 (m, 2H), 2,01 – 1,92 (m, 1H), 1,87 (m, 2H), 1,72 (dd, J = 10,8, 5,4 Hz, 2H), 1,58 (m, 1H), 0,88 (td, J = 7,4, 3,8 Hz, 3H).

Ejemplo 95: Síntesis del compuesto 206

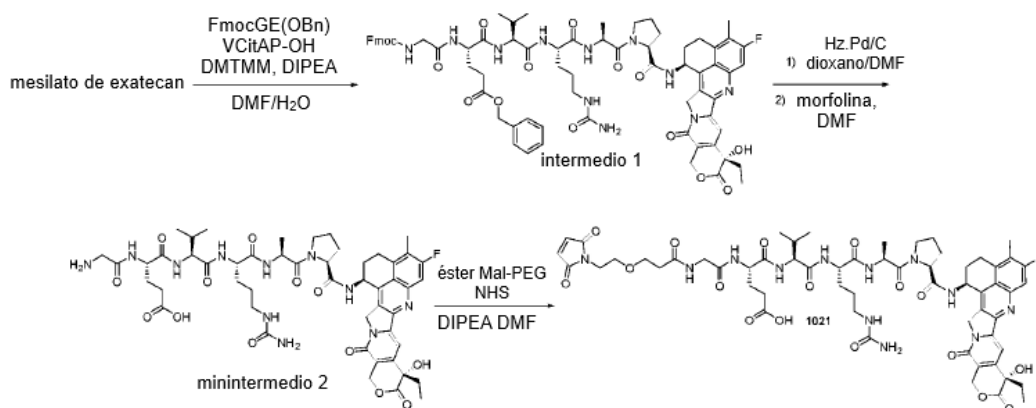
[00312] A una mezcla de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 15 mg, 0,028 mmol), ácido (*R*)-3-hidroxi-butanoico (1,1 equiv., 3,2 mg, 0,030 mmol) y DMTMM (1,1 equiv., 8,5 mg, 0,030 mmol) se añadió DMF/agua (5:1, 1,2 ml) y diisopropiletilamina (2,1 equiv., 10 µl, 0,059 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, ya que el análisis LC-MS indicó el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O), dando 206 como un sólido blanco después de la liofilización (10 mg, 69 %). MS calc. para C₂₈H₂₉FN₃O₆: 522,20, observado: 522,20, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,41 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,54 (dt, *J* = 9,3, 5,0 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,28 – 5,10 (m, 2H), 4,66 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H), 4,03 (dddd, *J* = 14,8, 7,3, 5,5, 4,4 Hz, 1H), 3,23 – 3,09 (m, 2H), 2,39 (d, *J* = 1,9 Hz, 3H), 2,30 (dd, *J* = 14,0, 7,5 Hz, 1H), 2,21 (dd, *J* = 13,9, 5,7 Hz, 1H), 2,17 – 2,05 (m, 2H), 1,93 – 1,79 (m, 2H), 1,09 (d, *J* = 6,1 Hz, 3H), 0,87 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 96: Síntesis del Compuesto 207

[00313] A una mezcla de DMF/agua 4:1 (4 mL) se añadieron mesilato de exatecan (20 mg, 0,038 mmol), ácido *cis*-3-hidroxiciclobutano-1-carboxílico (1,25 equiv., 6 mg, 0,048 mmol), DMTMM (2,0 equiv., 21 mg, 0,076 mmol) y diisopropiletilamina (20 µL). La solución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras LC-MS indicaba el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía HPLC de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/H₂O). El producto deseado 207 se obtuvo como un polvo blanco después de la liofilización (16 mg, 79 %). MS calc. para C₂₉H₂₉FN₃O₆: 534,20,

observado: 534,45, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,41 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,77 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,49 (s, 1H), 5,60 – 5,51 (m, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,11 (m, 2H),), 5,07 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H), 4,37 (m, 1H), 3,63 – 3,55 (m, 2H), 3,21 – 3,10 (m, 2H), 2,38 (d, $J = 1,8$ Hz, 3H), 2,29 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 2,19 – 2,01 (m, 4H), 1,88 (m, 2H), 0,88 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

5 **Ejemplo 97: Síntesis del Compuesto 1021**



[00314] Intermedio 1. Se agregó la mezcla de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 50 mg, 0,094 mmol), FmocGE(OBn)VCitAP-OH (1,25 equiv., 111 mg, 0,118 mmol) y DMTMM (1,25 equiv., 33 mg, 0,118 mmol) se le añadió DMF/agua (5:1, 3,0 ml) y diisopropiletilamina (2,25 equiv., 37 μ l, 0,212 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 75 % ACN/H₂O), lo que ofrece el intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (126 mg, 98 %). Cálculo MS para C₇₂H₈₁FN₁₁O₁₅: 1358,59, encontrado: 1358,60, $[M+H]^+$.

[00315] Intermedio 2. Se agregó Pd/C al 10 % (15 mg) a la solución de intermedio 1 (1,0 equiv., 126 mg, 0,092 mmol) en la mezcla de DMF (1,0 ml) y dioxano (1,5 ml), y la mezcla de reacción se hidrogenó (globo) durante 3 horas a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se filtró a través de la capa de celite y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. Luego, se agregó morfina (175 μ l) a la solución obtenida y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 60 % ACN/H₂O) ofreció el producto de intermedio 2 como un sólido blanco después de la liofilización (58 mg, 60 %). Cálculo MS para C₅₀H₆₅FN₁₁O₁₃: 1046,47, encontrado: 1046,50, $[M+H]^+$.

[00316] Compuesto 1021. Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,055 mmol, 17 mg) y DIPEA (1,05 equiv., 0,058 mmol, 10 μ L) a la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 58 mg, 0,055 mmol) en DMF anhidra (1,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, mientras LC-MS

indicó el consumo total del material de partida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 70 % ACN/TFA al 0,1 %) ofreció el producto deseado como un sólido amarillo pálido después de la liofilización (38 mg, 56 %). MS calc. para $C_{59}H_{74}FN_{12}O_{17}$: 1241,53, observado: 1241,50, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 8,45 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 8,12 – 7,87 (m, 5H), 7,86 – 7,70 (m, 2H), 7,30 (s, 1H), 7,00 (s, 2H), 5,94 (s, 1H), 5,55 – 5,46 (m, 1H), 5,46 – 5,35 (m, 2H), 5,33 – 5,07 (m, 2H), 4,55 – 4,08 (m, 6H), 3,77 – 3,59 (m, 3H), 3,59 – 3,51 (m, 6H), 3,47 (t, $J = 4,9$ Hz, 2H), 3,22 – 3,12 (m, 2H), 2,99 – 2,88 (m, 2H), 2,39 (s, 4H), 2,35 – 2,28 (m, 2H), 2,28 – 2,16 (m, 2H), 2,16 – 2,04 (m, 2H), 2,05 – 1,93 (m, 1H), 1,93 – 1,78 (m, 6H), 1,79 – 1,66 (m, 1H), 1,67 – 1,52 (m, 1H), 1,47 – 1,26 (m, 3H), 1,10 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 0,94 – 0,74 (m, 9H).

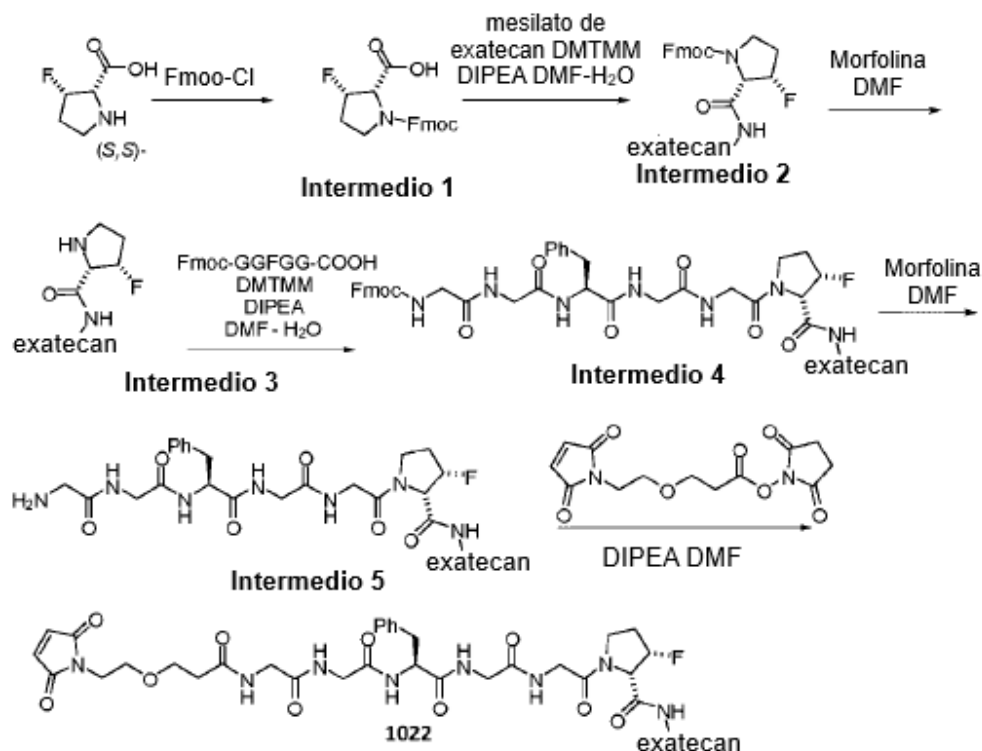
Ejemplo 98: Síntesis del Compuesto 3024

[00317] El Compuesto 3024 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 24 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1021 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 6,3 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1241 Da.

Ejemplo 99: Síntesis del Compuesto 3048

[00318] El Compuesto 3048 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 24 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1021 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-TROP2 con base en RPLC-MS fue de 7,2 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1241 Da.

Ejemplo 100: Síntesis del Compuesto 1022



[00319] Intermedio 1. El ácido (S,S)-3-fluoropirrolidin-2-carboxílico (62,5 mg, 0,47 mmol) se disolvió en 1,4-dioxano (1 mL) y H₂O (3 mL) y se enfrió a 0 °C. Se añadió K₂CO₃ (162 mg, 1,18 mmol) y luego se añadió Fmoc-Cl (115mg, 0,45 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se agregó H₂O (10 mL). La mezcla se acidificó con HCl acuoso (1 M) a pH 2-3 y se extrajo con DCM (2 × 10 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ y se concentraron a sequedad para obtener el producto como un sólido blanco (122 mg, rendimiento del 76%). Cálculo MS para C₂₀H₁₉FNO₄: 356,12, encontrado: 356,22, [M+H]⁺.

[00320] Intermedio 2. El mesilato de exatecan (30 mg, 0,056 mmol), el intermedio 1 previamente preparado (5 equiv., 100 mg) y DIPEA (200 µL) se disolvieron en una mezcla 5:1 de DMF y agua (3 mL). Se agregó DMTMM (5 equiv., 78 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se hizo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 70 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (35 mg, 81 %). MS calc. para C₄₄H₃₉F₂N₄O₈: 789,27, encontrado: 789,43, [M+H]⁺.

[00321] Intermedio 3. Se disolvió el intermedio 2 previamente preparado (35 mg, 0,044 mmol) en DMF (2 mL) y se agregó morfolina (100 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se hizo mediante cromatografía HPLC de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 50 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (19 mg, 76

%). MS calc. para $C_{29}H_{29}F_2N_4O_6^-$: 567,20, encontrado: 567,57, $[M+H]^+$.

[00322] Intermedio 4. El intermedio 3 previamente preparado (19 mg, 0,035 mmol), Fmoc-GGFGG-COOH (2 equiv., 47 mg) y DIPEA (150 μ L) se disolvieron en una mezcla 5:1 de DMF y agua (3 mL). Se agregó DMTMM (2 equiv., 19,4 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se realizó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/ H_2O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (32 mg, 80 %). MS calc. para $C_{61}H_{60}F_2N_9O_{12}^+$: 1149,43, encontrado: 1149,25, $[M+H]^+$.

[00323] Intermedio 5. Se disolvió el intermedio 4 previamente preparado (70 mg, 0,061 mmol) en DMF (2 mL) y se agregó morfolina (100 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/ H_2O). $\rightarrow$ Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (21 mg, 38 %). MS calc. para $C_{46}H_{50}F_2N_9O_{10}^+$: 926,36, encontrado: 926,78, $[M+H]^+$.

[00324] Compuesto 1022. Se disolvió el intermedio 5 previamente preparado (21 mg, 0,023 mmol) en 1,5 mL de DMF anhidra. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,1 equiv., 9,6 mg) y DIPEA (10 μ L) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/ H_2O). $\rightarrow$ Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (10 mg, 39 %). MS calc. para $C_{54}H_{59}FN_9O_{14}$: 1122,42, observado: 1122,45, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,50 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 8,29 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 8,13 – 8,07 (m, 2H), 7,97 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 7,84 – 7,76 (m, 2H), 7,34 (s, 1H), 7,24 (m, 5H), 7,17 (m, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,52 (d, J = 4,1 Hz, 1H), 5,55 (dt, J = 8,5, 4,2 Hz, 1H), 5,51 – 5,39 (m, 2H), 5,38 – 5,32 (m, 1H), 5,26 – 5,23 (m, 2H), 4,57 – 4,45 (m, 2H), 4,07 (m, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,75 (m, 3H), 3,67 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 3,61 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 3,55 (m, 4H), 3,46 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 3,21 – 3,14 (m, 1H), 3,04 (m, 2H), 2,79 (m, 1H), 2,45 – 2,40 (m, 4H), 2,33 (t, J = 6,6 Hz, 3H), 2,21 (m, 1H), 2,15 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 2,11 – 2,04 (m, 1H), 1,87 (m, 2H), 0,89 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

Ejemplo 101: Síntesis del Compuesto 3021

[00325] El Compuesto 3021 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 24 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1022 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 6,9 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1121 Da.

Ejemplo 102: Síntesis del Compuesto 3045

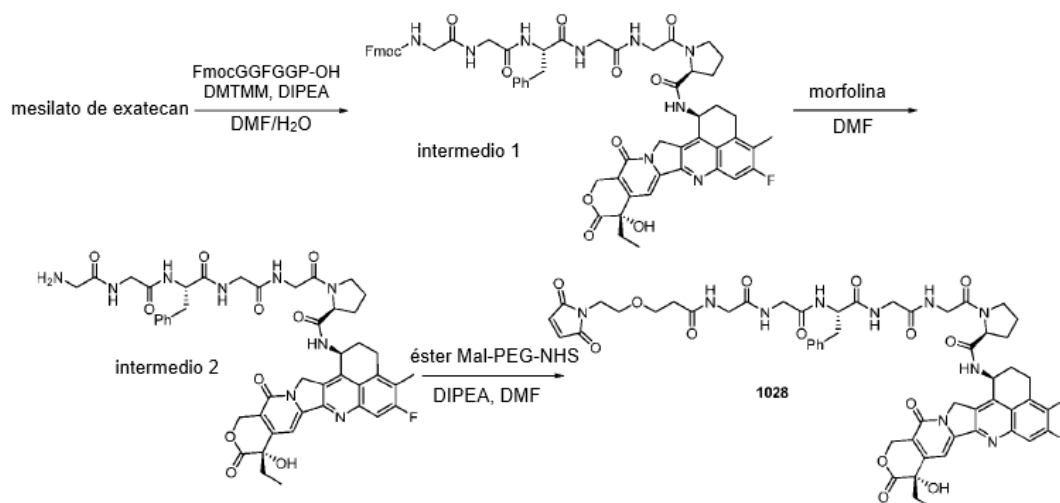
[00326] El Compuesto 3045 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos

generales en el Ejemplo 1 con 24 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1022 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti- TROP2 con base en RPLC-MS fue de 4,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1121 Da.

5 **Ejemplo 103: Síntesis del compuesto 3066**

[00327] El Compuesto 3066 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 24 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1022 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **1**. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti- TROP2 con base en RPLC-MS fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1121 Da.

10 **Ejemplo 104: Síntesis del Compuesto 1028**



[00328] Intermedio 1. Se agregó la mezcla de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 30 mg, 0,056 mmol), FmocGGFGGP-OH (1,5 equiv., 60 mg, 0,084 mmol) y DMTMM (1,5 equiv., 24 mg, 0,084 mmol) se le añadió DMF/agua (5:1, 2,4 ml) y diisopropiletilamina (2,5 equiv., 25 µl, 0,141 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, mientras el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 75 % ACN/H₂O), lo que ofrece el intermedio 1 como un sólido blanco después de la liofilización (68 mg, 98 %). MS calc. para C₆₁H₆₁FN₉O₁₂: 1130,44, observado: 1130,40, [M+H]⁺.

[00329] Intermedio 2. Se agregó morfolina (140 µL) a la solución de intermedio 1 (1,0 equiv., 62 mg, 0,055 mmol) en DMF anhidra (2,0 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente

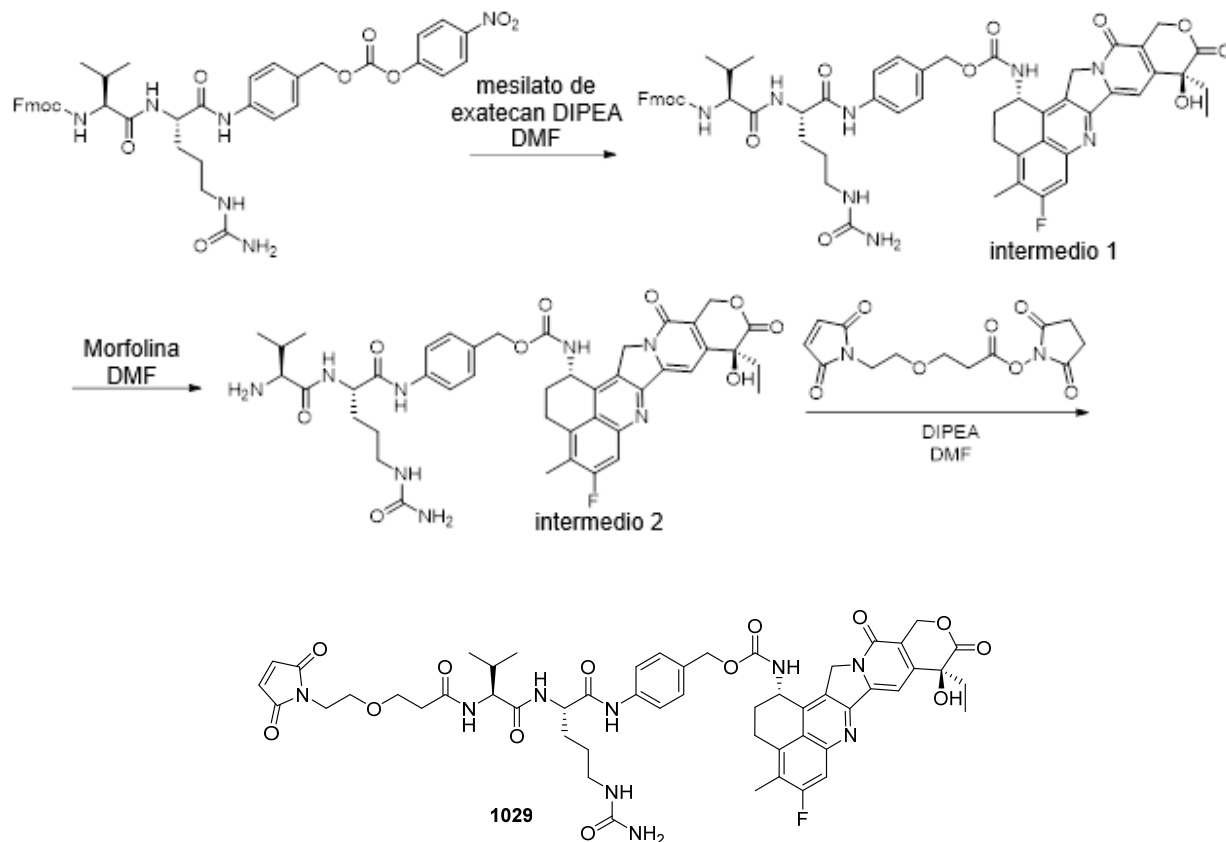
mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (45 mg, 90 %). MS calc. para C₄₆H₅₁FN₉O₁₀: 908,37, observada: 908,40, [M+H]⁺.

[00330] Compuesto 1028. Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,05 mmol, 15,5 mg) y
 5 DIPEA (1,5 equiv., 0,075 mmol, 13 µL) a la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 45 mg, 0,05 mmol) en DMF anhidra (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h hasta que LC-MS indicó el consumo total del material de partida. Se removió la DMF y se concentró el residuo de la mezcla con ACN y TFA ac. al 0,1 %. La purificación mediante HPLC ultrarrápida de fase inversa con una
 10 columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/H₂O) ofreció el producto deseado como un sólido blanco después de la liofilización (20 mg, 37 %). MS calc. para C₅₅H₆₀FN₁₀O₁₄: 1103,43, observado: 1103,45, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,51 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 8,29 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,18 – 8,03 (m, 2H), 7,98 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,91 – 7,67 (m, 3H), 7,33 – 7,28 (m, 1H), 7,24 (d, *J* = 4,3 Hz, 5H), 7,21 – 7,10 (m, 2H), 6,99 (s, 2H), 6,57 – 6,47 (m, 1H), 5,56 – 5,46 (m, 1H), 5,46 – 5,37 (m, 2H), 5,28 – 5,00 (m, 2H), 4,59 – 4,44 (m, 1H), 4,37 – 4,26 (m, 1H), 4,00 (dd, *J* = 17,1, 5,7 Hz, 1H),
 15 3,84 (dd, *J* = 17,1, 4,9 Hz, 1H), 3,79 – 3,64 (m, 5H), 3,65 – 3,49 (m, 6H), 3,45 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,26 – 2,99 (m, 2H), 2,86 – 2,74 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,32 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,26 – 1,98 (m, 3H), 1,97 – 1,77 (m, 3H), 0,87 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 105: Síntesis del Compuesto 3019

[00331] El Compuesto 3019 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos
 20 generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1028 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti- HER2 con base en RPLC-MS fue de 6,9 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1103 Da.

Ejemplo 106: Síntesis del Compuesto 1029



- 5 **[00332] Intermedio 1.** Mesilato de exatecan (50 mg, 0,0941 mmol), Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (50 mg, 0,0652 mmol, 0,7 equiv.) y diisopropiletilamina (50 L) se disolvieron en 1,3 mL de DMF anhidro. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, para luego cargarse directamente en columna y purificarse por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 75% ACN/H₂O), dando el producto como un sólido blanco después de la liofilización a partir de agua-acetonitrilo (47 mg, 69 %). MS calc. para C₅₈H₆₀FN₈O₁₁: 1063,44, observado: 1063,40, [M+H]⁺.

- 10 **[00333] Intermedio 2.** Se agregó morfolina (100 µL) a la solución de intermedio 1 previamente preparado (53 mg, 0,0443 mmol) en DMF anhidra (1 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante HPLC de fase inversa (HPLC semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (20,5 mg, 55 %). MS calc. para C₄₃H₅₀FN₈O₉: 841,37, observado: 841,30, [M+H]⁺.

- 15 **[00334] Compuesto 1029.** Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,0 equiv., 0,0244 mmol, 7,6 mg) y DIPEA (2 equiv., 0,0488 mmol, 6,4 mg, 8,7 µL) a una solución del intermedio 2 previamente preparado (20 mg, 0,0244 mmol) en DMF anhidro (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente

durante 40 minutos, mientras LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La purificación mediante HPLC ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/H₂O) ofreció el producto deseado como un sólido blanco después de la liofilización (8 mg, 32 %). MS calc. para C₅₂H₅₉FN₉O₁₃: 1036,42, observado: 1036,60, [M + H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,99 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 8,10 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,06 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,84 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,56 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,32 (s, 1H), 7,29 – 7,23 (m, 2H), 7,02 (s, 2H), 6,67 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,98 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 5,45 (s, 2H), 5,44 – 5,40 (m, 3H), 5,29 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 5,08 (s, 2H), 4,38 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H), 4,21 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,57 (m, 3H), 3,48 (m, 2H), 3,02 (m, 1H), 2,95 (m, 1H), 2,81 (s, 2H), 2,60 (s, 1H), 2,43 (m, 1H), 2,39 – 2,32 (m, 3H), 2,19 (m, 2H), 1,97 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,76 (s, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,60 (m, 1H), 1,49 – 1,35 (m, 1H), 1,17 – 1,06 (m, 1H), 0,91 – 0,79 (m, 3H).

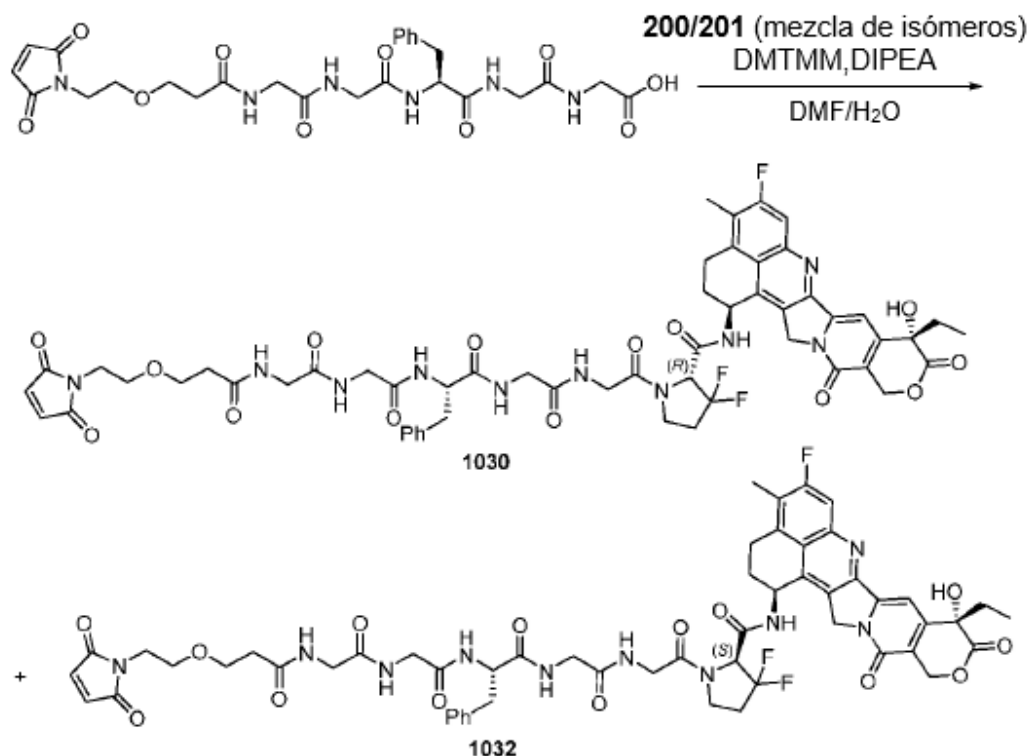
Ejemplo 107: Síntesis del compuesto 3025

[00335] El Compuesto 3025 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1029 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC fue de 7 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1036 Da.

Ejemplo 108: Síntesis del Compuesto 3069

[00336] El Compuesto 3069 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 20 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1029 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR con base en RPLC-MS fue de 7 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1036 Da.

Ejemplo 109: Síntesis de los compuestos 1030 y 1032



[00337] Compuestos 1030 y 1032. A una solución de Mal-PEG-GGFGG-OH (1,2 equiv., 37 mg, 0,0633 mmol), los compuestos 200 y 201 (mezcla no resuelta de isómeros _L y _D, 1,0 equiv., 30 mg, 0,0528 mmol) y DMTMM (1,2 equiv., 18 mg, 0,0633 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 2,0 ml) y diisopropiletilamina (1 equiv., 9,3 µl, 0,0528 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificada con diol, 0 → 100 % ACN/TFA al 0,1 %). Los dos isómeros _L y _D 1030 y 1032 se separaron y se volvieron a purificar individualmente mediante una segunda cromatografía ultrarrápida utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/TFA 0,1 %). Los dos isómeros se obtuvieron como sólidos amarillentos después de la liofilización (16 y 15 mg, rendimiento total del 52%).

[00338] Compuesto 1030. MS calc. para C₅₅H₅₈F₃N₁₀O₁₄: 1139,41, observado: 1139,30, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,02 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,36 – 8,28 (m, 1H), 8,11 (m, 4H), 7,99 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 7,92 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,83 (m, 1H), 7,34 (d, *J* = 17,8 Hz, 1H), 7,27 – 7,18 (m, 2H), 7,00 (s, 2H), 5,64 – 5,48 (m, 2H), 5,43 (s, 2H), 5,39 – 5,30 (m, 2H), 4,99 (d, *J* = 19,1 Hz, 1H), 4,59 – 4,45 (m, 4H), 4,07 (m, 2H), 3,86 – 3,72 (m, 5H), 3,65 – 3,53 (m, 2H), 3,47 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,24 – 3,01 (m, 2H), 2,80

(m, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,34 (m, 3H), 2,20 (m, 1H), 2,08 (m, 1H), 1,86 (m, 3H), 1,24 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H), 0,89 (q, $J = 6,9$ Hz, 3H).

[00339] Compuesto 1032. MS calc. para $C_{55}H_{58}F_3N_{10}O_{14}$: 1139,41, observado: 1139,67, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,09 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,27 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 8,09 (t, $J = 7,8$ Hz, 3H), 7,96 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 7,84 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 7,77 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,24 (m, 5H), 7,18 (m, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,54 (s, 2H), 5,56 (m, 1H), 5,49 – 5,39 (m, 2H), 5,26 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 4,59 – 4,49 (m, 3H), 4,11 (m, 1H), 4,05 – 3,91 (m, 2H), 3,80 – 3,67 (m, 4H), 3,61 – 3,54 (m, 4H), 3,46 (m, 2H), 3,14 – 3,03 (m, 1H), 2,79 (m, 2H), 2,66 – 2,56 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,33 (m, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,95 – 1,82 (m, 3H), 1,24 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H), 0,89 (q, $J = 7,4$ Hz, 3H).

Ejemplo 110: Síntesis del Compuesto 3022

[00340] El Compuesto 3022 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 23 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1030 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1139 Da.

Ejemplo 111: Síntesis del compuesto 3046

[00341] El Compuesto 3046 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 23 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1030 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti- TROP2 con base en RPLC fue de 6,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1139 Da.

Ejemplo 112: Síntesis del Compuesto 3067

[00342] El Compuesto 3067 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 31 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1030 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR con base en RPLC fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1139 Da.

Ejemplo 113: Síntesis del compuesto 3023

[00343] El Compuesto 3023 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 27 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1032 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1139 Da.

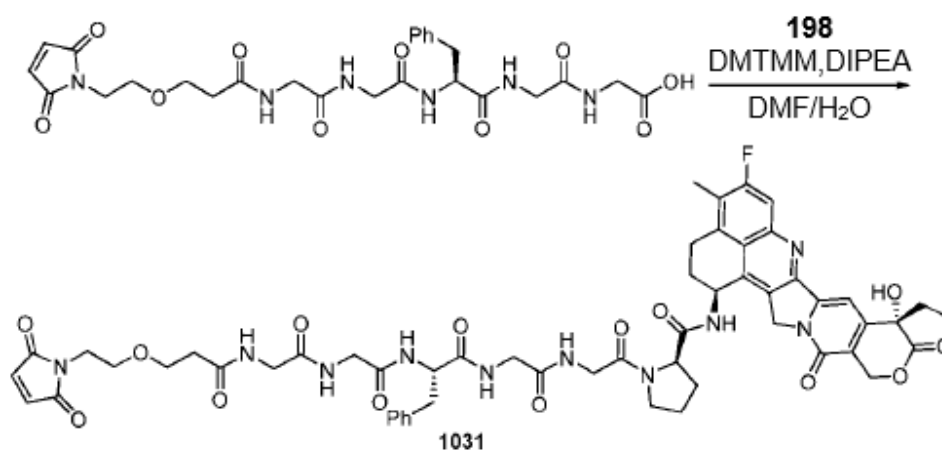
Ejemplo 114: Síntesis del Compuesto 3047

[00344] El Compuesto 3047 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 27 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1032 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-TROP2 con base en RPLC fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1139 Da.

Ejemplo 115: Síntesis del Compuesto 3068

[00345] El Compuesto 3068 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 27 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1032 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR con base en RPLC fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1139 Da.

Ejemplo 116: Síntesis del Compuesto 1031



[00346] Compuesto 1031. A la solución de Mal-PEG-GGFGG-OH (1,0 equiv., 22 mg, 0,037 mmol), Sc-598 (1,0 equiv., 20 mg, 0,037 mmol) y DMTMM (1,1 equiv., 12 mg, 0,041 mmol) se le añadió DMF/agua (5:1, 2,0 ml) y diisopropiletilamina (1,1 equiv., 7,2 µl, 0,041 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 50 minutos, ya que el análisis LC-MS indicó el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase reversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificada con diol, 0 → 70 % ACN/H₂O), ofreciendo 1031 como un sólido blanco después de la liofilización (29 mg, 71 %). MS calc. para C₅₅H₆₀FN₁₀O₁₄: 1103,43, observado: 1103,30, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,53 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 8,26 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,15 – 8,02 (m, 2H), 7,96 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,67 (t, *J* = 5,1 Hz, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,27 – 7,20 (m, 4H), 7,20 – 7,13 (m, 1H), 6,99 (s, 2H), 6,52 (s, 1H), 5,60 – 5,36 (m, 4H), 5,14 (d, *J* = 19,2 Hz, 1H), 4,58 – 4,46 (m, 1H), 4,26 (dd, *J* = 8,1, 4,2 Hz, 1H), 4,04 (dd, *J* = 17,0, 5,7 Hz, 1H), 3,87 (dd, *J* = 17,1, 4,4 Hz, 1H), 3,78 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 3,73 (dd, *J* = 16,9, 5,8 Hz, 1H), 3,66 (d, *J* =

5,7 Hz, 2H), 3,60 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), 3,58 – 3,49 (m, 6H), 3,45 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,22 – 3,06 (m, 2H), 3,03 (dd, $J = 13,8, 4,5$ Hz, 1H), 2,77 (dd, $J = 13,8, 9,7$ Hz, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,32 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,18 – 2,01 (m, 4H), 1,99 – 1,79 (m, 4H), 0,89 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Ejemplo 117: Síntesis del compuesto 3020

5 **[00347]** El Compuesto 3020 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 31 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1031 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1103 Da.

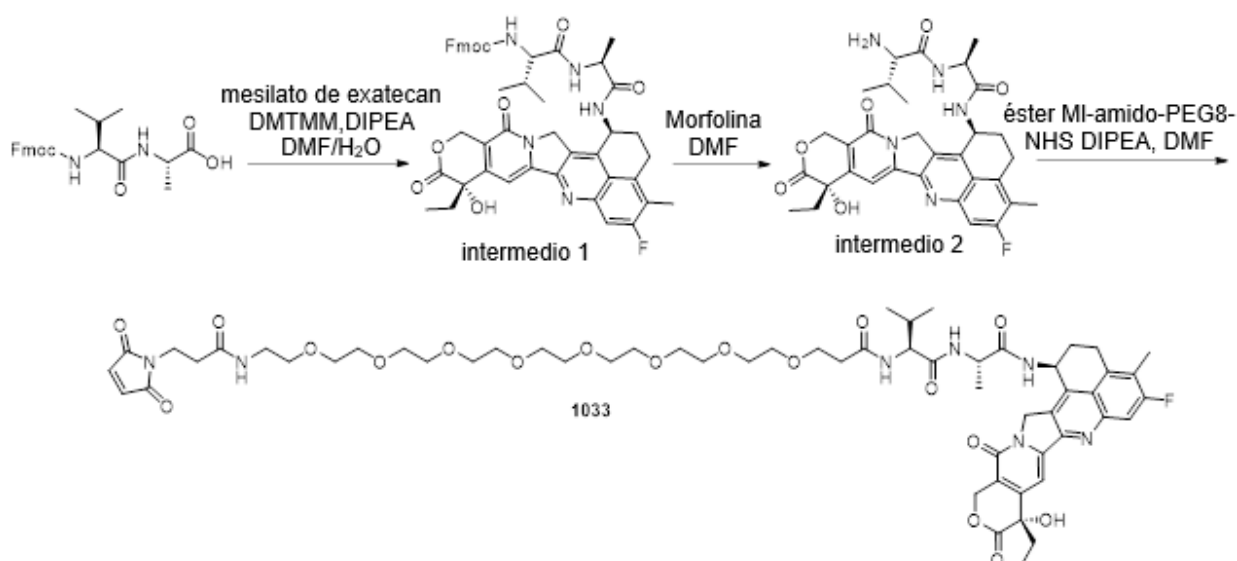
10 **Ejemplo 118: Síntesis del Compuesto 3044**

[00348] El Compuesto 3044 se preparó de acuerdo con el Procedimiento B de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 31 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1031 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TROP2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-TROP2 con base en RPLC fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1103 Da.

15 **Ejemplo 119: Síntesis del compuesto 3065**

[00349] El Compuesto 3065 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 31 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1031 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR con base en RPLC fue de 7,4 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1103 Da.

20 **Ejemplo 120: Síntesis del Compuesto 1033**



[00350] Intermedio 1. A la mezcla de mesilato de exatecan (1,0 equiv., 25 mg, 0,0470 mmol), Fmoc-Val-Ala-OH (1,2 equiv., 23 mg, 0,0564 mmol) y DMTMM (1,2 equiv., 16 mg, 0,0564 mmol) se le añadió DMF/agua (4:1, 1,8 ml) y diisopropiletilamina (25 µl). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida.

5 La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (25 g de C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/0,1 % ac.), lo que ofrece el intermedio 1 como un sólido amarillo después de la liofilización (37 mg, 95 %). MS calc. para $C_{47}H_{47}FN_5O_8$: 828,34, observado: 828,45, $[M+H]^+$.

[00351] Intermedio 2. El intermedio 1 previamente preparado (37 mg, 0,0447 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF y se añadió morfolina (100 µL). La mezcla de reacción se agitó durante una hora a temperatura ambiente y la mezcla de reacción en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 70 % ACN/TFA al 0,1 %). El producto se obtuvo como un sólido amarillo después de la liofilización (25 mg, 92%). MS calc. para $C_{32}H_{37}FN_5O_6$: 606,27, observado: 606,24, $[M+H]^+$.

15 **[00352] Compuesto 1033.** El intermedio 2 previamente preparado (1,05 equiv., 15 mg, 0,0248 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF y se añadieron éster MI-amido-PEG8-NHS (1 equiv., 0,0236 mmol, 16 mg) y diisopropiletilamina (1,1 equiv., 0,0260 mmol, 4,54 µL), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 70 % ACN/H₂O). El producto

20 1033 se obtuvo como un sólido blanco después de la liofilización (4,2 mg, 85%). MS calc. para $C_{58}H_{79}FN_7O_{18}$: 1180,55, found: 1180,10, $[M+H]^+$. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,40 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 8,09 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 8,00 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,79 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,99 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,53 (dt, *J* = 9,2, 4,9 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,23 (d, *J* = 18,7 Hz, 1H), 5,11 (d, *J* = 18,9 Hz, 1H), 4,27 (p, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,12 (dd, *J* = 8,6, 6,6 Hz, 1H), 3,58 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,56 – 3,41 (m, 32H), 3,36 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,23 – 3,10 (m, 4H), 2,47 – 2,38 (m, 4H), 2,32 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,19 – 2,05 (m, 2H), 1,96 – 1,79 (m, 2H), 1,27 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H), 0,87 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 0,79 (dd, *J* = 6,9, 3,6 Hz, 6H).

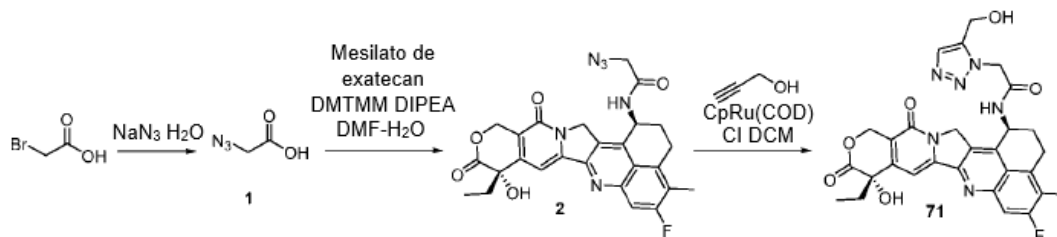
Ejemplo 121: Síntesis del compuesto 3026

[00353] El Compuesto 3026 se preparó de acuerdo con el Procedimiento A de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1033 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-HER2. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-HER2 con base en RPLC-MS fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1180 Da.

Ejemplo 122: Síntesis del Compuesto 3070

[00354] El Compuesto 3070 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1033 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La relación de fármaco a anticuerpo (DAR) para el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-EGFR con base en RPLC fue de 7,5 con base en un peso molecular de enlazador-fármaco de 1180 Da.

Ejemplo 123: Síntesis del compuesto 71

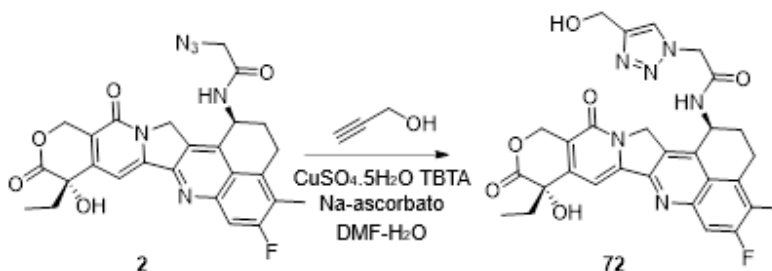


[00355] Intermedio 1. Se disolvió ácido bromoacético (0,715 g, 10 mmol) en 5 mL de agua, luego se añadió azida sódica (0,696 g, 5 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se acidificó con HCl hasta pH = 1, luego se extrajo el producto deseado con éter dietílico. El disolvente se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y luego se evaporó, obteniéndose el producto de reacción que se utilizó en el siguiente paso sin ninguna purificación adicional.

[00356] Intermedio 2. Se disolvieron mesilato de exatecan (100 mg, 0,188 mmol), ácido 2-azidoacético (1,1 equiv., 0,207 mmol, 21 mg), DMTMM (1,3 equiv., 0,244 mmol, 68 mg) y DIPEA (50 μL) en 5 mL de una mezcla de DMF/agua 4:1. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN en agua). El producto deseado se obtuvo como un polvo blanco después de la liofilización (79 mg, 74 %). MS calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{FN}_6\text{O}_5$: 519,18, observado: 519,41, $[\text{M}+\text{H}]^+$.

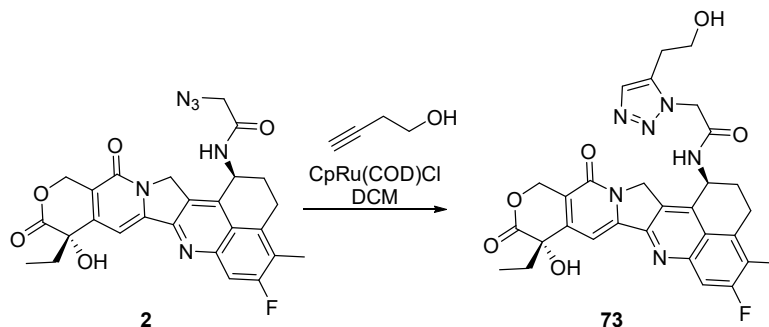
[00357] Compuesto 71. El intermedio 2 previamente preparado (10 mg, 0,0193 mmol), alcohol propargílico (1,2 equiv., 0,0232 mmol, 1,35 μL) y el catalizador $\text{CpRu}(\text{COD})\text{Cl}$ (10%, 0,7 mg) se suspendieron en DCM anhidro (2 mL) bajo una atmósfera de argón. La mezcla se agitó a 40 C durante 16 horas. El producto de reacción en bruto se purificó directamente mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa de C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN en agua). El producto deseado se obtuvo como un polvo amarillento después de la liofilización a partir de agua y ACN (9 mg, 90 %). MS calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{FN}_6\text{O}_6$: 575,21, observado: 575,14, $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 124: Síntesis del compuesto 72



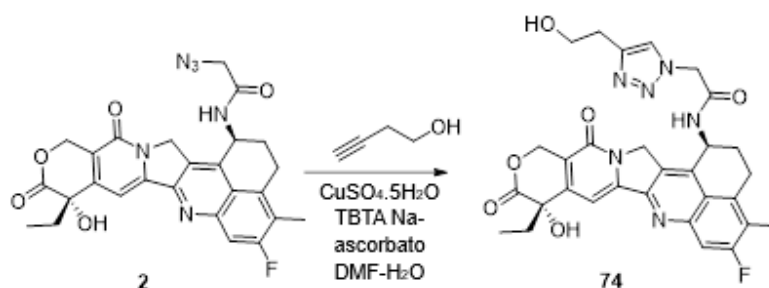
[00358] Compuesto 72. El intermedio 2 previamente preparado del Ejemplo 63 (10 mg, 0,0193 mmol), alcohol propargílico (1,2 equiv., 0,0232 mmol, 1,35 μ L), ascorbato de sodio (0,2 equiv., 0,00386 mmol, 2 M en agua, 1,93 μ L), sulfato de cobre pentahidratado (0,1 equiv., 0,00193 mmol, 1 M en agua, 1,93 μ L) y TBTA (0,15 equiv., 0,0029 mmol, 1,5 mg) se disolvieron en 2 mL de una mezcla 4:1 de DMF/agua. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El producto de reacción en bruto se purificó directamente mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa de C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN en agua). El producto deseado se obtuvo como un polvo amarillento después de la liofilización de agua y ACN (10 mg, 95 %). MS calc. para $C_{29}H_{28}FN_6O_6$: 575,21, observado: 575,55, $[M+H]^+$.

Ejemplo 125: Síntesis del Compuesto 73



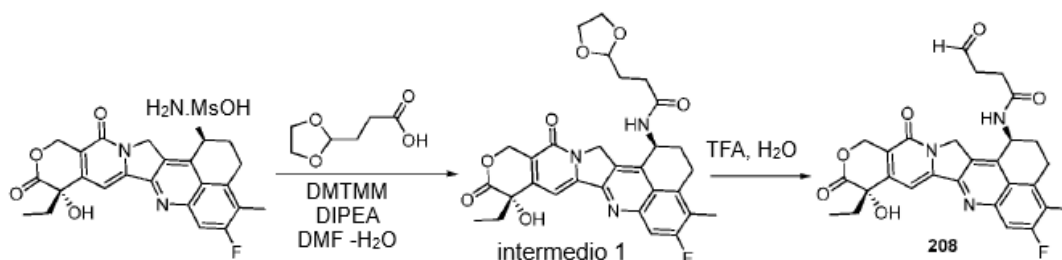
[00359] Compuesto 73. Se suspendieron el intermedio 2 previamente preparado del Ejemplo 63 (10 mg, 0,0193 mmol), 3-butin-1-ol (1,2 equiv., 0,0232 mmol, 1,50 μ L) y el catalizador $CpRu(COD)Cl$ (10 %, 0,7 mg) en DCM anhidro (2 mL) en una atmósfera de argón. La mezcla se agitó a 40 C durante 16 horas. El producto de reacción en bruto se purificó directamente mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa de C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN en agua). El producto deseado se obtuvo como un polvo amarillento después de la liofilización de agua y ACN (6 mg, 54 %). MS calc. para $C_{30}H_{30}FN_6O_6$: 589,22, observado: 589,23, $[M+H]^+$.

Ejemplo 126: Síntesis del Compuesto 74



[00360] Compuesto 74. Se disolvieron el intermedio 2 previamente preparado del Ejemplo 63 (10 mg, 0,0193 mmol), 3-butin-1-ol (1,2 equiv., 0,0232 mmol, 1,50 μ L), ascorbato de sodio (0,2 equiv., 0,00386 mmol, 2 M en agua, 1,93 μ L), sulfato de cobre pentahidratado (0,1 equiv., 0,00193 mmol, 1 M en agua, 1,93 μ L) y TBTA (0,15 equiv., 0,0029 mmol, 1,5 mg) en 2 mL de una mezcla 4:1 de DMF/agua. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El producto de reacción en bruto se purificó directamente mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa de C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN en agua). El producto deseado se obtuvo como un polvo blanco después de la liofilización de agua y ACN (7 mg, 62 %). MS calc. para $C_{30}H_{30}FN_6O_6$: 589,22, observado: 589,05, $[M+H]^+$.

Ejemplo 127: Síntesis del Compuesto 208

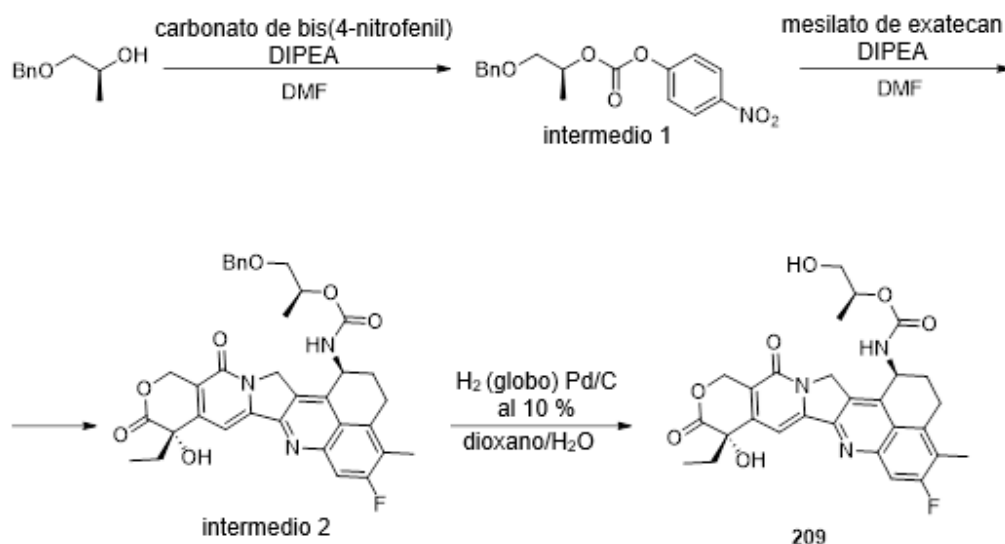


[00361] Intermedio 1. A una mezcla de DMF / agua 4:1 (4 mL) se agregaron mesilato de exatecan (20 mg, 0,0376 mmol), ácido 3-(1,3-dioxolan-2-il)propanoico (2 equiv., 0,0753 mmol, 11 mg), DMTMM (1,5 equiv., 0,0564 mmol, 16 mg) y diisopropiletilamina (20 μ L). La solución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras LC-MS indicaba el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía HPLC de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/ H_2O). El producto deseado se obtuvo como un polvo blanco después de la liofilización (19 mg, 89 %). MS calc. para $C_{30}H_{31}FN_3O_7$: 564,21, observado: 564,34, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,46 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,56 (dt, J = 9,3, 5,0 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,31 – 5,11 (m, 2H), 4,83 (t, J = 4,5 Hz, 1H), 3,89 – 3,80 (m, 2H), 3,79 – 3,69 (m, 2H), 3,24 – 3,10 (m, 2H), 2,40 (d, J = 1,9 Hz, 3H), 2,26 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,14 (q, J = 7,3, 6,6 Hz, 2H), 1,98 – 1,77 (m, 4H), 0,88 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

[00362] Compuesto 208. El intermedio 1 (20 mg) se disolvió en 1 ml de solución acuosa de TFA al 0,1 % y la mezcla resultante se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente, hasta que la cromatografía

líquida-espectrometría de masas LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía HPLC de fase reversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificada con diol, 0 → 100 % ACN/TFA al 1 %). El producto deseado se obtuvo como un polvo blanco después de la liofilización (17 mg, 94 %). MS calc. para $C_{28}H_{27}FN_3O_6$: 520,19, observado: 520,31, $[M+H]^+$. No se obtuvieron espectros de RMN debido a la inestabilidad del material.

Ejemplo 128: Síntesis del Compuesto 209



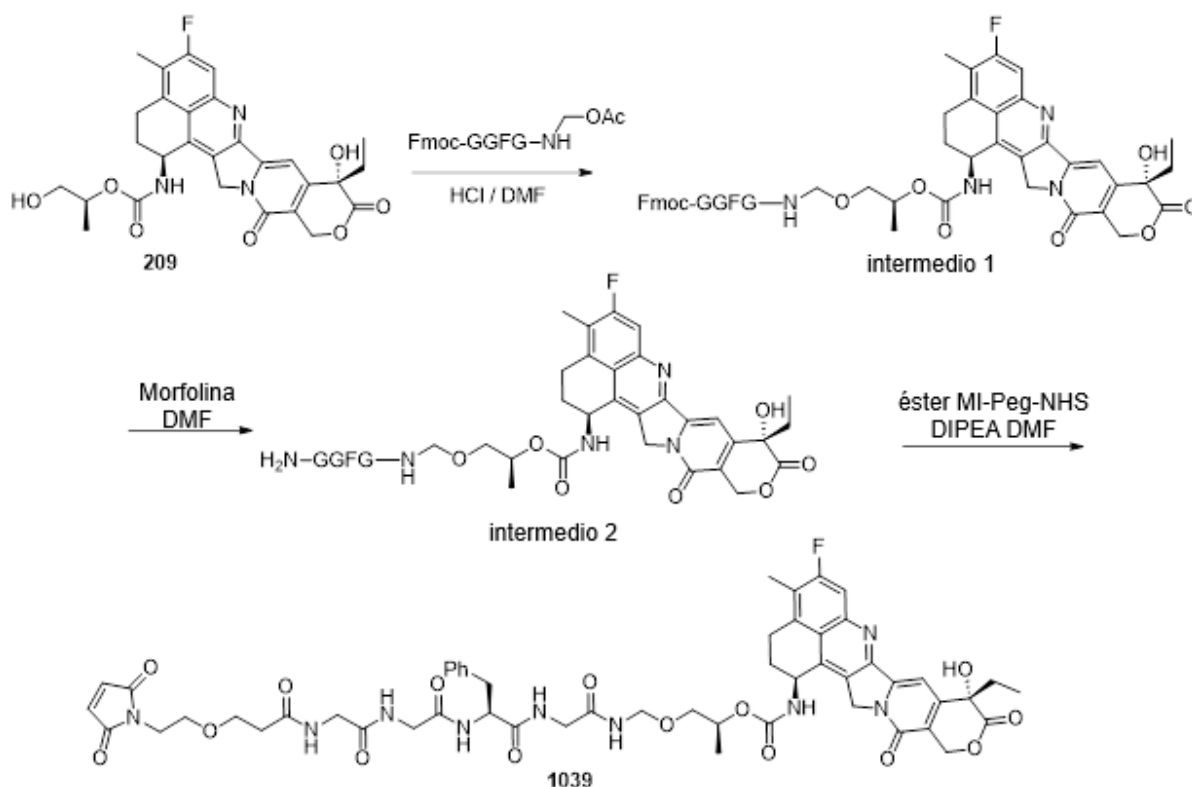
[00363] Intermedio 1. A la solución de (S)-1-(benciloxi)propan-2-ol (1,0 equiv., 100 mg, 0,6 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (2,0 equiv., 366 mg, 1,2 mmol) en DMF (4 mL) se añadió diisopropiletilamina (1,1 equiv., 115 μ L, 0,66 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminó el DMF en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2 , 0 – 20 % EtOAc/ciclohexano), dando el producto intermedio 1 (135 mg, 68 %) como un aceite espeso transparente.

[00364] Intermedio 2. A la mezcla de Intermedio 1 (1,0 equiv., 40 mg, 0,12 mmol) y mesilato de exatecan (1,0 equiv., 65 mg, 0,12 mmol) se añadió DMF (1,5 mL) y diisopropiletilamina (3,0 equiv., 0,36 mmol, 62 μ L) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/ NH_4OAc 10mM ac.) ofreció el producto Intermedio 2 (55 mg, 73 %) como un sólido blanco después de la liofilización.

[00365] Compuesto 209. A la solución del Intermedio 2 (1,0 equiv., 20 mg, 0,032 mmol) en dioxano/agua (2:1, 1 mL) se añadió Pd/C al 10 % y la mezcla resultante se hidrogenó (H_2 en globo) durante 2 horas. Luego, se filtró la suspensión y el filtrado se evaporó en un evaporador rotatorio. Purificación del residuo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/ NH_4OAc 10 mM ac.) ofreció el compuesto

209 (9 mg, 53 %) como un sólido blanco después de la liofilización. MS calc. para $C_{28}H_{29}FN_3O_7$: 538,20, observado: 538,10, $[M+H]^+$. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,90 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,71 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 7,28 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,30 – 5,20 (m, 2H), 5,06 (d, $J = 19,0$ Hz, 1H), 4,86 – 4,76 (m, 2H), 3,53 – 3,40 (m, 2H), 3,30 – 3,19 (m, 1H), 3,17 – 3,00 (m, 1H), 2,34 (d, $J = 1,8$ Hz, 3H), 2,29 – 2,18 (m, 1H), 2,15 – 2,00 (m, 1H), 1,93 – 1,77 (m, 2H), 1,26 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H), 0,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Ejemplo 129: Síntesis del Compuesto 1039



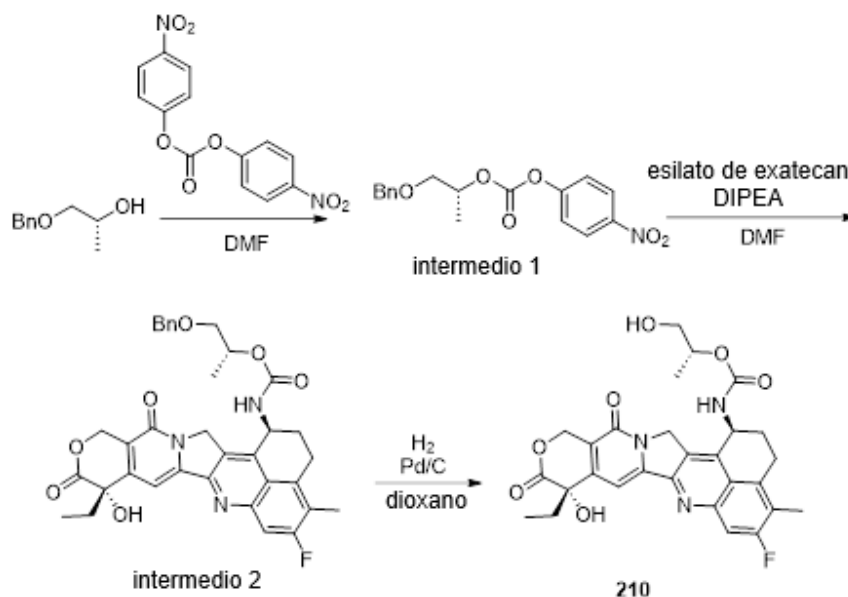
[00366] Intermedio 1. El compuesto 209 (80 mg, 0,15 mmol) y Fmoc-GGFG-OAc (70 mg, 0,11 mmol) se coevaporaron 3 veces a partir de DMF anhidro y luego se redisolvieron en DMF anhidro (4 mL). Se añadió HCl (4 M en dioxano, 30 μ L) y la mezcla de reacción se agitó durante 60 min a 50 °C. Luego, se eliminó la DMF en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 $\rightarrow$ 50% ACN/ NH_4OAc 10mM ac.), lo que da el producto Intermedio 1 (30 mg, 25 %) como un sólido blanco. MS calc. para $C_{59}H_{60}FN_8O_{13}$: 1107,42, observado: 1107,45, $[M + H]^+$.

[00367] Intermedio 2. A una solución de Intermedio 1 (30 mg, 0,027 mmol) en 2 mL de DMF anhidra se añadió morfolina (100 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora y luego se eliminó DMF en un evaporador rotatorio. El producto de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 $\rightarrow$ 100% ACN/TFA al 0,1 %), lo que da el

producto intermedio 2 (15 mg, 63 %) como un sólido blanco. MS calc. para $C_{44}H_{49}FN_8O_{11}$: 885,35, observado: 885,25, $[M + H]^+$.

[00368] Compuesto 1039. Se disolvió el intermedio 2 (15 mg, 0,017 mmol) en 1 mL de DMF. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,5 equiv., 0,025 mmol, 7,9 mg) y DIPEA (5 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol (0 $\rightarrow$ 100 % ACN/ NH_4OAc 10 mM ac.). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (11 mg, 60 %). MS calc. para $C_{53}H_{59}FN_9O_{15}$: 1080,40, observado: 1080,35, $[M + H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,54 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H), 8,31 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 8,14 – 8,08 (m, 2H), 8,00 (dd, $J = 7,3, 4,1$ Hz, 2H), 7,76 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,25 (t, $J = 4,4$ Hz, 4H), 7,19 (m, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,42 (d, $J = 2,8$ Hz, 2H), 5,30 – 5,24 (m, 2H), 5,13 (d, $J = 19,0$ Hz, 1H), 4,95 (m, 1H), 4,61 (m, 2H), 4,54 – 4,46 (m, 1H), 3,75 (m, 3H), 3,68 (s, 1H), 3,58 – 3,53 (m, 5H), 3,49 – 3,45 (m, 4H), 3,29 – 3,22 (m, 1H), 3,13 – 3,03 (m, 2H), 2,81 (dd, $J = 13,9, 9,6$ Hz, 1H), 2,39 – 2,36 (m, 3H), 2,33 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,29 – 2,23 (m, 1H), 2,13 – 2,06 (m, 1H), 1,87 (m, 2H), 1,28 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H), 0,88 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Ejemplo 130: Síntesis del Compuesto 210



[00369] Intermedio 1. A la solución de (*R*)-1-(benciloxi)propan-2-ol (100 mg, 0,6 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (2,0 equiv., 366 mg, 1,2 mmol) en DMF (2 mL) se agregó diisopropiletilamina (1,1 equiv., 115 μ L, 0,66 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se removió DMF en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO_2 , 0 – 20 % EtOAc/ciclohexano), lo que da el intermedio 1 (161 mg, 82 %) como un aceite amarillento.

[00370] Intermedio 2. A la mezcla de Intermedio 1 (1,0 equiv., 50 mg, 0,15 mmol) y mesilato de exatecan (1,0 equiv., 80 mg, 0,15 mmol) se añadió DMF (3 mL) y diisopropiletilamina (200 µL) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/ NH₄OAc 10mM

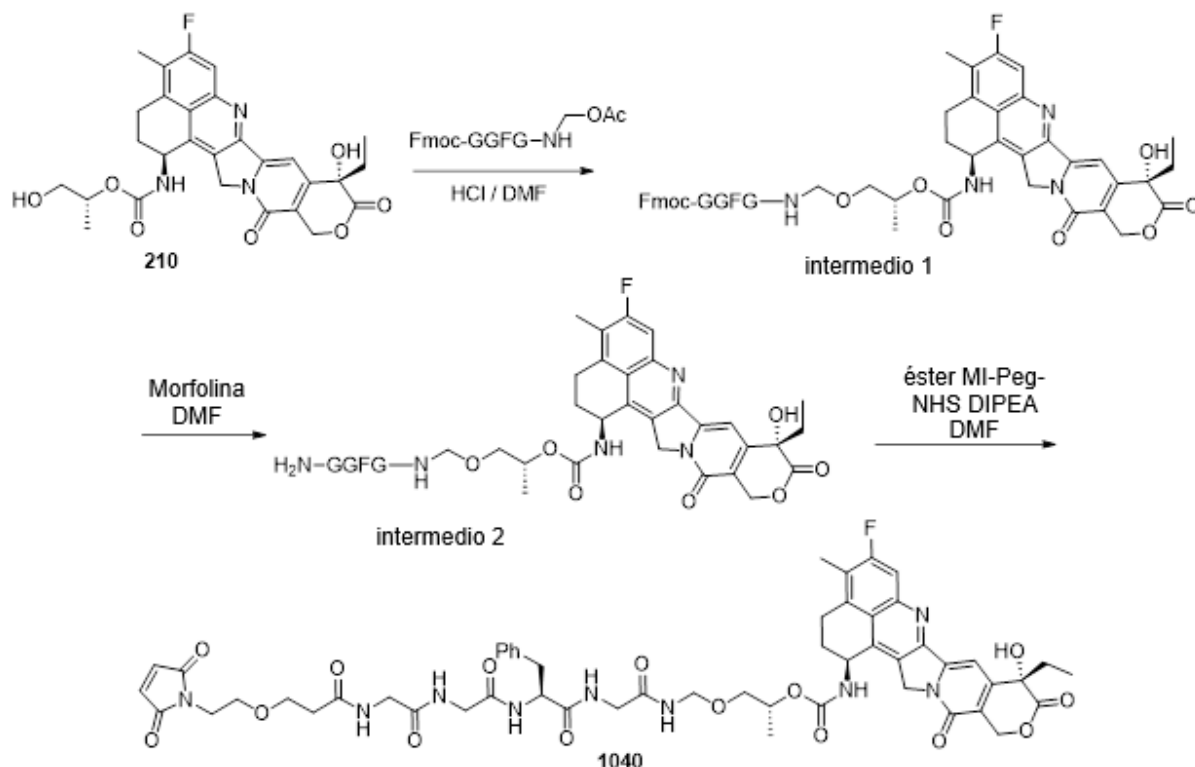
5 ac.) ofreció el producto Intermedio 2 (67 mg, 72 %) como un sólido blanco después de la liofilización.

[00371] Compuesto 210. A una solución de Intermedio 2 (67 mg, 0,11 mmol) en dioxano (5 mL) se añadió Pd/C al 10 % y la mezcla resultante se hidrogenó (H₂ en globo) durante 4 horas. Se filtró la suspensión y el filtrado se evaporó en un evaporador rotatorio. Purificación del residuo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/ NH₄OAc 10 mM ac.) ofreció el compuesto 210 (40 mg, 70 %) como un sólido blanco

10 después de la liofilización. MS calc. para C₂₈H₂₉FN₃O₇: 538,20, observado: 538,25, [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,92 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,74 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,53 (s, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,31 – 5,20 (m, 2H), 5,15 (d, *J* = 19,1 Hz, 1H), 4,87 – 4,74 (m, 2H), 3,54 – 3,45 (m, 1H), 3,32 – 3,20 (m, 1H), 3,15 – 3,03 (m, 1H), 2,36 (d, *J* = 1,8 Hz, 3H), 2,27 – 2,18 (m, 1H), 2,17 – 2,08 (m, 1H), 1,88 (m, 2H), 1,21 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

15

Ejemplo 131: Síntesis del compuesto 1040



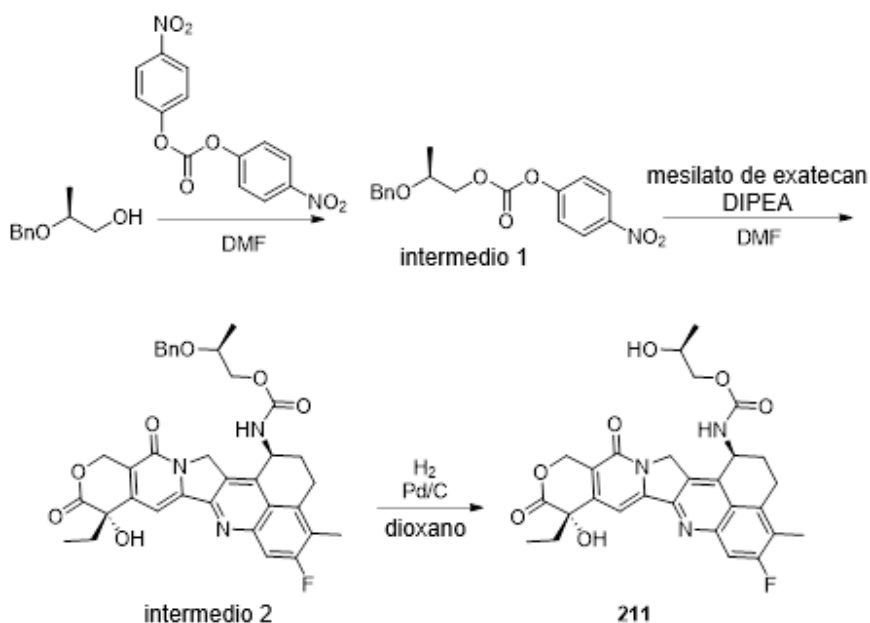
[00372] Intermedio 1. El compuesto 210 (80 mg, 0,15 mmol) y Fmoc-GGFG-OAc (70 mg, 0,11 mmol) se evaporaron en conjunto 3 veces de DMF anhidra y luego se volvieron a disolver en DMF anhidra (2

mL). Se añadió HCl (4 M en dioxano, 80 µL) y la mezcla de reacción se agitó durante 60 min a 50 °C. Luego, se eliminó la DMF en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 → 50% ACN/ NH₄OAc 10mM ac.), lo que da el producto Intermedio 1 (64 mg, 52 %) como un sólido blanco. MS calc. para C₅₉H₆₀FN₈O₁₃: 1107,42, observado: 1107,35, [M + H]⁺.

[00373] Intermedio 2. A una solución de Intermedio 1 (52 mg, 0,047 mmol) en 2 mL de DMF anhidra se añadió morfolina (100 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora y luego se eliminó DMF en un evaporador rotatorio. El producto de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 → 100% ACN/TFA al 0,1 %), lo que da el producto intermedio 2 (31 mg, 76 %) como un sólido blanco. MS calc. para C₄₄H₄₉FN₈O₁₁: 885,35, observado: 885,24, [M + H]⁺.

[00374] Compuesto 1040. Se disolvió el intermedio 2 (31 mg, 0,017 mmol) en 1 mL de DMF. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,5 equiv., 0,025 mmol, 7,9 mg) y DIPEA (5 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol (0 → 100 % ACN/ NH₄OAc 10 mM ac.). El producto se volvió a purificar mediante HPLC ultrarrápida de fase inversa, utilizando 0 → 100% ACN/TFA al 0,1% y posteriormente utilizando 0 → 100% ACN/ NH₄OAc 10 mM ac.. El producto deseado 1040 se recuperó como un sólido blanco, después de la liofilización a partir de agua (12 mg, 31 %), contiene 5 % del compuesto 209. MS calc. para C₅₃H₅₉FN₉O₁₅: 1080,40, observado: 1080,66, [M + H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,50 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H), 8,25 (m, 1H), 8,12 – 8,04 (m, 2H), 8,01 – 7,91 (m, 2H), 7,86 (s, 1H), 7,25 – 7,11 (m, 6H), 7,00 (s, 2H), 6,56 (s, 1H), 5,44 (m, 2H), 5,35 – 5,25 (m, 2H), 5,11 (m, 1H), 4,95 (m, 1H), 4,60 (m, 2H), 4,50 (m, 1H), 3,75 – 3,65 (m, 4H), 3,56 – 3,43 (m, 8H), 3,29 – 3,19 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 2,71 (m, 1H), 2,40 (m, 3H), 2,29 (m, 2H), 2,23 (m, 1H), 2,12 – 2,00 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,27 (d, *J* = 6,2 Hz, 3H), 0,89 (t, *J* = 7,7 Hz, 3H).

Ejemplo 132: Síntesis del compuesto 211

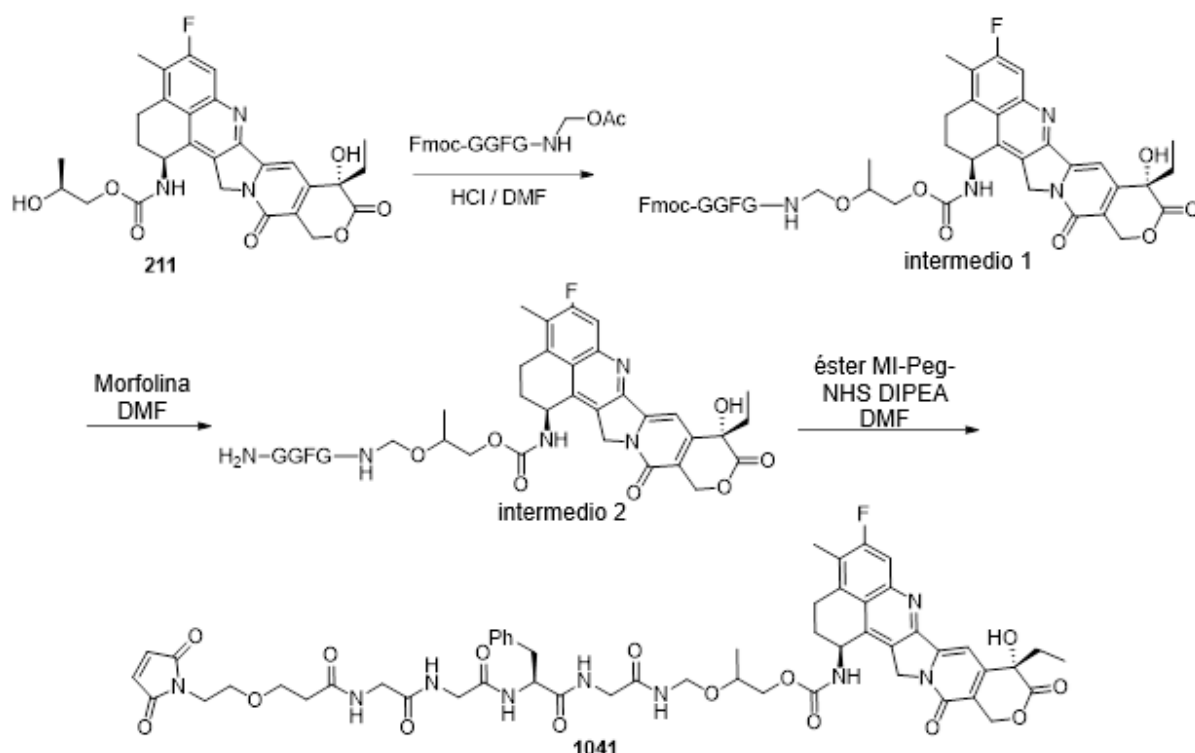


[00375] Intermedio 1. A la solución de (S)-2-(benciloxi)propan-1-ol (1,0 equiv., 100 mg, 0,6 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (2,0 equiv., 366 mg, 1,2 mmol) en DMF (2 mL) se agregó diisopropiletilamina (1,5 equiv., 157 μ L, 0,9 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se removió DMF en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (SiO₂, 0 – 20 % EtOAc/ciclohexano), lo que da el intermedio 1 (186 mg, 93 %) como un aceite incoloro espeso.

[00376] Intermedio 2. A la mezcla de Intermedio 1 (1,2 equiv., 60 mg, 0,18 mmol) y mesilato de exatecan (1,0 equiv., 80 mg, 0,15 mmol) se añadió DMF (5 mL) y diisopropiletilamina (100 μ L) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La DMF se eliminó en un evaporador rotatorio y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50% ACN/ NH₄OAc 10 mM ac.) ofreció el producto Intermedio 2 (90 mg, 96 %) como un sólido blanco después de la liofilización. MS calc. para C₃₅H₃₅FN₃O₇: 628,24, encontrado: 628,20 [M+H]⁺.

[00377] Compuesto 211. A la solución del Intermedio 2 (1,0 equiv., 90 mg, 0,14 mmol) en dioxano (5 mL) se añadió Pd/C al 10 % y la mezcla resultante se hidrogenó (H₂ en globo) durante 5 horas. Luego, se filtró la suspensión y el filtrado se evaporó en un evaporador rotatorio. Purificación del residuo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/ NH₄OAc 10 mM ac.) ofreció el compuesto 211 (71 mg, 92 %) como un sólido blanco después de la liofilización. Cálculo MS para C₂₈H₂₉FN₃O₇: 538,19, encontrado: 508,15, [M+H]⁺.

Ejemplo 133: Síntesis del compuesto 1041



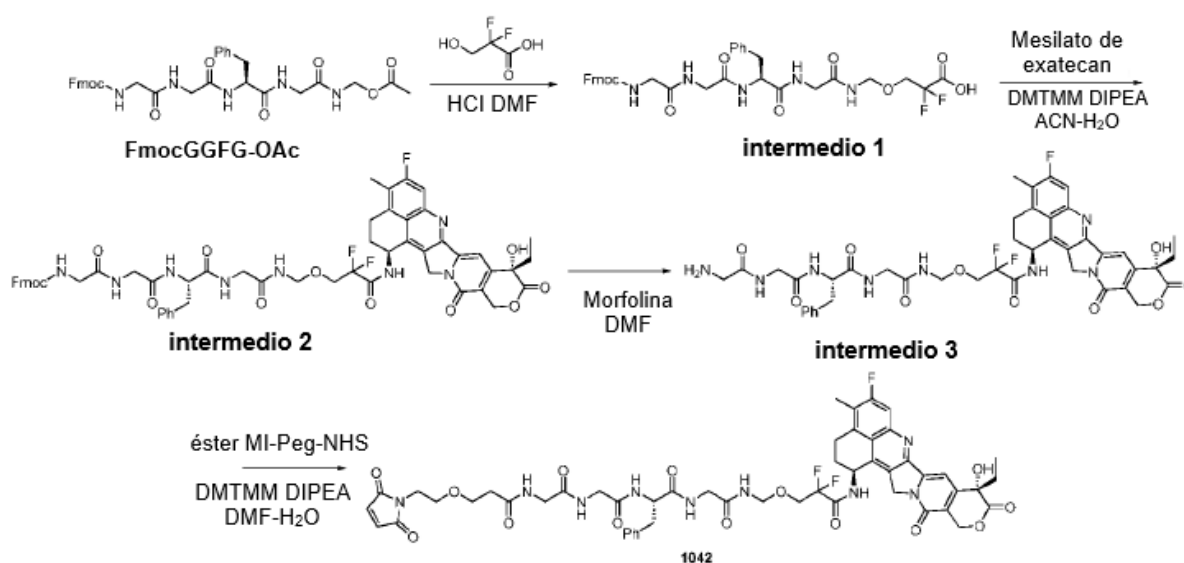
[00378] Intermedio 1. El compuesto 211 (70 mg, 0,13 mmol) y Fmoc-GGFG-OAc (65 mg, 0,10 mmol) se evaporaron en conjunto 3 veces de DMF anhidra y luego se volvieron a disolver en DMF anhidra (4 mL). Se añadió HCl (4 M en dioxano, 30 μ L) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a 50 °C. Luego, se eliminó la DMF en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 $\rightarrow$ 50% ACN/ NH_4OAc 10 mM ac.), lo que da el producto Intermedio 1 (32 mg, 29 %) como un sólido blanco. MS calc. para $\text{C}_{59}\text{H}_{60}\text{FN}_8\text{O}_{13}$: 1107,42, observado: 1107,30, $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[00379] Intermedio 2. A una solución de Intermedio 1 (32 mg, 0,029 mmol) en 2 mL de DMF anhidra se añadió morfolina (100 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora y luego se eliminó DMF en un evaporador rotatorio. El producto de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que da el producto intermedio 2 (15 mg, 59 %) como un sólido blanco. MS calc. para $\text{C}_{44}\text{H}_{49}\text{FN}_8\text{O}_{11}$: 885,35, observado: 885,20, $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[00380] Compuesto 1041. Se disolvió el intermedio 2 (15 mg, 0,017 mmol) en 1 mL de DMF. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,5 equiv., 0,025 mmol, 7,9 mg) y DIPEA (5 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol (0 $\rightarrow$ 100 % ACN/ NH_4OAc 10 mM ac.). El

producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (11 mg, 60 %). MS calc. para $C_{53}H_{59}FN_9O_{15}$: 1080,40, observado: 1080,35, $[M + H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,49 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 8,28 (q, $J = 5,1$ Hz, 1H), 8,10 (q, $J = 4,7$, 3,7 Hz, 2H), 7,99 (q, $J = 7,0$, 5,8 Hz, 2H), 7,78 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 7,34 – 7,31 (m, 1H), 7,26 – 7,15 (m, 5H), 7,00 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,43 (d, $J = 2,8$ Hz, 2H), 5,25 (q, $J = 6,9$, 6,3 Hz, 3H), 4,66 – 4,61 (m, 2H), 4,48 (q, $J = 8,8$, 8,3 Hz, 1H), 4,12 – 4,00 (m, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,82 (m, 1H), 3,77 – 3,63 (m, 5H), 3,63 – 3,48 (m, 5H), 3,46 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,29 – 3,04 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,78 (dt, $J = 13,8$, 8,8 Hz, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,33 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,23 – 2,12 (m, 2H), 1,95 – 1,81 (m, 2H), 1,13 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H), 0,88 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Ejemplo 134: Síntesis del compuesto 1042



[00381] Intermedio 1. El Fmoc-GGFG-OAc (60 mg, 0,095 mmol) y el ácido 2,2-difluoro-3-hidroxiopropanoico (36 mg, 0,29 mmol) se coevaporaron 3 veces a partir de DMF anhidro y luego se redisolvieron en DMF anhidro (2 mL). Se añadió HCl (4 M en dioxano, 30 μ L) y la mezcla de reacción se agitó durante 60 min a 50 °C. Luego se eliminó el DMF en un evaporador rotatorio y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 $\rightarrow$ 50% ACN/TFA al 0,1 %), dando el producto intermedio 1 (45 mg, 68 %) como un sólido blanco. Cálculo MS para $C_{34}H_{36}F_2N_5O_9$: 694,24, encontrado: 694,25, $[M - H]^-$.

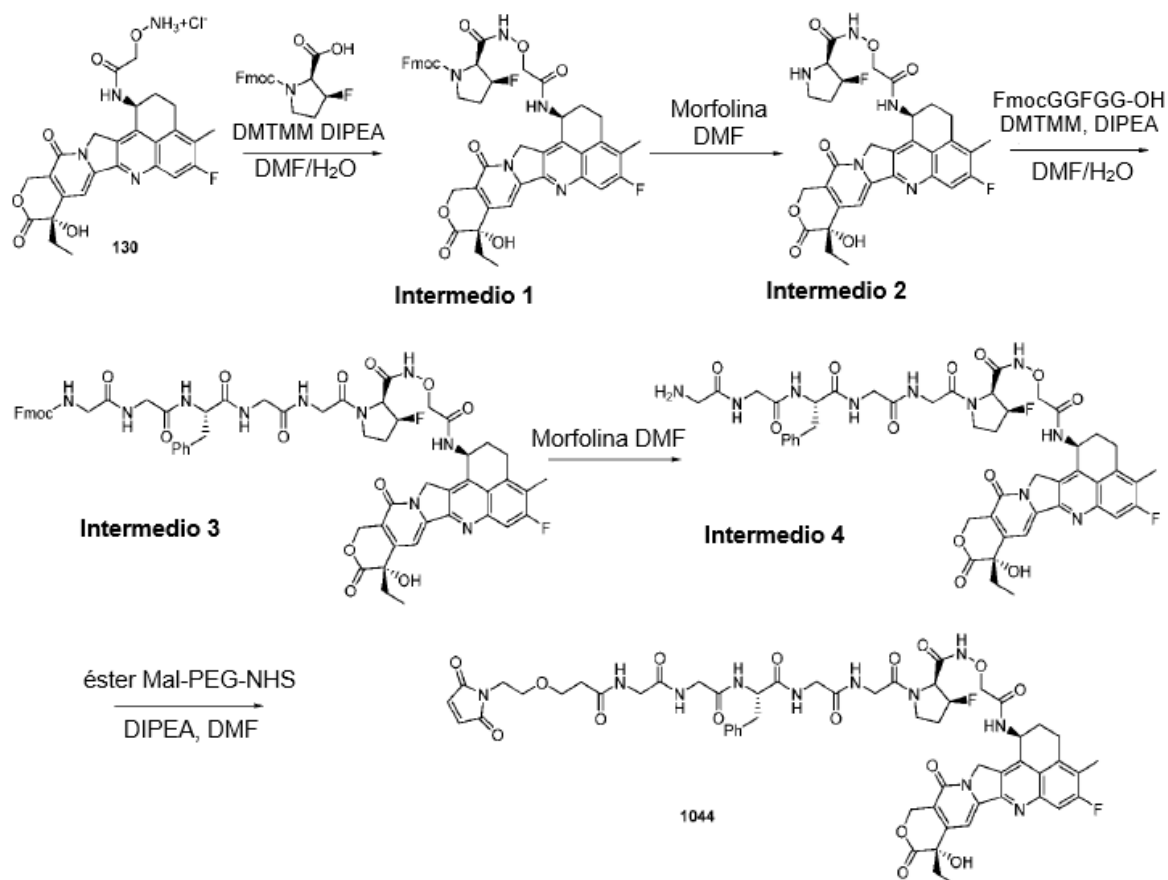
[00382] Intermedio 2. A la mezcla de mesilato dexatecano (30 mg, 0,056 mmol), Intermedio 1 (45 mg, 0,065 mmol) y DMTMM (31 mg, 0,113 mmol), se le añadió DMF/agua (5:1, 2,5 ml) y diisopropiletilamina (30 μ L). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/TFA al 0,1 %), obteniéndose el Intermedio 2 como un sólido blanco tras la liofilización (30 mg, 48 %). MS calc. para

$C_{58}H_{56}F_3N_8O_{12}$: 1113,39, observado: 1113,40, $[M+H]^+$.

[00383] Intermedio 3. A una solución de Intermedio 2 (30 mg, 0,027 mmol) en 2 mL de DMF anhidra se añadió morfolina (150 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora y luego se eliminó DMF en un evaporador rotatorio. El producto de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 25 g, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/TFA al 0,1 %), lo que da el producto intermedio 3 (10 mg, 42 %) como un sólido blanco. Cálculo MS para $C_{43}H_{46}F_3N_8O_{10}$: 891,32, encontrado: 891,30, $[M + H]^+$.

[00384] Compuesto 1042. Se disolvió el intermedio 3 (10 mg, 0,011 mmol) en 1,5 mL de DMF. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il (0,011 mmol, 3,5 mg) y DIPEA (4 μ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El producto se purificó por HPLC ultrarrápida de fase inversa, utilizando una columna semipreparativa que contenía C18 modificado con diol (0 $\rightarrow$ 100 % ACN/ NH_4OAc 10 mM ac.). El producto deseado se recuperó como un sólido blanco después de la liofilización de agua (6 mg, 50 %). MS calc. para $C_{52}H_{55}F_3N_9O_{14}$: 1086,37, observado: 1086,40, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9,50 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,66 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H), 8,32 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 8,10 (dd, $J = 6,9, 4,5$ Hz, 2H), 7,98 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 7,81 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,27 – 7,20 (m, 4H), 7,20 – 7,11 (m, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,53 (s, 1H), 5,60 (dt, $J = 8,5, 5,5$ Hz, 1H), 5,49 – 5,38 (m, 2H), 5,29 – 5,05 (m, 2H), 4,72 (m, 2H), 4,51 (m, 1H), 4,04 – 3,91 (m, 2H), 3,76 – 3,72 (m, 2H), 3,66 (s, 1H), 3,61 – 3,57 (m, 3H), 3,52 (s, 1H), 3,46 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 3,24 – 3,12 (m, 2H), 3,05 (m, 1H), 2,79 (m, 1H), 2,40 (d, $J = 1,9$ Hz, 3H), 2,33 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,26 – 2,15 (m, $J = 6,8$ Hz, 2H), 1,87 (m, 2H), 0,88 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Ejemplo 135: Síntesis del Compuesto 1044



[00385] Intermedio 1. A la mezcla del compuesto 130 (60 mg, 0,11 mmol), ácido (2S,3S)-1(Fmoc)-3-fluoropirrolidin-2-carboxílico (40 mg, 0,11 mmol) y DMTMM (30 mg, 0,11 mmol) se le añadió DMF/agua (3:1, 2 ml) y diisopropiletilamina (60 µL) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 90 min. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 50% ACN/H₂O), ofreciendo el Intermedio 1 como un sólido blanco después de liofilización (47 mg, 51%). MS calc. para C₄₆H₄₂F₂N₅O₉: 846,86, encontrado: 846,30, [M+H]⁺.

[00386] Intermedio 2. Se agregó morfolina (300 µL) a la solución de intermedio 1 (83 mg, 0,098 mmol) en DMF anhidra (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 50 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (34 mg, 56 %). Cálculo MS para C₃₁H₃₂F₂N₅O₇: 624,61, encontrado: 624,25, [M+H]⁺.

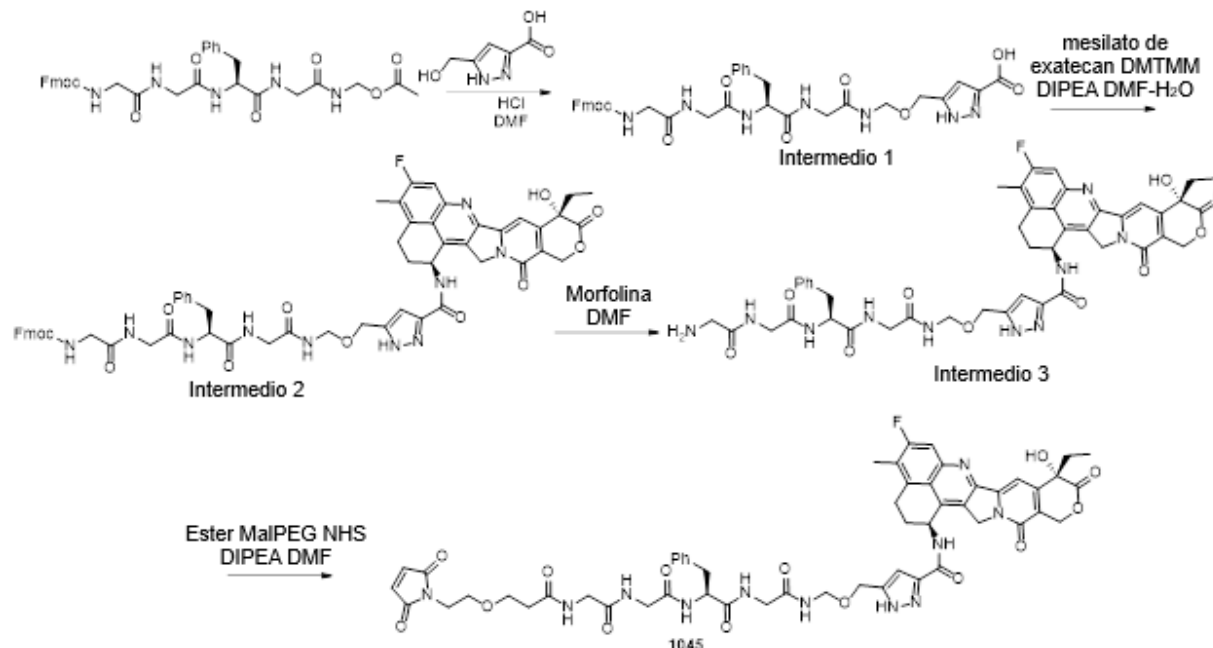
[00387] Intermedio 3. A la mezcla del Intermedio 2 (34 mg, 0,055 mmol), FmocGGFGG-OH (37 mg, 0,06 mmol) y DMTMM (16,6 mg, 0,06 mmol) se le añadió DMF/agua (3:1, 2 ml) y diisopropiletilamina (60 µL) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 60 min. La mezcla de reacción se

purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 50 % ACN/H₂O), ofreciendo el Intermedio 3 como un sólido blanco después de la liofilización (43 mg, 64%). MS calc. para C₆₃H₆₂F₂N₁₀O₁₄: 1221,94, observado: 1221,40, [M+H]⁺.

[00388] Intermedio 4. Se agregó morfolina (40 µL) a la solución de intermedio 3 (25 mg, 0,020 mmol) en DMF anhidra (1,5 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. LC-MS indicó el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 50 % ACN/H₂O), lo que da el producto como un sólido blanco después de la liofilización (15 mg, 75 %). MS calc. para C₄₈H₅₃F₂N₁₀O₁₂: 999,00, observado: 999,35, [M+H]⁺.

[00389] Compuesto 1044. Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (15 mg, 0,014 mmol) y DIPEA (20 µL) a la solución del intermedio 4 (4,2 mg, 0,014 mmol) en DMF anhidro (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, mientras la LC-MS indicaba el consumo total del material de partida. La mezcla se purificó directamente mediante HPLC ultrarrápida de fase inversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 50 % ACN/H₂O), obteniéndose el compuesto 1044 como un sólido blanco tras la liofilización (2,5 mg, 15 %). Cálculo MS para C₅₇H₆₂F₂N₁₁O₁₆: 1194,17, encontrado: 1194,45, 15-54 [M+H]⁺.

Ejemplo 136: Síntesis del compuesto 1045



[00390] Intermedio 1. Se disolvió FmocGGFG-OAc (1 equiv., 0,0878 mmol, 54 mg) en 2 mL de DMF y se añadió ácido 5-(hidroximetil)-1H-pirazol-3-carboxílico (1,1 equiv., 0,0966 mmol, 14 mg), seguido de 10 µL de una solución de HCl 4 M en dioxano. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a

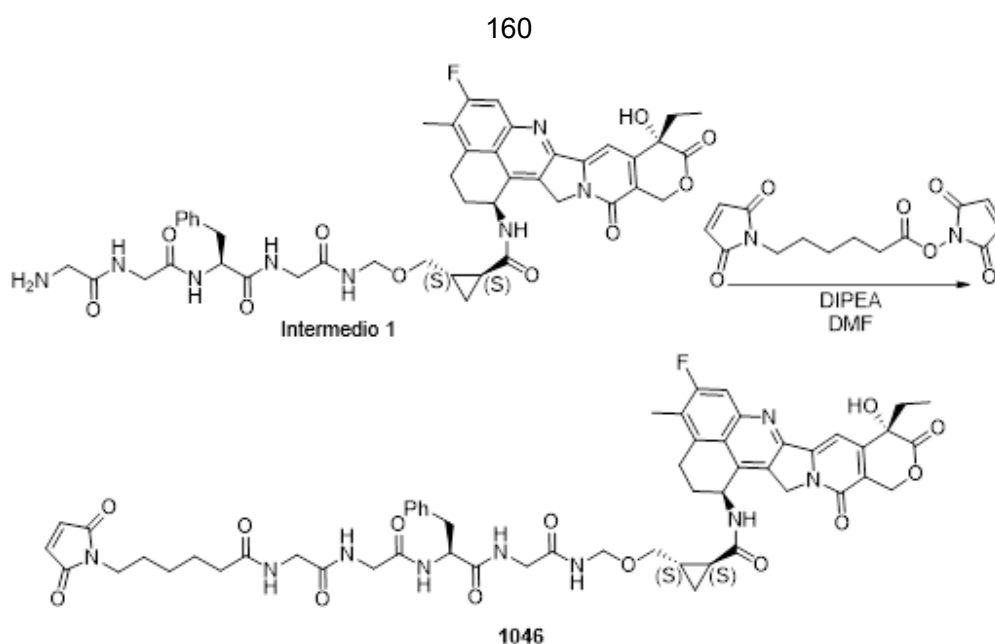
temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se hizo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua. El producto contenía varias impurezas provenientes de la descomposición de péptidos (72 mg). MS calc. para C₃₆H₃₈N₇O₉: 712,27, encontrado: 712,24, [M+H]⁺.

[00391] Intermedio 2. A una solución del intermedio 1 previamente preparado (72 mg, 0,101 mmol) en DMF (2 mL) se añadieron mesilato de exatecan (1 equiv., 0,101 mmol, 54 mg), DMTMM (1,3 equiv., 0,132 mmol, 36 mg), DIPEA (50 µL) y agua (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego cargarse directamente en la columna para su purificación. La purificación se hizo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (25 g, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (52 mg, 46 %). MS calc. para C₆₀H₅₈FN₁₀O₁₂: 1129,42, observado: 1129,51, [M+H]⁺.

[00392] Intermedio 3. Se disolvió el intermedio 2 previamente preparado (52 mg, 0,0461 mmol) en DMF (2 mL) y se agregó morfolina (100 µL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (20 mg, 48 %). MS calc. para C₄₅H₄₈FN₁₀O₁₀: 907,35, observado: 907,69, [M+H]⁺.

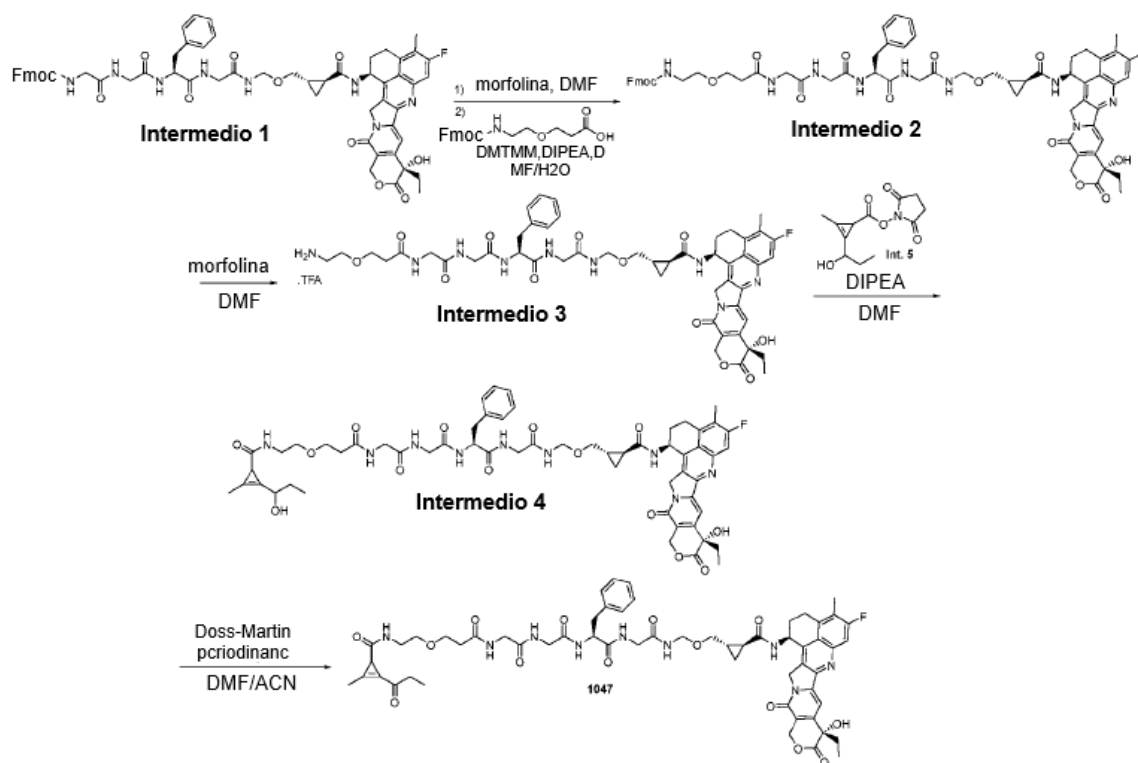
[00393] Compuesto 1045. Se disolvió el intermedio 3 previamente preparado (20 mg, 0,0221 mmol) en 2 mL de DMF anhidra. Se agregaron 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,2 equiv., 0,0265 mmol, 8,2 mg) y DIPEA (5 µL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 → 100 % ACN/TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (13 mg, 53 %). MS calc. para C₅₄H₅₇FN₁₁O₁₄: 1102,41, observado: 1102,43, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,13 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 8,90 – 8,81 (m, 2H), 8,61 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,31 (m, 3H), 8,09 (m, 2H), 7,97 (m, 2H), 7,82 (q, *J* = 10,7, 9,8 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,21 (m, 3H), 7,00 (s, 2H), 6,52 (s, 2H), 5,87 (dd, *J* = 13,3, 6,6 Hz, 1H), 5,78 – 5,68 (m, 2H), 5,48 (m, 2H), 5,39 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 5,29 – 5,13 (m, 2H), 4,68 (s, 1H), 4,54 – 4,47 (m, 1H), 4,40 (s, 2H), 3,75 (m, 4H), 3,66 (d, *J* = 5,7 Hz, 3H), 3,62 – 3,48 (m, 2H), 3,16 – 2,97 (m, 2H), 2,78 (td, *J* = 13,9, 9,6 Hz, 1H), 2,40 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 2,32 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,28 – 2,24 (m, 1H), 1,85 (dq, *J* = 14,1, 7,1 Hz, 2H), 1,24 (s, 1H), 0,87 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

Ejemplo 137: Síntesis del Compuesto 1046



[00394] El intermedio 1 (18 mg, 0,0204 mmol) se disolvió en 2 mL de DMF anhidra. Se añadieron 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-ilo (1,1 equiv., 0,0225 mmol, 7 mg) y DIPEA (2,5 μ L) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación se realizó mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/TFA al 0,1 %). Se realizó una segunda purificación mediante cromatografía HPLC de fase inversa (semipreparativa, C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 100 % ACN/agua). Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron de agua (9 mg, 41 %). MS calc. para $C_{55}H_{61}FN_9O_{13}$: 1074,44, observado: 1076,42, $[M+H]^+$. RMN ^1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8,62 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H), 8,50 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 8,29 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 8,05 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 7,99 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 7,78 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,28 – 7,14 (m, 5H), 6,99 (s, 2H), 6,52 (s, 1H), 5,64 – 5,56 (m, 1H), 5,42 (d, $J = 3,1$ Hz, 3H), 5,21 (s, 2H), 4,64 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 4,53 – 4,43 (m, 1H), 4,02 (d, $J = 1,7$ Hz, 2H), 3,74 (dd, $J = 16,8, 6,0$ Hz, 2H), 3,68 (d, $J = 16,3$ Hz, 2H), 3,59 – 3,44 (m, 4H), 3,27 – 3,06 (m, 2H), 3,02 (dd, $J = 13,9, 4,6$ Hz, 1H), 2,85 – 2,73 (m, 1H), 2,39 (d, $J = 1,8$ Hz, 2H), 2,32 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,18 – 2,13 (m, 2H), 2,10 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,86 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,24 (d, $J = 4,3$ Hz, 2H), 1,19 (t, $J = 3,5$ Hz, 1H), 1,03 (dt, $J = 9,1, 4,9$ Hz, 1H), 0,88 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 0,79 – 0,73 (m, 1H).

Ejemplo 138: Síntesis del Compuesto 1047



[00395] Intermedio 2. Se agregó morfolina (120 μ L) a la solución de intermedio 1 (1,0 equiv., 51 mg, 0,046 mmol) en DMF (1,8 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró en un rotavapor y se volvió a evaporar desde DMF hasta sequedad.

5 Se añadieron DMTMM (1,5 equiv., 19 mg, 0,069 mmol) y ácido 3-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etoxi)propanoico (1,5 equiv., 25 mg, 0,069 mmol) al residuo obtenido, seguido de la adición de DMF/agua (5:1, 1,75 ml) y diisopropiletilamina (1,6 equiv., 13 μ L, 0,074 mmol) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 60 % ACN/ NH₄OAc ac 10 mM), lo que ofreció el Intermedio 2 como un sólido blanco después de la liofilización (47 mg, 84 %). Cálculo MS para C₆₅H₆₉FN₉O₁₄: 1218,49, encontrado: 1218,35, [M+H]⁺.

10

[00396] Intermedio 3. Se agregó morfolina (125 μ L) a la solución de intermedio 2 (1,0 equiv., 47 mg, 0,038 mmol) en DMF (1,75 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró en un evaporador rotatorio y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50% ACN/ TFA al 0,1 % ac.), lo que ofrece el intermedio 3 como un sólido amarillo pálido después de la liofilización (27 mg, 64 %). Cálculo MS para C₅₀H₅₉FN₉O₁₂: 996,43, encontrado: 996,30, [M+H]⁺.

15

[00397] Intermedio 4. La solución del Intermedio 3 (1,0 equiv., 27 mg, 0,024 mmol), el Intermedio 5 (1,0 equiv., 7 mg, 0,024 mmol) y diisopropiletilamina (2,1 equiv., 9,5 μ L, 0,050 mmol) en DMF anhidro

(0,75 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, mientras la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) indicaba el consumo total del material de partida. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % de ACN/10 mM ac. NH₄OAc) dio el producto intermedio 4 como un sólido blanco después de la liofilización (20 mg, 73 %).

5 Cálculo MS para C₅₈H₆₉FN₉O₁₄: 1134,49, encontrado: 1134,35, [M+H]⁺.

[00398] Compuesto 1047. Se añadió una solución de peryodinano de Dess-Martin (1,3 equiv., 9,7 mg, 0,023 mmol) en acetonitrilo anhidro (2,5 ml) a la solución del intermedio 4 (1,0 equiv., 20 mg, 0,018 mmol) en DMF anhidro (1 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, hasta que la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) indicó el consumo total del material

10 de partida. La mezcla de reacción se concentró en un rotavapor y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa utilizando una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 → 60 % ACN/10 mM ac. NH₄OAc), lo que ofreció el compuesto 1047 como un sólido blanco después de la liofilización (15 mg, 74 %). MS calc. para C₅₈H₆₇FN₉O₁₄: 1132,48, observado: 1132,35, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,71 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,42 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H), 8,25 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,14 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,09 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,01 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 7,95 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,25 – 7,17 (m, 4H), 7,15 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,55 (q, *J* = 6,1 Hz, 1H), 5,49 – 5,37 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 4,59 – 4,41 (m, 3H), 3,77 – 3,65 (m, 5H), 3,64 – 3,53 (m, 4H), 3,46 (dd, *J* = 10,7, 5,9 Hz, 1H), 3,36 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,29 – 3,08 (m, 4H), 3,02 (dd, *J* = 14,0, 4,5 Hz, 1H), 2,81 – 2,66 (m, 2H), 2,43 – 2,35 (m, 5H), 2,31 y 2,28 (s, 3H), 2,21 – 2,07 (m, 3H), 1,94 – 1,78 (m, 2H),

15 1,61 – 1,46 (m, 2H), 1,03 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,87 (m, 4H), 0,81 – 0,72 (m, 1H).

20

Ejemplo 139: Síntesis del compuesto 3113:

[00399] El Compuesto 3113 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 34 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1025 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **5**. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,6.

Ejemplo 140: Síntesis del Compuesto 3053B

[00400] El Compuesto 3053B se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1007 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **1**. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,6.

Ejemplo 141: Síntesis del compuesto 3102

30 **[00401]** El Compuesto 3102 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1046 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **1**. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,7.

Ejemplo 142: Síntesis del compuesto 3103

[00402] El Compuesto 3103 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos

generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1047 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR basada en RP-HPLC fue 3,6.

Ejemplo 143: Síntesis del compuesto 3104

[00403] El Compuesto 3104 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 25 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1045 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,8.

Ejemplo 144: Síntesis del compuesto 3105

[00404] El Compuesto 3105 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1044 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR con base en RP-HPLC-MS fue de 7,6 con base en un peso molecular del fármaco de 1194,17.

Ejemplo 145: Síntesis del compuesto 3107

[00405] El Compuesto 3107 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 25 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1042 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,7.

Ejemplo 146: Síntesis del compuesto 3059B

[00406] El Compuesto 3059B se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1017 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 1. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,7.

Ejemplo 147: Síntesis del compuesto 3108

[00407] El Compuesto 3108 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 22 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1025 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 2. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,5.

Ejemplo 148: Síntesis del compuesto 3110

[00408] El Compuesto 3110 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1025 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 3. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,8.

Ejemplo 149: Síntesis del compuesto 3111

[00409] El Compuesto 3111 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1025 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR 4. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,6, mientras que la DAR basada en RPHPLC-MS fue 7,8.

Ejemplo 150: Síntesis del Compuesto 3109

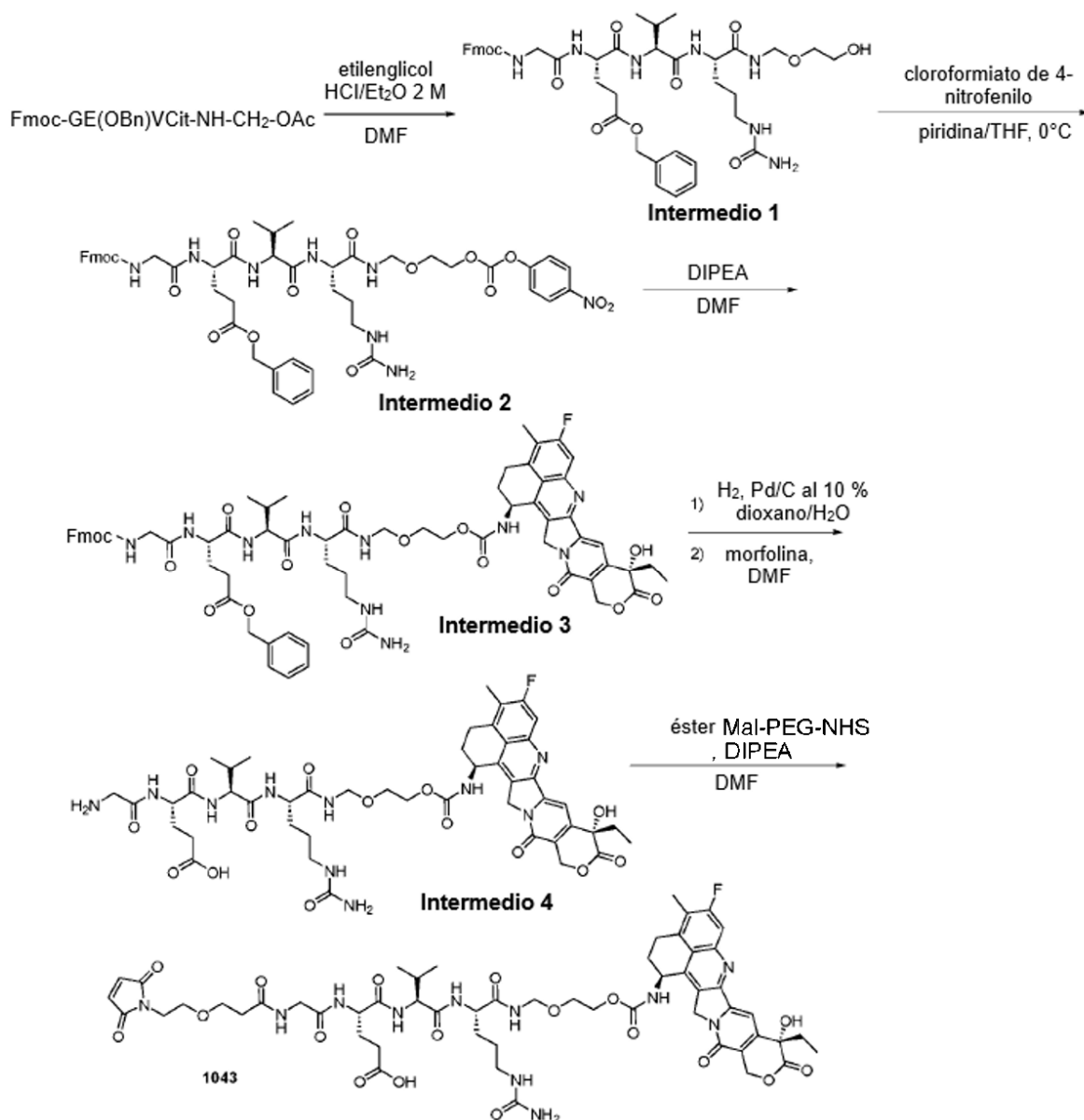
[00410] El Compuesto 3109 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos

generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1007 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **3**. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,7.

Ejemplo 151: Síntesis del compuesto 3112

[00411] El Compuesto 3112 se preparó de acuerdo con el Procedimiento C de la sección Métodos generales en el Ejemplo 1 con 30 equivalentes molares del compuesto de carga de enlazador 1007 a anticuerpo monoclonal IgG1 anti-EGFR **4**. La DAR basada en RP-HPLC fue 7,6, mientras que la DAR basada en RPHPLC-MS fue 7,8.

Ejemplo 152: Síntesis del compuesto 1043:



[00412] **Intermedio 1.** A la solución de Fmoc-GE(OBn)VCit-NH-CH₂-OAc (1,0 equiv., 220 mg, 0,260

mmol) y etilenglicol (3,0 equiv., 45 μ l, 0,782 mmol) en DMF anhidro (6 ml) se le añadió HCl 2 M/Et₂O (450 μ l) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 60 % ACN/HCl al 0,1 %), obteniéndose el intermedio 1 como un sólido blanco tras la liofilización (120 mg, 55 %). MS calc. para C₄₃H₅₆N₇O₁₁: 846,40, encontrado: 846,35, [M+H]⁺.

[00413] Intermedio 2. La solución de cloroformiato de 4-nitrofenilo (3,0 equiv., 86 mg, 0,426 mmol) en THF seco (1,5 ml) se añadió gota a gota a la solución helada del intermedio 1 (1,0 equiv., 120 mg, 0,142 mmol) en piridina seca (4 ml). La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 1 hora, hasta que el análisis por LC-MS indicó el consumo total del material de partida. Los disolventes se eliminaron en un rotavapor y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 75 % ACN/10 mM ac. NH₄OAc) para dar el intermedio 2 como un sólido amarillo pálido después de la liofilización (50 mg, 35 %). Cálculo MS para C₅₀H₅₉N₈O₁₅: 1011,41, encontrado: 1011,35, [M+H]⁺.

[00414] Intermedio 3. Se agregaron mesilato de exatecan (1,0 equiv., 0,049 mmol, 26 mg) y DIPEA (4,0 equiv., 0,049 mmol, 34 μ L) a la solución del intermedio 2 (1,0 equiv., 50 mg, 0,049 mmol) en DMF anhidra (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas, hasta que la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) indicó el consumo total del material de partida. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase reversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 75 % ACN/10 mM ac. NH₄OAc), lo que ofreció el intermedio 3 como un sólido blanco después de la liofilización (48 mg, 75 %). Cálculo MS para C₆₈H₇₆FN₁₀O₁₆: 1307,54, encontrado: 1307,55, [M+H]⁺.

[00415] Intermedio 4. A la solución del intermedio 3 (1,0 equiv., 48 mg, 0,036 mmol) en la mezcla de dioxano y agua (2:1, 2,5 ml) se añadió Pd/C 10 % (5 mg) y la mezcla de reacción se hidrogenó (globo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego la mezcla se filtró a través de la capa de celite, los sólidos se lavaron con DMF y el filtrado se evaporó a sequedad en un rotavapor. El residuo se disolvió en DMF (1,5 ml), seguido de la adición de morfolina (150 μ l). La solución obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/ NH₄OAc ac 10 mM) dio el intermedio 4 como un sólido blanco después de la liofilización (15 mg, 42 %). Cálculo MS para C₄₆H₆₀FN₁₀O₁₄: 995,43, encontrado: 995,35, [M+H]⁺.

[00416] Compuesto 1043. Se añadieron éster Mal-PEG-NHS (1,05 equiv., 0,016 mmol, 4,9 mg) y DIPEA (2,1 equiv., 0,032 mmol, 5,6 μ L) a la solución del intermedio 4 (1,0 equiv., 15 mg, 0,015 mmol) en DMF anhidra (1 ml). La solución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras LC-MS indicaba el consumo total del material de partida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con una columna semipreparativa (C18 modificado con diol, 0 $\rightarrow$ 50 % ACN/

NH₄OAc ac 10 mM), lo que ofreció 1043 como un sólido blanco después de la liofilización (12 mg, 67 %). MS calc. para C₅₅H₆₉FN₁₁O₁₈: 1190,48, observado: 1190,45, [M+H]⁺. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12,05 (s, 1H), 8,63 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 8,08 – 7,96 (m, 4H), 7,77 (t, *J* = 10,1 Hz, 2H), 7,31 (s, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 5,96 – 5,92 (m, 1H), 5,47 – 5,33 (m, 4H), 5,29 – 5,16 (m, 2H), 4,57 (ddd, *J* = 34,3, 10,5, 6,7 Hz, 2H), 4,33 (td, *J* = 8,1, 5,2 Hz, 1H), 4,24 – 4,07 (m, 4H), 3,78 – 3,63 (m, 2H), 3,62 – 3,51 (m, 6H), 3,46 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,30 – 3,18 (m, 1H), 3,18 – 3,03 (m, 1H), 3,01 – 2,86 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,32 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,28 – 2,10 (m, 4H), 2,03 – 1,79 (m, 4H), 1,78 – 1,66 (m, 1H), 1,66 – 1,55 (m, 1H), 1,56 – 1,44 (m, 1H), 1,45 – 1,23 (m, 2H), 0,87 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 0,82 (dd, *J* = 11,6, 6,7 Hz, 6H).

Ejemplo 153: Los conjugados anticuerpo-fármaco matan eficazmente las células cognadas que expresan HER2, TROP2 y EGFR

[00417] Para determinar la potencia relativa de destrucción celular de los ADC de la presente divulgación en comparación con un ADC similar (DXD), se realizaron ensayos de destrucción celular en múltiples líneas celulares que expresaban HER2, TROP2 y EGFR. Para probar los ADC anti-HER-2, se utilizaron las líneas celulares NCI-N87 y SK-BR-3. Para probar los ADC anti-TROP2, se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-468 y FaDu. Para probar los ADC anti-EGFR, se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-468 y HCC827, NCI-H292, FaDu y OVCAR3.

[00418] NCI-N87, MDA-MB-468, HCC827, NCI-H292 y OVCAR3 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado con 10 % v/v de FBS inactivado por calor (Corning), las células SK-BR-3 se mantuvieron en medio McCoy's 5A (Gibco, Life Technologies) suplementado con 10 % v/v de FBS inactivado por calor (Corning) a 37°C en una incubadora humidificada que contenía 5 % de CO₂. Las células FaDu se mantuvieron en medio EMEM (Gibco, Life Technologies) suplementado con 10 % v/v de FBS inactivado por calor (Corning) a 37° C en una incubadora humidificada que contenía 5 % de CO₂.

[00419] La viabilidad de las células cancerosas en presencia de ADC se midió en una serie de ensayos *in vitro*. Para las células que expresan HER2 y TROP2, las células se sembraron en placas blancas de fondo plano de 384 pocillos (Corning) a 0,5 × 10³ por pocillo en 30 µL de medio de cultivo. Para las células que expresan EGFR, se sembraron 2 × 10³ células por pocillo en 100 µL de medio de cultivo en placas blancas de fondo plano de 96 pocillos (Corning). Los ADC se agregaron en un rango de concentraciones como dilución serial de ocho puntos por cuadruplicado. Después de una incubación adicional durante 6 días a 37° C y 5 % de CO₂, se evaluó la viabilidad celular con el uso de un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega). La luminiscencia se midió utilizando el lector de placas SpectraMax iD3 (Molecular Devices). Los valores de luminiscencia se graficaron en función del logaritmo de la concentración de los compuestos de prueba, y la viabilidad celular se calculó dividiendo los valores de luminiscencia en diferentes concentraciones de conjugado de anticuerpo y

fármaco por los valores de luminiscencia en una concentración de anticuerpo de cero. Los valores IC50 de dosis-respuesta del ADC se calcularon mediante GraphPad Prism como valores de mejor ajuste utilizando un ajuste de curva de dosis-respuesta de cuatro parámetros, con un R cuadrado que va desde 0,97 a 0,999. Se promediaron los valores IC50 respectivos de dos a nueve experimentos independientes y se calcularon las medias respectivas y la desviación estándar respectiva entre experimentos independientes. Se promedió la viabilidad celular mínima respectiva de dos a nueve experimentos independientes y se calcularon la media respectiva y la desviación estándar respectiva entre experimentos independientes. Los valores medios de IC50 y el porcentaje medio de muerte celular calculados junto con las respectivas desviaciones estándar se muestran en las Tablas 7-9.

[00420] La Tabla 7A muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células NCI-N87 después de la exposición a los diferentes ADC anti-HER2 de la presente divulgación. La Tabla 7B se muestra la viabilidad porcentual de las células SK-BR-3 después de la exposición a los diferentes ADC anti-HER2 de esta divulgación. La Tabla 7C muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células NCI-N87 después de la exposición a los diversos ADC anti-HER2 de liberación de exatecan descritos en este documento. La Tabla 7D muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células SK-BR-3 después de la exposición a los varios ADC anti-HER2 con liberación de exatecan descritos en la presente. El valor de IC50 ADC (nM) se calculó en función de los pesos moleculares del anticuerpo monoclonal (mAb) y la carga activa del enlazador conjugados al mAb, donde el PM de ADC (g/mol) = PM mAb (g/mol) + DAR x PM carga activa del enlazador (g/mol). La carga útil del enlazador IC50 (nM) se calculó a partir de la concentración de la carga útil del enlazador suministrada por el ADC (calculada como DAR multiplicado por ADC (nM)).

Tabla 7A

ADC	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		Carga útil del enlazador IC50 (nM)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
3001	0,11	0,05	20,50	3,77	0,67	0,31	8,00
3002	0,10	0,05	16,00	4,08	0,39	0,20	3,70
3003	0,15	0,14	39,24	5,26	0,31	0,30	2,10
3004	0,11	0,04	26,04	5,61	0,47	0,19	4,40
3005	0,23	0,13	29,33	4,37	1,09	0,61	4,74
3007	0,14	0,05	21,02	4,05	0,68	0,26	4,88
3006	0,23	0,09	37,97	6,59	1,59	0,60	6,90
3008	0,24	0,05	24,64	5,79	1,64	0,31	6,70

3009	1,68	0,82	-12,56	26,21	12,56	6,14	7,50
3010	0,76	0,01	36,54	4,50	5,01	0,07	6,60
3012	0,24	0,09	42,73	7,27	0,61	0,23	~2,3
3013	0,14	0,05	15,36	3,43	0,94	0,31	6,60
3011	0,15	0,06	19,28	5,04	0,81	0,31	5,40
3015	0,12	0,04	15,26	2,60	0,60	0,18	5,00
3014	0,10	0,04	11,32	2,23	0,50	0,18	5,20
3016	1,27	1,54	47,44	13,19	8,91	10,81	7,50
3017	0,32	N/C	51,64	N/C	2,43	N/C	7,50
3018	0,67	0,16	45,33	0,06	5,88	1,38	7,50

Tabla 7B

ADC	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		Carga útil del enlazador IC50 (nM)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
3001	0,06	0,02	24,41	7,47	0,40	0,20	8,00
3002	0,04	0,02	17,22	5,76	0,13	0,06	3,70
3003	0,09	0,05	28,85	7,71	0,19	0,11	2,10
3004	0,04	0,01	19,14	8,69	0,17	0,05	4,40
3005	0,17	0,10	35,22	5,50	0,83	0,49	4,74
3007	0,04	0,01	19,51	5,97	0,22	0,05	4,88
3006	0,05	0,01	37,70	12,54	0,36	0,10	6,90
3008	0,07	0,03	33,35	11,73	0,45	0,23	6,70
3009	0,49	0,13	20,48	8,23	3,65	0,98	7,50
3013	0,47	0,26	24,70	9,54	3,11	1,73	6,60
3012	0,07	0,03	33,07	8,75	0,17	0,08	~2
3013	0,10	0,06	23,75	8,61	0,63	0,39	6,60
3011	0,10	0,05	26,20	7,02	0,53	0,26	5,40
3015	0,05	0,02	21,42	5,28	0,23	0,11	5,00
3014	0,05	0,03	19,24	6,47	0,25	0,14	5,20
3100	0,10	N/C	17,48	N/C	0,30	N/C	~3,6
3016	0,42	0,04	50,03	6,58	2,92	0,31	7,50
3017	0,26	0,05	40,07	2,68	1,95	0,36	7,50

3018	0,33	N/C	60,16	N/C	2,89	N/C	7,50
-------------	------	-----	-------	-----	------	-----	------

Tabla 7C

ADC	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		Carga útil del enlazador IC50 (nM)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
3019	0,33	0,13	45,97	7,17	2,29	0,87	6,90
3021	0,13	0,05	20,48	4,05	0,87	0,31	6,90
3022	0,29	0,03	56,17	7,84	2,00	0,20	7,40
3025	0,29	0,14	62,50	4,61	2,05	0,97	~7
3024	0,40	0,33	52,94	5,14	2,47	1,94	6,30
3020	0,13	0,02	27,75	4,84	0,81	0,15	7,40
3023	0,20	0,02	41,04	6,67	1,38	0,11	7,40
3026	0,28	0,10	33,50	3,02	2,54	0,92	7,50

Tabla 7D

ADC	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		Carga útil del enlazador IC50 (nM)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
3019	0,12	0,04	20,85	6,36	0,81	0,04	6,90
3021	0,03	0,01	15,02	7,24	0,20	0,06	6,90
3022	0,16	0,03	25,43	1,63	1,08	0,23	7,40
3025	0,14	0,07	48,05	12,76	1,01	0,48	~7
3024	0,15	0,06	33,72	7,83	0,94	0,40	6,30
3020	0,05	0,01	11,69	0,48	0,33	0,03	7,40
3023	0,06	0,01	15,11	1,02	0,41	0,06	7,40
3026	0,21	N/C	35,63	N/C	1,89	N/C	7,50

- 5 **[00421]** La Tabla 8A se muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células FaDu después de la exposición a los diferentes ADC anti-TROP2 de esta divulgación. La Tabla 8B se muestra el porcentaje de viabilidad de las células MDA-MB-468 después de la exposición a los diferentes ADC anti-TROP2 de esta divulgación. La Tabla 8C muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células FaDu después de la exposición a los varios ADC anti-TROP2 con liberación de exatecan descritos en la presente. La
- 10 Tabla 8D muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células MDA-MB-468 después de la

exposición a los varios ADC anti-TROP2 con liberación de exatecan descritos en la presente.

[00422] El valor de IC50 ADC (nM) se calculó en función de los pesos moleculares del anticuerpo monoclonal (mAb) y la carga activa del enlazador conjugados al mAb, donde el PM de ADC (g/mol) = PM mAb (g/mol) + DAR x PM carga activa del enlazador (g/mol). Se calculó el valor de IC50 de la carga de enlazador (nM) a partir de la concentración de carga de enlazador administrada por el ADC (qye se calcula como DAR multiplicada por ADC (nM)).

Tabla 8A

ADC	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		Carga útil del enlazador IC50 (nM)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
3027	0,09	0,05	3,54	2,63	0,70	0,35	7,4
3028A	0,03	0,01	1,61	2,07	0,15	0,04	4,21
3028B	0,01	0,01	0,55	0,23	0,11	0,04	7,50
3029A	0,16	0,04	2,08	1,01	0,19	0,04	1,20
3029B	0,07	0,01	1,62	1,26	0,30	0,10	4,40
3030	0,05	0,00	0,74	0,53	0,36	0,00	6,60
3031	0,09	0,00	1,40	0,56	0,55	0,01	6,20
3032	0,03	0,01	1,11	0,29	0,20	0,07	6,57
3033	0,10	0,01	1,15	0,83	0,45	0,07	4,50
3034	0,36	0,07	0,93	0,71	2,22	0,46	6,22
3035	0,56	0,30	0,52	1,55	3,56	1,88	6,30
3037	0,23	0,05	2,93	0,01	0,33	0,07	1,45
3036	0,06	0,02	1,16	0,66	0,35	0,16	6,34
3038	0,06	0,02	0,80	0,25	0,43	0,12	6,63
3040	0,04	0,00	0,56	0,33	0,21	0,01	4,75
3039	0,07	0,01	1,05	0,16	0,56	0,09	7,50
3101	0,07	0,01	2,64	0,80	0,20	0,04	~ 3,7
3041	7,97	1,05	2,77	6,78	58,15	7,68	7,50
3042	1,24	0,29	5,72	8,34	5,09	2,03	7,50
3043	0,37	0,13	51,04	18,72	3,03	1,12	7,50

Tabla 8B

ADC IC50 (nM)	Viabilidad celular	Carga útil del
---------------	--------------------	----------------

			mínima (%)		enlazador IC50 (nM)		
ADC	Media	DESVEST	Media	DESVEST	Media	DESVEST	DAR
3027	0,24	0,21	14,24	3,76	1,77	1,58	7,45
3028A	0,04	0,03	9,41	5,97	0,20	0,11	4,21
3028A	0,01	N/C	2,98	N/C	0,10	N/C	7,50
3029A	0,16	0,12	16,27	5,90	0,20	0,14	1,20
3029B	0,06	N/C	7,60	N/C	0,28	N/C	4,40
3030	0,07	0,01	13,20	4,38	0,45	0,08	6,60
3031	0,71	0,12	21,93	5,06	4,40	0,74	6,20
3032	0,04	0,01	12,29	2,06	0,30	0,08	6,57
3033	0,30	0,12	16,80	3,70	1,36	0,52	4,50
3034	2,28	1,88	12,16	0,60	14,19	11,71	6,22
3035	1,35	1,12	10,15	2,63	8,48	7,06	6,30
3037	0,52	0,59	36,17	14,02	0,75	0,85	1,45
3036	0,24	0,20	17,62	7,53	1,50	1,28	6,34
3038	0,34	0,19	19,42	8,43	2,27	1,29	6,63
3040	0,12	0,03	17,74	6,14	0,56	0,16	4,75
3039	0,25	0,00	14,32	4,12	1,89	0,03	7,50
3101	0,22	0,15	8,79	5,95	0,61	0,43	3,7
3041	3,20	0,00	1,59	9,56	23,39	0,01	7,50
3042	0,76	0,15	13,49	1,79	6,11	1,23	7,50
3043	2,68	2,72	79,42	5,25	22,22	22,56	7,50

Tabla 8C

	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		Carga útil del enlazador IC50 (nM)		
ADC	Media	DESVEST	Media	DESVEST	Media	DESVEST	DAR
3045	0,05	0,01	2,04	1,51	0,19	0,05	4,00
3046	0,30	0,09	5,70	1,82	1,80	0,54	6,5
3044	0,04	0,01	1,40	0,41	0,28	0,07	7,40
3047	0,06	0,01	0,93	0,90	0,45	0,10	7,40
3048	0,40	0,13	11,97	9,52	2,88	0,96	7,20

Tabla 8D

ADC	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		Carga útil del enlazador IC50 (nM)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
3045	0,10	0,03	17,60	16,53	0,40	0,11	4,00
3046	0,45	0,08	18,96	2,50	2,72	0,51	7,40
3044	0,18	0,03	12,46	1,15	4,50	2,15	7,40
3047	0,27	0,00	17,67	0,76	1,15	0,17	7,40
3048	0,62	0,30	23,09	9,35	1,89	0,03	7,20

[00423] La Tabla 9A se muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células MDA-MB-468 después de la exposición a los diferentes ADC anti-EGFR de esta divulgación. La Tabla 9B se muestra el porcentaje de viabilidad de las células HCC827 después de la exposición a los diferentes ADC anti-EGFR de esta divulgación. La Tabla 9C muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células MDA-MB-468 después de la exposición a los varios ADC anti-EGFR con liberación de exatecan descritos en la presente. La Tabla 9D muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células HCC827 después de la exposición a los varios ADC anti-EGFR con liberación de exatecan descritos en la presente. La Tabla 9E muestra el porcentaje de viabilidad celular de las líneas celulares NCI-H292, OVCAR3 y FaDu después de la exposición a los diferentes ADC anti-EGFR de la presente divulgación. El valor de IC50 (nM) de ADC se calculó en función de los pesos moleculares (PM) del anticuerpo monoclonal (mAb) y la carga activa del enlazador, donde el PM de ADC (g/mol) = PM mAb (g/mol) + DAR x PM carga activa del enlazador).

Tabla 9A

ADC	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
3049	0,08	0,26	7,19	12,65	7,8
3050	0,02	0,01	2,40	0,48	4,5
3051A	0,06	0,02	7,11	2,02	1,9
3051B	0,03	0,00	2,26	0,68	3,4
3052	0,03	0,01	2,14	0,42	6,6
3053A	0,10	0,02	6,19	0,99	3,5
3054	0,05	0,04	3,07	0,71	4,4

3055	0,08	0,01	4,74	0,53	7,3
3056	0,29	0,10	6,46	1,46	3,8
3057	0,30	0,11	3,07	1,61	6,0
3058A	0,08	0,03	7,98	2,88	7,1
3059A	0,09	0,04	8,64	1,74	6,4
3061	0,06	0,03	4,79	1,09	6,3
3060	0,14	0,07	5,87	3,70	7,8
3064	0,517	0,077	41,695	2,369	7,5
3062B	0,50	0,22	34,01	6,36	4,7
3062A	0,26	0,07	22,09	6,60	7,5
3063	0,10	0,02	9,84	1,24	7,5
3103	0,13	0,01	16,88	2,94	3,6
3107	0,06	0,01	4,99	0,42	7,7
3105	0,04	0,01	5,05	1,56	7,6
3104	0,02	0,01	2,26	0,98	7,8
3102	0,03	0,01	13,65	1,99	7,7
3053B	0,06	0,01	5,81	2,54	7,7
3110	0,41	0,11	24,72	4,48	7,7
3109	0,45	0,15	27,32	5,62	7,8
3111	0,14	0,01	26,53	6,19	7,8
3112	0,14	0,02	25,58	4,64	7,8
3108	0,15	N/C	7,93	N/C	7,5
3103	0,13	0,01	16,88	2,94	3,6
3113	0,05	0,01	18,5	6,32	7,6

Tabla 9B

	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
ADC					
3049	0,02	0,01	23,45	11,35	7,8
3050	0,04	0,01	34,94	5,56	4,5
3051A	0,12	0,04	34,26	16,16	1,9
3051B	0,11	0,05	17,34	2,54	3,4

3052	0,09	0,02	34,12	1,06	6,6
3053A	0,06	0,02	20,54	1,64	3,5
3054	0,05	0,02	39,79	14,50	4,4
3055	0,14	0,02	31,74	1,21	7,3
3056	0,14	0,03	16,63	2,29	3,8
3057	0,34	0,17	15,23	7,45	6,0
3058A	0,04	0,00	38,29	1,94	7,1
3059A	0,03	0,00	37,93	0,92	6,4
3061	0,06	0,01	39,17	1,86	6,3
3060	0,06	0,00	37,22	3,45	7,8
3064	0,476	0,202	37,710	4,936	7,5
3062B	13,06	22,27	35,48	23,01	4,7
3062A	3,76	3,79	38,71	8,92	7,5
3063	0,57	0,29	24,67	2,65	7,5

Tabla 9C

	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
ADC					
3065	0,08	0,01	7,15	0,44	7,4
3066	0,03	0,00	3,45	0,09	7,4
3067	0,09	0,02	8,79	0,77	7,4
3068	0,11	0,01	10,87	1,08	7,4
3070	0,22	0,00	16,74	0,25	7,5
3069	0,13	0,04	9,63	1,85	7

Tabla 9D

	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		DAR
	Media	DESVEST	Media	DESVEST	
ADC					
3065	0,04	0,02	22,33	3,02	7,4
3066	0,01	0,00	21,35	1,29	7,4
3067	0,11	0,09	22,90	4,46	7,4

3068	0,11	0,03	24,61	2,83	7,4
3070	0,01	0,00	29,68	0,62	7,5
3069	0,08	0,01	25,63	8,14	7

Tabla 9E

ADC	Línea celular	ADC IC50 (nM)		Viabilidad celular mínima (%)		DAR
		Media	DESVEST	Media	DESVEST	
3103	NCI-H292	0,39	N/C	43,43	N/C	3,6
3102	NCI-H292	0,47	0,02	28,06	13,19	7,7
3108	NCI-H292	10,16	1,78	59,29	12,26	7,5
3102	FaDu	0,03	N/C	28,41	N/C	7,7
3103	FaDu	0,14	N/C	20,04	N/C	3,6
3110	OVCAR-3	2,10	N/C	43,88	N/C	7,7
3109	OVCAR-3	9,52	N/C	23,70	N/C	7,8
3111	OVCAR-3	2,66	2,77	54,61	9,79	7,8
3112	OVCAR-3	2,06	1,44	50,75	6,81	7,8
3108	OVCAR-3	4,09	0,90	29,30	3,05	7,5

Ejemplo 154: Citotoxicidad (nmol/L) de cargas terapéuticas**5 Líneas celulares**

[00424] Las líneas de células tumorales humanas, SK-BR-3, NCI-H292, HT-29, MCF-7, NCI-N87 y FaDu se obtuvieron de ATCC. Se cultivaron células NCI-H292, HT-29, MCF-7, NCI-N87 MDA-MB-468 y HCC827 en medios RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies) complementados con FBS al 10 % v/v inactivado con calor (Corning), las células FaDu se mantuvieron en medios EMEM (Gibco, Life Technologies) complementados con FBS al 10 % v/v inactivado con calor (Corning) at 37°C en un incubador humidificado que contiene CO₂ al 5 %. Se mantuvieron las células SK-BR-3 en un medio McCoy's 5A (Gibco, Life Technologies) complementado con FBS al 10 % v/p inactivado con calor (Corning) a 37 °C en un incubador humidificado que contiene CO₂ al 5 %.

Preparación de compuestos

15 [00425] Para los compuestos 71, 72, 73, 74, 180, 193, 194, 195, 208 y 130, los compuestos liofilizados se disolvieron en DMSO seco al 100%, se congelaron alícuotas y se almacenaron a -80 °C. La

concentración de soluciones madre compuestas en DMSO se determinó mediante la plataforma RP-HPLC Agilent 1100 con detectores DAD 1200 y SoftA ELSD. La columna Shimadzu XR ODS de 3,0 mm x 30 mm y 2,2 μ m se calculó a 50 °C y 1,5 ml/min. Disolvente A: 0,1 % de ácido fórmico en agua; Disolvente B: 0,08 % de ácido fórmico en metanol. Gradiente: 5 % - 100 % de B durante 3,0 min; 100 % de disolvente B durante 0,3 min. La concentración de compuestos en DMSO al 100% determinada por ELS osciló entre 1 y 6 mM. Para los compuestos 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 y 205, los compuestos liofilizados se disolvieron en DMSO seco al 100%, se congelaron alícuotas y se almacenaron a -80°C. La concentración se calculó como P/V.

Ensayo de citotoxicidad

[00426] Se colocaron $2,0 \times 10^3$ células por pocillo en 100 μ L de medio de cultivo en placas fondo plano blancas de 96 pocillos (Corning). Como alternativa, se sembraron a $0,5 \times 10^3$ células por pocillo en 30 μ L de medio de cultivo en placas blancas de fondo plano de 384 pocillos (Corning). Después de una incubación de 24 horas, se agregaron los compuestos de prueba en una variedad de concentraciones como dilución seriada de diez puntos como duplicados o triplicados. Después de 6 días de incubación adicional a 37°C y CO₂ al 5 %, se evaluó la viabilidad celular con el uso de un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega). La luminiscencia se midió utilizando el instrumento GloMax (Promega). Los valores de luminiscencia se graficaron en función de la concentración logarítmica de los compuestos de prueba, y los valores de IC₅₀ se calcularon mediante GraphPad Prism 9 como valores de mejor ajuste utilizando un ajuste de curva dosis-respuesta de cuatro parámetros, con valores de R cuadrado que oscilaron entre 0,97 y 0,999. Para un subconjunto de cargas útiles, cada tratamiento se repitió independientemente dos a ocho veces y se promediaron los valores de IC₅₀.

[00427] La Tabla 10 muestra los valores de citotoxicidad IC₅₀ (nmol/L) de las cargas terapéuticas descritas en este documento para múltiples líneas de células tumorales. Se utilizaron tratamientos repetidos como dos a ocho experimentos independientes para determinar las medias de los valores de IC₅₀ y las desviaciones estándar (desviación estándar). La desviación estándar se muestra como (N/C) para el tratamiento realizado una vez.

Tabla 10

N.º comp.	SKBR3	HT29	NCI-H292	MCF7	NCI-N87	FaDu
DXD	1,6	6,3	3,7	2,7	4,1	1,4
Dev. est.	0,8	3,3	2,2	1,2	3,0	1,4
Exatecan	0,7	1,0	1,1	0,4	1,2	0,6
Dev. est.	0,4	0,8	0,9	0,2	0,7	0,2

71	14,6	78,8	32,9	56,9	49,2	8,4
Dev. est.	1,8	10,0	9,8	21,2	6,9	0,5
72	66,3	372,3	149,1	217,6	229,9	27,9
Dev. est.	49,5	52,2	20,7	110,5	98,6	11,8
73	14,0	77,8	35,5	38,1	43,5	8,3
Dev. est.	10,5	69,5	20,9	26,6	22,5	4,3
74	76,3	315,0	164,5	162,8	182,4	35,5
Dev. est.	72,3	206,1	64,6	67,1	145,2	18,8
180	24,6	95,6	30,7	46,5	81,5	12,6
Dev. est.	5,7	9,1	4,5	13,9	N/C	3,5
193	65,1	219,7	87,4	114,0	222,0	27,3
Dev. est.	4,6	25,7	0,2	39,2	28,9	0,1
194	30,1	114,1	34,3	51,7	94,9	13,6
Dev. est.	3,9	12,6	5,2	11,4	10,0	0,5
195	32,3	82,4	58,1	29,2	68,0	28,3
Dev. est.	3,7	8,3	3,6	4,4	6,0	1,6
208	11,6	28,1	16,7	9,0	25,6	11,1
Dev. est.	0,3	4,0	0,5	0,6	4,1	0,6
130	4,78	10,64	6,47	6,57	9,23	2,91
Dev. est.	1,56	3,88	0,12	1,85	1,06	0,74
177	0,86	1,36	0,61	1,00	1,18	0,39
Dev. est.	0,10	0,92	0,02	0,34	0,52	0,01
	SKBR3	NCI-H292	MDA-MB-468	FaDu		
196	8,9	5,1	3,7			
Dev. est.	1,6	0,3	1,2			
197	4,3	2,6	1,7			
Dev. est.	0,6	0,3	0,1			
198	1,4	0,7	0,5			
Dev. est.	0,1	N/C	0,1			
199	2,0	0,9	0,7			
Dev. est.	0,0	0,1	0,2			

200	2,2	0,9	0,7			
Dev. est.	0,3	N/C	0,4			
201	2,5	1,3	1,2			
Dev. est.	0,2	0,0	0,5			
202	129,1	79,6	70,8			
Dev. est.	13,7	3,3	13,1			
203	221,8	173,1	107,5			
Dev. est.	N/C	6,0	6,6			
204	76,3	61,0	22,7			
Dev. est.	8,0	3,8	8,5			
205	8,6	6,1	3,9			
Dev. est.	N/C	0,4	1,0			
206	4,8	4,8	1,6	1,5		
Dev. est.	1,3	0,6	N/C	N/C		
207	7,6	7,9	1,8	1,6		
Dev. est.	1,2	N/C	N/C	N/C		
209			1,24	0,37		
Dev. est.			N/C	N/C		
210			1,38	0,34		
Dev. est.			N/C	N/C		
211			1,34	0,42		
Dev. est.			N/C	N/C		

Ejemplo 155: Efecto de supresión del crecimiento tumoral en el carcinoma de pulmón humano NCI-H292 de los conjugados de anticuerpos anti-TROP2 3038, 3036 y 3031

- [00428]** La línea celular de carcinoma de pulmón humano NCI-H292 se adquirió de ATCC. Se
- 5 inocularon ratones lampiños atímicos (Jackson Labs NU/J # 2019), hembras, de 6-8 semanas de edad, por vía subcutánea en el flanco trasero con 5×10^6 células NCI-H292 suspendidas 1:1 con Matrigel en medio sin suero. Después de que el tamaño del tumor alcanzó entre ~100 y 200 mm³, los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos (5 animales por grupo, día 8). Se administró por vía intravenosa el conjugado fármaco y anticuerpo anti-TRO2 correspondiente en una dosis única de 3 mg/kg en la cola
- 10 de cada ratón (el inicio de la dosificación se indica como el día 0 en las figuras y las flechas indican el momento y la frecuencia de administración de la dosis). Al grupo de control se le administró solución

salina amortiguada con fosfato (PBS). Se graficó el volumen tumoral medio hasta la primera muerte por grupo o el fin del estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media. La FIG. 1A muestra el volumen tumoral medio en función del tiempo después del inicio de la administración del conjugado de anticuerpo-fármaco 3031 en comparación con el grupo de control del vehículo. En la Figura 1B se muestra el volumen tumoral medio en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3036. En la Figura 1C se muestra el volumen tumoral medio en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3038.

Ejemplo 156: Efecto de supresión del crecimiento tumoral en la línea celular de cáncer de garganta humano FaDu de los conjugados de anticuerpo anti-EGFR 3058A y 3053B

[00429] La línea celular de carcinoma de garganta humano FaDu se adquirió de la ATCC. Se inocularon ratones lampiños atímicos (Jackson Labs NU/J # 2019), hembras, de 6-8 semanas de edad, por vía subcutánea en el flanco trasero con 5×10^6 células NCI-H292 suspendidas 1:1 con Matrigel en medio sin suero. Después de que el tamaño del tumor alcanzó ~ 100 a 200 mm^3 , los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos (5 animales por grupo, día 10). Se administró por vía intravenosa el conjugado fármaco y anticuerpo anti-EGFR correspondiente en 3 dosis con una semana de separación de 3 mg/kg en la cola de cada ratón. (Se hace referencia al inicio de la dosificación como el día 0 en las figuras. las flechas indican el momento y la frecuencia de administración de la dosis). Al grupo de control se le administró solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se graficó el volumen tumoral medio hasta la primera muerte por grupo o el fin del estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media. En la Figura 2A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A, 5/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 2B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B, 5/5 ratones no presentaban tumores.

Ejemplo 157: Efecto de supresión del crecimiento tumoral en la línea celular de cáncer de pulmón humano NCI-H1975 de los conjugados de anticuerpo anti-EGFR 3058A, 3058B, 3102 y 3053B

[00430] La línea celular de carcinoma de pulmón humano NCI-H1975 se adquirió de ATCC. Se inocularon ratones lampiños atímicos (Jackson Labs NU/J # 2019), hembras, de 6-8 semanas de edad, por vía subcutánea en el flanco trasero con 5×10^6 células NCI-H1975 suspendidas 1:1 con Matrigel en medio sin suero. Después de que el tamaño del tumor alcanzó ~ 100 a 200 mm^3 , los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos (5 animales por grupo, día 15). Se administró por vía intravenosa el conjugado fármaco y anticuerpo anti-EGFR correspondiente en 3 dosis con una semana de separación de 10 mg/kg en la cola de cada ratón. (Se hace referencia al inicio de la dosificación como el día 0 en

las figuras. las flechas indican el momento y la frecuencia de administración de la dosis). Al grupo de control se le administró solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se graficó el volumen tumoral medio hasta la primera muerte por grupo o el fin del estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media. En la Figura 3A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A, 3/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 3B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058B en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058B, 1/5 ratones no presentaba tumores. En la Figura 3C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3102 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3102, 3/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 3D se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B, 2/5 ratones no presentaban tumores.

Ejemplo 158: Efecto de supresión del crecimiento tumoral en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 de los conjugados de anticuerpo anti-EGFR 3053B, 3058A y 3102

[00431] La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 se adquirió de Accegen. Se inocularon por vía subcutánea en el flanco trasero ratones NOD-SCID (Charles River Labs, código de cepa 394), hembras, de 6-8 semanas de edad, con 5×10^6 células MDA-MB-468 suspendidas en Matrigel al 10 % en medio sin suero. Después de que el tamaño del tumor alcanzó ~ 100 a 200 mm^3 , los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos (5 animales por grupo, día 12). Se administró por vía intravenosa el conjugado fármaco y anticuerpo anti-EGFR correspondiente en una dosis única de 3 mg/kg en la cola de cada ratón, Se hace referencia al inicio de la dosificación como el día 0 en las figuras y se indica con la flecha. Al grupo de control se le administró solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se graficó el volumen tumoral medio hasta la primera muerte por grupo o el fin del estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media. En la Figura 4A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B, 4/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 4B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A, 5/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 4C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3102 en comparación con

el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3102, 3/5 ratones no presentaban tumores.

Ejemplo 159: Efecto de supresión del crecimiento tumoral en la línea de cáncer de garganta humano FaDu de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-EGFR 3058A, 3102, 3059B, 3108, 3110 y 3053B

[00432] La línea celular de carcinoma de garganta humano FaDu se adquirió de la ATCC. Se inocularon por vía subcutánea en el flanco trasero ratones NOD-SCID (Charles River Labs, código de cepa 394), hembras, de 6-8 semanas de edad, con 5×10^6 células FaDu suspendidas en Matrigel al 10 % en medio sin suero. Después de que el tamaño del tumor alcanzó entre ~100 y 200 mm³, los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos (5 animales por grupo, día 9). Se administró por vía intravenosa el conjugado fármaco y anticuerpo anti-EGFR correspondiente en 3 dosis con una semana de separación de 1 mg/kg en la cola de cada ratón, Se hace referencia al inicio de la dosificación como el día 0 en las figuras. las flechas indican el momento y la frecuencia de administración de la dosis). Al grupo de control se le administró solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se graficó el volumen tumoral medio hasta la primera muerte por grupo o el fin del estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media. En la Figura 5A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A en comparación con el control de vehículo. En la Figura 5B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3102 en comparación con el control de vehículo. En la Figura 5C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3059B en comparación con el control de vehículo. En la Figura 5D se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3108 en comparación con el control de vehículo. En la Figura 5E se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3110 en comparación con el control de vehículo. En la Figura 5F se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B en comparación con el control de vehículo. Los compuestos ejemplificados en este documento exhiben una supresión tumoral mayor que el control.

Ejemplo 160: Efecto de supresión del crecimiento tumoral en un modelo de observador in vivo utilizando la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 co-inoculada con la línea celular de adenocarcinoma de colon humano SW620-luc de los conjugados de anticuerpo anti-EGFR 3058A, 3053B, 3102 y 3059B

[00433] La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 se adquirió de Accegen. Las células SW620-luc (luciferasa) se adquirieron de FenicsBIO. A ratones NOD-SCID (Charles River Labs, código

de cepa #394), hembras, de 6-8 semanas de edad, se les inoculó por vía subcutánea en el flanco trasero derecho con 5×10^6 células MDA-MB-468 y 5×10^6 células SW620-luc suspendidas en Matrigel al 10 % en medio sin suero. Se inocularon por vía subcutánea en el flanco trasero izquierdo con 5×10^6 células SW620-luc suspendidas en Matrigel al 10 % en medio sin suero. Después de que el tamaño del tumor de la pata trasera llegó a ~ 100 a 200 mm^3 , los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos (5 animales por grupo, día 9). Se administró por vía intravenosa el conjugado fármaco y anticuerpo anti-EGFR correspondiente en una dosis única de 3 mg/kg en la cola de cada ratón, Se hace referencia al inicio de la dosificación como el día 0 en las figuras y se indica con la flecha. Al grupo de control se le administró solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se midió el volumen tumoral medio con un calibre y se graficó hasta la primera muerte por grupo o el fin del estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media. Se realizaron imágenes bioluminiscentes una vez por semana desde el inicio de la dosificación. Cada ratón recibió 15 mg de luciferina VivoGlo (Promega) mediante inyección intraperitoneal y se obtuvieron imágenes mediante el sistema IVIS Lumina S5 (Perkin Elmer). La señal de bioluminiscencia se analizó mediante Living Image Software (Perkin Elmer) y se expresó en flujo total como número de fotones por segundo. En la Figura 6A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A, 5/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 6B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B, 4/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 6C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3102 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3102, 5/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 6D se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3059B en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3059B, 3/5 ratones no presentaban tumores.

[00434] En la Figura 7A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3058A en comparación con el control de vehículo. En la Figura 7B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3053B en comparación con el control de vehículo. En la Figura 7C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3102 en comparación con el control de vehículo. En la Figura 7D se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3059B en comparación con el control de vehículo.

Ejemplo 161: Efecto de supresión del crecimiento tumoral en la línea de cáncer de garganta humano FaDu de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-EGFR 3111, 3112, 3110 y 3109

[00435] La línea celular de carcinoma de garganta humano FaDu se adquirió de la ATCC. Se inocularon por vía subcutánea en el flanco trasero ratones NOD-SCID (Charles River Labs, código de cepa 394), hembras, de 6-8 semanas de edad, con 5×10^6 células FaDu suspendidas en Matrigel al 10 % en medio sin suero. Después de que el tamaño del tumor alcanzó entre ~ 100 y 200 mm^3 , los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos (5 animales por grupo, día 9). Se administró por vía intravenosa el conjugado fármaco y anticuerpo anti-EGFR correspondiente en un total de 1 o 3 dosis con una semana de separación de 10, 3 o 1 mg/kg en la cola de cada ratón, Se hace referencia al inicio de la dosificación como el día 0 en las figuras. las flechas indican el momento y la frecuencia de administración de la dosis). Al grupo de control se le administró solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se graficó el volumen tumoral medio hasta la primera muerte por grupo o el fin del estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media.

[00436] En la Figura 8A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3111 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3111, 5/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 8B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3112 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3112, 5/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 8C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3110 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3110, 4/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 8D se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3109 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3109, 4/5 ratones no presentaban tumores.

[00437] En la Figura 9A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3111 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3111, 4/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 9B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3112 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3112, 4/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 9C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3110 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3110, 2/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 9D se muestra el volumen

tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3109 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3109, 5/5 ratones no presentaban tumores.

[00438] En la Figura 10A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3111 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3111, 4/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 10B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3112 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3112, 3/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 10C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3110 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3110, 4/5 ratones no presentaban tumores. En la Figura 10D se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3109 en comparación con el control de vehículo. En el grupo de conjugado de fármaco y anticuerpo 3109, 3/5 ratones no presentaban tumores.

Ejemplo 162. Efecto de supresión del crecimiento tumoral en la línea de cáncer de mama humano MDA-MB-468 de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-EGFR 3111, 3112, 3110 y 3109

[00439] La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-468 se adquirió de Accegen. Se inocularon por vía subcutánea en el flanco trasero ratones NOD-SCID (Charles River Labs, código de cepa 394), hembras, de 6-8 semanas de edad, con 5×10^6 células MDA-MB-468 suspendidas en Matrigel al 10 % en medio sin suero. Después de que el tamaño del tumor alcanzó ~ 100 a 200 mm^3 , los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos (5 animales por grupo, día 20). Se administró por vía intravenosa el conjugado fármaco y anticuerpo anti-EGFR correspondiente en una dosis única de 3 mg/kg en la cola de cada ratón, Se hace referencia al inicio de la dosificación como el día 0 en las figuras y se indica con la flecha. Al grupo de control se le administró solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se graficó el volumen tumoral medio hasta la primera muerte por grupo o el fin del estudio. Las barras de error representan el error estándar de la media.

[00440] En la Figura 11A se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3111 en comparación con el control de vehículo. En la Figura 11B se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3112 en comparación con el control de vehículo. En la Figura 11C se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3110 en comparación con el control de vehículo. En la Figura 11D se muestra el volumen tumoral en función de tiempo después del inicio de la

administración de conjugado de fármaco y anticuerpo 3109 en comparación con el control de vehículo.

INCORPORACIÓN MEDIANTE REFERENCIA

[00441] Todas las publicaciones y patentes que se mencionan en la presente se incorporan en su totalidad a la presente mediante referencia, como si cada publicación o patente se incorporara mediante referencia de manera específica e independiente. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluidas las definiciones en esta.

EQUIVALENTES

[00442] Si bien se han discutido realizaciones específicas de invención, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones de la presente divulgación resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de esta memoria descriptiva. El alcance total de la descripción deberá determinarse en relación con las reivindicaciones, junto a su alcance completo de equivalentes, y la memoria descriptiva, junto a dichas variaciones.

[00443] A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, puntos de datos (por ejemplo, temperatura, ángulos, etc.) y demás utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos que se indican en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar de acuerdo con las propiedades deseadas que se busque obtener con la presente descripción.