

CONJUGADOS DE ENLACE AUTOESTABILIZANTES

1. REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la Solicitud Internacional Nro. PCT/CN2023/075152, presentada el 9 de febrero de 2023, cuya divulgación se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

2. CAMPO

En el presente documento se proporcionan plataformas de conjugados de fármaco–anticuerpo y conjugados de fármaco–anticuerpo (ADC) que comprenden las plataformas y un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, así como usos de las plataformas de ADC y los ADC.

3. ANTECEDENTES

El campo de los conjugados anticuerpo–fármaco (ADC) ha hecho un progreso significativo con el avance de muchos ADC en la clínica. El componente enlazador de los ADC es una característica importante en el desarrollo de agentes terapéuticos optimizados que sean altamente activos en dosis bien toleradas. El grupo funcional electrófilo maleimida ha demostrado ser útil en la preparación de ADC debido a su alto grado de especificidad para reaccionar con grupos tiol y la rápida cinética de adición de tiol en condiciones suaves.

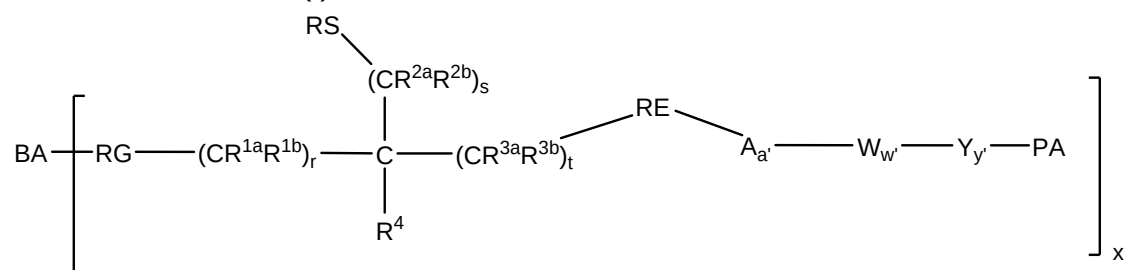
Como han observado varios investigadores en el campo de los bioconjugados, el producto tiosustituido de la reacción entre el grupo funcional electrófilo maleimida y un tiol libre de un anticuerpo está sujeto a una eliminación lenta, invirtiendo así la reacción.

Cuando esta reacción reversible ocurre en una preparación purificada de un ADC, la reacción es en gran medida indetectable porque la maleimida y el tiol que se regeneran mediante el proceso de eliminación simplemente reaccionan nuevamente, reformando así el conjugado intacto. Sin embargo, cuando están presentes otros tioles, el efecto neto puede ser la transferencia de la maleimida del anticuerpo del ADC a cualquier otro tiol disponible. Se ha documentado que este proceso ocurre en el plasma, en el que la maleimida de un ADC se transfiere a la cisteína 34 de la albúmina sérica (Alley *et al.*, Bioconjugate Chem. 2008, 19, 759–765). Este proceso también se ha informado cuando se incubaba un ADC en presencia de exceso de cisteína o glutatión (Jununtula *et al.*, Nature Biotech, 2012). La presente divulgación se dirige, entre otros, a bioconjugados que no sufren esta reacción de transferencia.

4. SÍNTESIS

En el presente documento se proporcionan plataformas de conjugados de anticuerpo–fármaco y conjugados de anticuerpo–fármaco (ADC). También se proporcionan en el presente documento usos de las plataformas de ADC para preparar ADC.

En algunas formas de realización, en el presente documento se proporcionan compuestos de ADC de Fórmula (I):

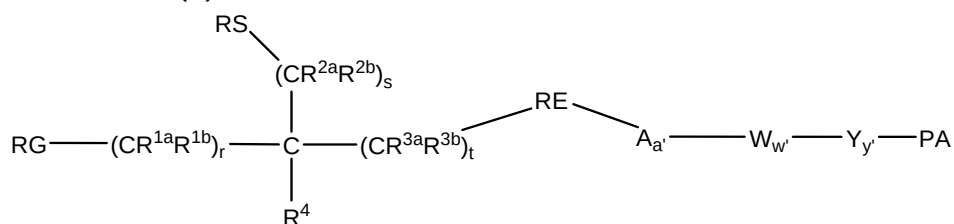


(I)

o una sal, tautómero, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los

misimos, en donde los valores para las variables (por ejemplo, BA, RG, RS, RE, PA, R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R⁴, A, W, Y, r, s, t, a', w', y', x) son como se describe en el presente documento.

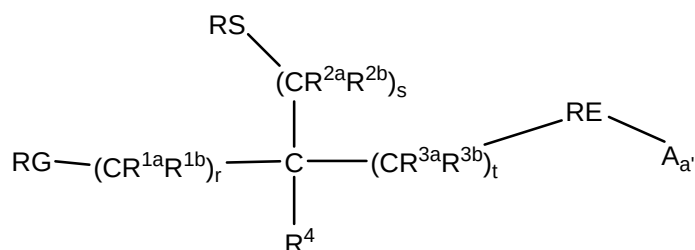
En algunas formas de realización, la plataforma es el compuesto de enlazador–carga útil de Fórmula (II):



(II)

o una sal, tautómero, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde los valores para las variables (por ejemplo, RG, RS, RE, PA, R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R⁴, A, W, Y, r, s, t, a', w', y') son como se describe en el presente documento.

En algunas formas de realización, la plataforma es un compuesto enlazador de Fórmula (III):



(III)

o una sal, tautómero, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde los valores para las variables (por ejemplo, RG, RS, RE, R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R⁴, A, r, s, t, a') son como se describe en el presente documento.

Otros objetos y ventajas se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte se entenderán a partir de la descripción, o se podrán aprender mediante la práctica. Los objetos y ventajas se concretarán y alcanzarán mediante los elementos y las combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son únicamente ejemplares y explicativas, y no limitan las reivindicaciones.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen parte de esta memoria descriptiva, ilustran formas de realización y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios aquí descritos.

5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A–1L representan curvas cinéticas de hidrólisis de maleimida (anillo abierto) del conjugado conjugador–anticuerpo.

Las Figuras 2A–2D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–3 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 3A–3D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–4 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 4A–4D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–6 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 5A–5D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo

3–7 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 6A–6D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–8 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 7A–7D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–9 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 8A–8D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–10 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 9A–9D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–11 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 10A–10D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–12 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 11A–11D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–13 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 12A–12D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–14 en tampón de pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH.

Las Figuras 13A–13B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–3 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 14A–14B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–4 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 15A–15B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–6 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 16A–16B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–7 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 17A–17D representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–8 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 18A–18B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–9 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 19A–19B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–10 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 20A–20B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–11 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 21A–21B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–12 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 22A–22B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–13 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 23A–23B representan datos de estabilidad del conjugado conjugador–anticuerpo 3–14 en tampón de histidina a pH 5,5 durante 168 h.

Las Figuras 24A–24D representan datos de estabilidad del ADC 4–6 en tampón GSH a pH 7,4 u 8,0.

Las Figuras 25A–25D representan datos de estabilidad del ADC 4–10 en tampón GSH a pH 7,4 u 8,0.

Las Figuras 26A–26D representan datos de estabilidad del ADC 4–11 en tampón GSH a pH 7,4 u 8,0.

Las Figuras 27A–27D representan datos de estabilidad del ADC 4–12 en tampón GSH a pH 7,4 u 8,0.

Las Figuras 28A–28D representan datos de estabilidad del ADC 4–13 en tampón GSH a pH 7,4 u 8,0.

Las Figuras 29A–29D representan datos de estabilidad del ADC 4–14 en tampón GSH a pH 7,4 u 8,0.

Las Figuras 30A–30D representan datos de estabilidad del ADC 4–16 en tampón GSH a pH 7,4 u 8,0.

Las Figuras 31A–31D representan datos de estabilidad del ADC 4–6 en tampón de formulación.

Las Figuras 32A–32D representan datos de estabilidad del ADC 4–10 en tampón de formulación.

Las Figuras 33A–33B representan datos de estabilidad del ADC 4–11 en tampón de formulación.

Las Figuras 34A–34B representan datos de estabilidad del ADC 4–12 en tampón de formulación.

Las Figuras 35A–35B representan datos de estabilidad del ADC 4–13 en tampón de formulación.

Las Figuras 36A–36B representan datos de estabilidad del ADC 4–14 en tampón de formulación.

Las Figuras 37A–37B representan datos de estabilidad del ADC 4–16 en tampón de formulación.

La Figura 38 representa la actividad de destrucción directa de ADC en una línea celular de alta expresión de B7H3 (H1650).

La Figura 39 representa la actividad de destrucción directa de ADC en una línea celular de baja expresión de B7H3 (Capan–1).

La Figura 40 representa la actividad de destrucción directa de ADC en una línea celular B7H3(–) (MB–453).

La Figura 41 representa la actividad de destrucción directa de ADC en una línea celular de alta expresión de B7H3 (H1650).

La Figura 42 representa la actividad de destrucción directa de ADC en una línea celular de baja expresión de B7H3 (Capan–1).

La Figura 43 representa la actividad de destrucción directa de ADC en una línea celular B7H3(–) (MB–453).

La Figura 44 es un gráfico de líneas que muestra la actividad antitumoral del ADC en un modelo H1650 de cáncer de pulmón.

La Figura 45 es un gráfico de líneas que muestra la actividad antitumoral del ADC dependiente de la dosis en un modelo H1650 de cáncer de pulmón.

La Figura 46 es un gráfico de líneas que muestra la tasa de liberación de carga útil de los ADC en plasma de ratón.

La Figura 47 es un gráfico de líneas que muestra la tasa de liberación de carga útil de los ADC en plasma humano.

La Figura 48 es un gráfico de líneas que muestra el perfil PK de los ADC.

6. DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se proporcionan conjugados de fármaco–anticuerpo (ADC) y enlazadores covalentes y cargas útiles enlazadoras (plataformas) para producir ADC. Los ADC se pueden usar para tratar una enfermedad o trastorno, tal como cáncer,

proporcionando una composición que comprende un ADC. Los ADC actualmente divulgados son más estables que los ADC conocidos.

Se sabe que algunos ADC, tales como aquellos que usan conjugación de cisteína entre cadenas con una carga útil enlazadora basada en maleimida, sufren desconjugación en condiciones fisiológicas debido a una reacción retro–maleimida. Los ADC que emplean maleimidas autohidrolizantes han mostrado una estabilidad y propiedades farmacológicas mejoradas. En un ejemplo, el conjugado conjugador–anticuerpo 3–3 (ver la Tabla 3 a continuación) se sometió a hidrólisis de maleimida a pH 9,0 en uno a tres días. Sin embargo, en condiciones tan duras, pueden producirse modificaciones postraduccionales (por ejemplo, oxidación) y desaminación en algunos anticuerpos, lo que puede dar lugar a cambios en las propiedades físicas, como la hidrofobicidad, la carga, y la estructura secundaria y/o terciaria, y puede reducir el despliegue de la barrera termodinámica o cinética. Dichos cambios pueden predisponer a un ADC a la agregación y otras modificaciones químicas, que pueden alterar la afinidad de unión, la vida media y la eficacia del ADC.

Los conjugados conjugador–anticuerpo aquí divulgados pueden sufrir fácilmente hidrólisis de maleimida en condiciones suaves (por ejemplo, pH 7,0). Los conjugadores actualmente divulgados no solo se conjugan con un anticuerpo en condiciones convencionales (por ejemplo, pH 6,5–7,0) sino que también puede ocurrir hidrólisis de maleimida en condiciones de conjugación. No se requiere el intercambio de tampón a un tampón básico para la hidrólisis. Agregar un reactivo de extinción puede ser suficiente para detener la reacción de conjugación. Los conjugados actualmente divulgados pueden someterse a intercambio de tampón al tampón de formulación después de que se completa la hidrólisis de maleimida mediante monitoreo a través de LCMS reducida.

6.1. Definiciones

En la presente divulgación, los siguientes términos poseen los significados indicados a continuación, salvo que se indique lo contrario. Salvo que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos que se utilizan en la presente poseen el mismo significado tal y como normalmente lo entendería un conocedor de la materia frente a la presente divulgación. En el caso que exista más de un concepto para el término indicado en la presente y salvo indicación en contrario, las siguientes Definiciones prevalecerán.

El término "anticuerpo" en la presente divulgación es utilizado en su sentido más amplio y, en especial, para definir a los anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y anticuerpos fragmentados que muestran la actividad biológica deseada. Un anticuerpo intacto está compuesto principalmente por dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable se une a e interactúa con un antígeno específico. La región variable incluye una región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que reconoce y se une a un punto de unión específico de un antígeno en particular. La región constante puede ser reconocida por el sistema inmunitario e interactuar con el (ver, por ejemplo, Janeway et al., 2001, Inmunobiología, 5ta edición, Editorial Garland, New York). Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, y IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, y IgA2) o subclase. Los anticuerpos pueden proceder de cualquier especie conveniente. En algunas formas de realización, el anticuerpo es de origen humano o murino. Un anticuerpo puede ser, por

ejemplo, humano, humanizado o quimérico.

Los términos "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento refiere a un anticuerpo extraído de una población de anticuerpos considerablemente homogéneos, es decir, cada uno de los anticuerpos que comprende la población son idénticos, a excepción de las mutaciones naturales que ocurren en menor proporción. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y atacan un único sitio antigénico. El modificador "monoclonal" no debe ser interpretado como la producción del anticuerpo obtenida a partir de un método en particular.

Un "anticuerpo intacto" es el que comprende una región variable de unión al antígeno junto a un dominio constante de la cadena liviana (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2, CH3 y CH4, según sea la clase de anticuerpo. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia lineal (por ejemplo, dominios constantes de secuencia de origen humano) o una variante en la secuencia de aminoácidos proveniente de allí.

Un "fragmento de anticuerpo" se compone de una porción de un anticuerpo intacto, que comprende la unión al antígeno o una región variable de la cadena. Se incluyen como ejemplos de fragmento de anticuerpos a los Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmento Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, scFv, scFv-Fc, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo(s), fragmento(s) a partir de una colección de expresiones Fab, o un fragmento de unión al epítipo de cualquiera de las mencionadas que se una de manera inmunitaria a un antígeno específico (por ejemplo, un antígeno de una célula cancerosa, un antígeno viral o un antígeno microbiano).

Un "antígeno" es una entidad a la que un anticuerpo se une específicamente.

Los términos "unión específica" y "especialmente unida" refieren a que el anticuerpo o el anticuerpo derivado se unirá, de forma altamente selectiva, a su antígeno blanco correspondiente y no a cualquier otro antígeno de la masa. Generalmente, el anticuerpo o el anticuerpo derivado se une con una afinidad de al menos alrededor de 1×10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, o 10^{-12} M y se une al antígeno predeterminado con una afinidad de al menos dos veces más que la afinidad de unión al antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) además del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

El término "inhibir" o "inhibición de" significa reducir a una cantidad medible o limitar por completo.

Los términos "cantidad terapéuticamente efectiva" indica la cantidad efectiva de fármaco para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en mamíferos. En el caso del tratamiento contra el cáncer, la cantidad de fármaco terapéuticamente efectiva podría disminuir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor, inhibir (es decir, disminuir en parte o detener) la infiltración de células cancerosas dentro de los órganos periféricos, inhibir (es decir, disminuir en parte o detener) la metástasis de un tumor; inhibir, en parte, el crecimiento de un tumor y/o aliviar, en parte, uno o más síntomas asociados al cáncer. Dependiendo de si el fármaco inhibe el crecimiento y/o elimina las células cancerosas podrá ser considerado citostático o citotóxico. En el tratamiento contra el cáncer, la eficacia podrá ser medida, por ejemplo, en función del tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP) y/o determinada por el índice de respuesta (RR, por sus siglas en inglés).

El término "considerable" o "considerablemente" refiere a la mayoría, es decir, >50% de una población, de una mezcla o de una muestra, tales como los mayores a 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de una población.

Los términos "clivado intracelularmente" o "clivaje intracelular" refieren al proceso metabólico o a la reacción dentro de una célula en un ligando conjugado a fármaco (es decir, un anticuerpo conjugado a fármaco, ACF), donde la unión covalente, por ejemplo, el enlace entre la porción del fármaco (C) y la unidad del ligando (por ejemplo, el anticuerpo BA o Ab) se rompe y resulta en la liberación del fármaco o en otro metabolito del conjugado disociado del anticuerpo dentro de la célula. Las porciones clivadas del fármaco enlazado al ligando conjugado son, entonces, metabolitos intracelulares.

Los términos "actividad citotóxica" refiere a la muerte celular, un efecto de la unión del ligando al fármaco citostático o antiproliferador del compuesto conjugado o un metabolito intracelular del fármaco enlazado al ligando conjugado. La actividad citotóxica puede ser expresada como el valor IC50, que es la concentración (molar o masa) por unidad de volumen en la que la mitad de las células sobreviven.

El término "agente citotóxico" tal como se usa en el presente documento refiere a la sustancia que inhibe la función celular y/o causa la destrucción de las células. Este término tiene la finalidad de incluir a los isótopos radioactivos (es decir, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ⁶⁰Co e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como las toxinas moleculares pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, animal, incluso los análogos sintéticos y derivados de este.

Los términos "cáncer" y "canceroso" refieren o describen a la condición fisiológica o trastorno en mamíferos que se caracteriza comúnmente por un crecimiento irregular de la célula. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque no a modo de limitación, al carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o linfomas malignos. Otros ejemplos de estos tipos de cáncer son el cáncer de células escamosas (es decir, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye el carcinoma microcítico de pulmón y el carcinoma pulmonar amicrocítico ("NSCLC", por sus siglas en inglés), adenocarcinoma pulmonar y el carcinoma epidermoide pulmonar, el cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, gástrico o cáncer de estómago que incluye el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mamas, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vaginal, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene y, también, cáncer de cabeza y cuello.

En la presente divulgación, una "enfermedad autoinmune" es una enfermedad o trastorno que surge y se dirige contra los propios tejidos o proteínas de una persona.

Se incluyen los siguientes ejemplos de "paciente", aunque no a modo de limitación: mamíferos tales como el ser humano, rata, ratón, cobayo, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro o gato y aves o aves de corral. En una forma de realización, el paciente es un ser humano.

Los términos "tratar" o "tratamiento", salvo indicación en contrario por contexto, se refieren

al tratamiento terapéutico y a las medidas profilácticas para prevenir una recaída, en donde el objetivo es inhibir o desacelerar (disminuir) un cambio fisiológico no deseado o trastorno, tales como el desarrollo o propagación del cáncer. A los efectos de la presente divulgación, se incluyen los siguientes resultados clínicos beneficiosos o deseados, aunque no a modo de limitación: alivio de síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estable (es decir, que no empeora), retraso o enlentecimiento del avance de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquéllas personas que necesitan tratamiento incluyen a las que ya padecen la enfermedad o trastorno, así como también a aquéllas propensas a padecerlas. En el contexto del cáncer, en el término "tratamiento" se incluye toda inhibición del crecimiento de células tumorales, células cancerígenas o de un tumor, la inhibición de la réplica de células tumorales o células cancerígenas, la disminución de toda carga tumoral o disminución del número de células cancerígenas y la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

En el contexto de una enfermedad autoinmune, en el término "tratamiento" se incluye toda inhibición de réplicas de células asociadas con un estado de enfermedad autoinmune, en la cual se incluyen, aunque no a modo de limitación, células que producen un anticuerpo autoinmune, que disminuyen la carga de anticuerpos autoinmunes y que mejoran uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.

Tal como se usa en el presente documento, en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones que acompañan, el artículo indefinido "un" y el artículo definido "los" incluyen el plural, así como también referentes singulares, salvo clara indicación en contrario del contexto.

Tal como se usa en el presente documento, salvo especificación en contrario, los términos "alrededor de" y "aproximadamente", cuando son utilizados en relación con cantidades o porcentaje peso de ingredientes de un compuesto, significan una cantidad o un porcentaje peso que es reconocido por un experto en la técnica para proporcionar un efecto farmacológico equivalente a aquél que se obtiene de una cantidad especificada o porcentaje peso. En ciertas formas de realización, los términos "alrededor de" y "aproximadamente", cuando son utilizados en este contexto, contemplan una cantidad o porcentaje peso dentro del 30%, del 20%, del 15%, del 10% o del 5% de la cantidad especificada o porcentaje peso.

Tal como se usa en el presente documento, salvo especificación en contrario, los términos "alrededor de" y "aproximadamente", cuando son utilizados en relación con un valor numérico o rango de valores que es proporcionado para caracterizar una forma sólida particular, por ejemplo, una temperatura específica o rango de temperatura, tales como, por ejemplo, que describa disolución, deshidratación, desolvatación o temperatura de transición vítrea, un cambio de masa, tales como, por ejemplo, un cambio de masa como función de temperatura o humedad, un solvente o contenido de agua, en términos de, por ejemplo, masa o porcentaje o la posición máxima, tales como, por ejemplo, en análisis por espectroscopía infrarroja o espectroscopía Raman o difracción de rayos X en polvos, indican que el valor o rango de valores podrán desviarse hasta un alcance que se considera razonable para el experto en la técnica mientras aún se describe la forma sólida. Se incluyen

en las técnicas para la caracterización de estructuras cristalinas y sólidos amorfos los siguientes ejemplos, aunque no a modo de limitación: análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés), calorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés), difracción de rayos X en polvos (XRPD, por sus siglas en inglés), difractometría de rayos X de cristal único, espectroscopía vibracional, por ejemplo, infrarroja (IR, por sus siglas en inglés) y espectroscopía Raman, espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido y en disolución (RMN), microscopía óptica, microscopía óptica con platina caliente, microscopía electrónica de barrido (MEB), cristalografía electrónica y análisis cuantitativo, análisis de tamaño de partículas (PSA, por sus siglas en inglés), análisis de superficies, pruebas de solubilidad y pruebas de disolución. En ciertas formas de realización, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando son utilizados en este contexto, indican que el valor numérico o rango de valores podrán variar dentro del 30%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5% o del 0,25% del valor enumerado o rango de valores. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, el valor de la posición máxima de la difracción de rayos X en polvos podrá variar hasta $\pm 0,2^\circ 2\theta$ mientras aún se describe la posición máxima particular de dicha difracción.

Un grupo “alquilo” es una cadena recta saturada, parcialmente saturada o insaturada o un hidrocarburo acíclico ramificado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, generalmente de 1 a 8 carbonos o, en ciertas formas de realización, de 1 a 6, de 1 a 4 o de 2 a 6 átomos de carbono. Se incluyen en los grupos alquilo típicos: –metilo, –etilo, –n–propilo, –n–butilo, –n–pentilo y n–hexilo; se incluyen en los alquilos ramificados saturados: –isopropilo, –sec–butilo, –isobutilo, –ter–butilo, –isopentilo, 2–metilpentano, 3–metilpentano, 4–metilpentano, 2,3–dimetilbutano y demás. Se incluyen los siguientes ejemplos de grupos alquilo insaturados, aunque no a modo de limitación: vinilo, alilo, $\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_3)$, $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_3)$ y $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, entre otros. Un grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. En ciertas formas de realización, cuando los grupos alquilo que se describen en el presente documento se dicen “sustituyentes”, podrán ser sustituidos con cualquier sustituyente que se encuentren en los compuestos y formas de realización que se divulgan en el presente documento, así como también los halógenos (cloro, yodo, bromo o flúor), hidroxilo, alcoxi, alcoxialquilo, amino alquilamino, carboxi, nitro, ciano, tiol, tioéter, imina, imida, amidina, guanidina, enamina, aminocarbonilo, acilamino, fosfonato, fosfano, tiocarbonilo, sulfonilo, sulfona, sulfonamida, cetona, aldehído, éster, urea, uretano, oxima, hidroxilamina, alcoxiamina, aralcoxiamina, nitróxido, hidracina, hidrazona, azida, isocianato, isotiocianato, cianato, tiocianato, $\text{B}(\text{OH})_2$ u $\text{O}(\text{alquilo})\text{aminocarbonilo}$.

Un grupo “alquenilo” es una cadena recta o un hidrocarburo acíclico ramificado que contiene de 2 a 10 átomos de carbono, generalmente de 2 a 8 átomos de carbono e incluye al menos un doble enlace carbono–carbono. Se incluyen los siguientes ejemplos de cadenas rectas típicas y alquencilos ramificados ($\text{C}_2\text{--C}_8$): –vinilo, –alilo, –1–butenilo, –2–butenilo, –isobutileno, –1–pentenilo, –2–pentenilo, –3–metilo–1–butenilo, –2–metilo–2–butenilo, –2,3–dimetilo–2–butenilo, –1–hexenilo, 2–hexenilo, –3–hexenilo, –1–heptenilo, –2–heptenilo, –3–heptenilo, –1–octenilo, –2–octenilo, 3–octenilo y demás. El doble enlace de un grupo alquenilo puede estar no conjugado o conjugado con otro grupo insaturado. Un grupo alquenilo puede estar sustituido o no sustituido.

Un grupo “cicloalquilo” es un grupo alquilo cíclico saturado o parcialmente saturado de 3 a

10 átomos de carbono que tiene un anillo cíclico único o múltiples anillos condensados o puenteados que pueden estar opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos alquilo. En algunas formas de realización, el grupo cicloalquilo tiene de 3 a 8 miembros anulares, mientras que en otras formas de realización el número de átomos de carbono anulares oscila de 3 a 5, de 3 a 6, o de 3 a 7. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras anulares simples tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, 1-metilciclopropilo, 2-metilciclopentilo, 2-metilciclooctilo, y similares, o estructuras anulares múltiples o puenteadas tales como adamantilo y similares. Los ejemplos de grupos cicloalquilo insaturados incluyen ciclohexenilo, ciclopentenilo, ciclohexadienilo, butadienilo, pentadienilo y hexadienilo, entre otros. Un grupo cicloalquilo puede estar sustituido o insustituido. Dichos grupos cicloalquilo sustituidos incluyen, a modo de ejemplo, ciclohexanona y similares.

Un grupo “arilo” es un grupo carbocíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, naftilo o antrilo). En algunas formas de realización, los grupos arilo contienen de 6 a 14 carbonos, y en otras de 6 a 12, o incluso de 6 a 10 átomos de carbono en las porciones anulares de los grupos. Los arilos particulares incluyen fenilo, bifenilo, naftilo y similares. Un grupo arilo puede estar sustituido o insustituido. La frase “grupos arilo” también incluye grupos que contienen anillos fusionados, tales como sistemas anulares aromático-alifático fusionados (por ejemplo, indanilo, tetrahidronaftilo y similares).

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

Un “heterociclilo” es un cicloalquilo aromático (también denominado heteroarilo) o no aromático en el cual de 1 a 4 de los átomos de carbono anulares están independientemente reemplazados con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. En algunas formas de realización, los grupos heterociclilo incluyen de 3 a 10 miembros anulares, mientras que otros de dichos grupos tienen de 3 a 5, de 3 a 6, o de 3 a 8 miembros anulares. Los heterociclilos también pueden estar unidos a otros grupos en cualquier átomo anular (es decir, en cualquier átomo de carbono o heteroátomo del anillo heterocíclico). Un grupo heterociclilo puede estar sustituido o insustituido. Los grupos heterociclilo abarcan sistemas anulares insaturados, parcialmente saturados y saturados, tales como, por ejemplo, grupos

imidazolilo, imidazolinilo e imidazolidinilo. El término “heterociclilo” incluye especies anulares fusionadas, que incluyen aquellas que comprenden grupos aromáticos y no aromáticos fusionados, tales como, por ejemplo, benzotriazolilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxinilo y benzo[1,3]dioxolilo. El término también incluye sistemas anulares policíclicos puenteados que contienen un heteroátomo tales como, aunque sin limitación, quinuclidilo. Los ejemplos representativos de un grupo heterociclilo incluyen, aunque no a modo de limitación, grupos aziridinilo, azetidino, pirrolidilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrofuranilo, dioxolilo, furanilo, tiofenilo, pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, pirazolilo, pirazolinilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiazolinilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tetrahidropiranilo (por ejemplo, tetrahidro-2H-piranilo), tetrahidrotiopiranilo, oxatiano, dioxilo, ditiano, piranilo, piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, triazinilo, dihidropiridilo, dihidroditiinilo, dihidroditionilo, homopiperazinilo, quinuclidilo, indolilo, indolinilo, isoindolilo, azaindolilo (pirrolopiridilo), indazolilo, indolizino, benzotriazolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxadiazolilo, benzoxazinilo, benzoditiinilo, benzoxatiinilo, benzotiazinilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[1,3]dioxolilo, pirazolopiridilo, imidazopiridilo (azabencimidazolilo, por ejemplo, 1H-imidazo[4,5-b]piridilo, o 1H-imidazo[4,5-b]piridin-2(3H)-onilo), triazolopiridilo, isoxazolopiridilo, purinilo, xantinilo, adeninilo, guaninilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinolizino, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, pteridinilo, tianaftalenilo, dihidrobenzotiazinilo, dihidrobenzofuranilo, dihidroindolilo, dihidrobenzodioxinilo, tetrahidroindolilo, tetrahidroindazolilo, tetrahidrobencimidazolilo, tetrahidrobenzotriazolilo, tetrahidropirrolopiridilo, tetrahidropirazolopiridilo, tetrahidroimidazopiridilo, tetrahidrotriazolopiridilo, y tetrahidroquinolinilo. Los grupos heterociclilo sustituidos representativos pueden estar mono-sustituidos o sustituidos más de una vez, tales como, aunque sin limitación, grupos piridilo o morfolinilo, que están 2-, 3-, 4-, 5- o 6-sustituidos, o disustituidos con diversos sustituyentes tales como aquellos enumerados a continuación.

Un grupo “cicloalquilalquilo” es un radical de fórmula –alquil–cicloalquilo, en donde alquilo y cicloalquilo se definen anteriormente. Los grupos cicloalquilalquilo sustituidos pueden estar sustituidos en la porción alquilo, la porción cicloalquilo, o tanto en la porción alquilo como en la porción cicloalquilo del grupo. Los grupos cicloalquilalquilo representativos incluyen, aunque no a modo de limitación, ciclopentilmetilo, ciclopentiletilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo y ciclohexilpropilo. Los grupos cicloalquilalquilo sustituido representativos pueden estar mono-sustituidos o sustituidos más de una vez.

Un grupo “aralquilo” es un radical de fórmula –alquil–arilo, en donde alquilo y arilo se definieron anteriormente. Los grupos aralquilo sustituidos pueden estar sustituidos en las porciones alquilo, arilo, o tanto alquilo como arilo del grupo. Los grupos aralquilo representativos incluyen, aunque no a modo de limitación, grupos bencilo y fenetilo y grupos (cicloalquilaril)alquilo fusionados tales como 4-etil-indanilo.

Un grupo “heterociclilalquilo” es un radical de fórmula –alquil–heterociclilo, en donde alquilo y heterociclilo se definieron anteriormente. Los grupos heterociclilalquilo sustituidos pueden estar sustituidos en las porciones alquilo, heterociclilo, o tanto alquilo como heterociclilo del grupo. Los grupos heterociclilalquilo representativos incluyen, aunque no a modo de limitación, 4-etil-morfolinilo, 4-propilmorfolinilo, furan-2-il metilo, furan-3-il metilo, piridin-

3-il metilo, (tetrahidro-2H-piran-4-il)metilo, (tetrahidro-2H-piran-4-il)etilo, tetrahidrofuran-2-il metilo, tetrahidrofuran-2-il etilo e indol-2-il propilo.

Un “halógeno” es cloro, iodo, bromo o fluoro.

Un grupo “hidroxialquilo” es un grupo alquilo como se describió antes sustituido con uno o más grupos hidroxilo.

Un grupo “alcoxi” es O(alquilo), en donde alquilo se definió anteriormente.

Un grupo “alcoxialquilo” es (alquil)O(alquilo), en donde alquilo se definió anteriormente.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, “arilalquilo” se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto alquilo, en donde el compuesto alquilo está sustituido con un sustituyente aromático, es decir, el compuesto aromático incluye un enlace simple a un grupo alquilo y en donde el radical se ubica en el grupo alquilo. Un grupo arilalquilo se enlaza con la estructura química ilustrada a través del grupo alquilo. Un arilalquilo puede estar representado por la estructura, por ejemplo, $B-CH_2-$, $B-CH_2-CH_2-$, $B-CH_2-CH_2-CH_2-$, $B-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $B-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-$, $B-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$, en donde B es un resto aromático, por ejemplo, fenilo. El arilalquilo está opcionalmente sustituido, es decir, el grupo arilo y/o el grupo alquilo puede estar sustituido como se divulga en el presente documento. Los ejemplos de arilalquilo incluyen, aunque no a modo de limitación, bencilo.

Tal como se usa en el presente documento, “alquilarilo” se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto arilo, en donde el compuesto arilo está sustituido con un sustituyente alquilo, es decir, el compuesto arilo incluye un enlace simple a un grupo alquilo y en donde el radical se ubica en el grupo arilo. Un grupo alquilarilo se enlaza a la estructura química ilustrada a través del grupo arilo. Un alquilarilo puede estar representado por la estructura, por ejemplo, $-B-CH_3$, $-B-CH_2-CH_3$, $-B-CH_2-CH_2-CH_3$, $-B-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$, $-B-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$, $-B-CH_2-CH(CH_3)-CH_3$, en donde B es un resto aromático, por ejemplo, fenilo. El alquilarilo está opcionalmente sustituido, es decir, el grupo arilo y/o el grupo alquilo pueden estar sustituidos como se divulga en el presente documento. Los ejemplos de alquilarilo incluyen, aunque no a modo de limitación, toluilo.

Tal como se usa en el presente documento, “ariloxi” se refiere a un resto monovalente que es un radical de un compuesto aromático en donde los átomos anulares son átomos de

carbono y en donde el anillo está sustituido con un radical oxígeno, es decir, el compuesto aromático incluye un enlace simple a un átomo de oxígeno y en donde el radical se ubica en el átomo de oxígeno, por ejemplo, C_6H_5-O- , para fenoxi. Los sustituyentes ariloxi se enlazan al compuesto que sustituyen a través de este átomo de oxígeno. El ariloxi está opcionalmente sustituido. El ariloxi incluye, aunque sin limitaciones, aquellos radicales que tienen de 6 a 20 átomos de carbono anulares, es decir, ariloxi C_{6-20} ; de 6 a 15 átomos de carbono anulares, es decir, ariloxi C_{6-15} , y de 6 a 10 átomos de carbono anulares, es decir, ariloxi C_{6-10} . Los ejemplos de restos ariloxi incluyen, aunque no a modo de limitación, fenoxi, naftoxi y antroxí.

Un grupo “amino” es un radical de fórmula NH_2 .

Un grupo “hidroxilamina” es un radical de fórmula $N(R^\#)OH$ o $NHOH$, en donde $R^\#$ es un grupo alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, aralquilo, heterocicilo o heterociclilalquilo sustituido o insustituido tal como se define en el presente documento.

Un grupo “alcoxiamina” es un radical de fórmula $-N(R^\#)O-$ alquilo o $-NHO-$ alquilo, en donde $R^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “aralcoxiamina” es un radical de fórmula $N(R^\#)O-$ arilo o NHO arilo, en donde $R^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “alquilamina” es un radical de fórmula NH alquilo o N (alquilo) $_2$, en donde cada alquilo es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “aminocarbonilo” es un radical de fórmula $-C(=O)N(R^\#)_2$, $-C(=O)NH(R^\#)$, o $C(=O)NH_2$, en donde cada $R^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “acilamino” es un radical de fórmula $NHC(=O)(R^\#)$ o N (alquilo) $C(=O)(R^\#)$, en donde cada alquilo y $R^\#$ son independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “O(alquil)aminocarbonilo” es un radical de fórmula $-O$ (alquilo) $C(=O)N(R^\#)_2$, $-O$ (alquilo) $C(=O)NH(R^\#)$ o $-O$ (alquilo) $C(=O)NH_2$, en donde cada $R^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “N-óxido” es un radical de fórmula $-N^+-O^-$.

Un grupo “carboxi” es un radical de fórmula $C(=O)OH$.

Una “cetona” es un radical de fórmula $C(=O)(R^\#)$, en donde $R^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “aldehído” es un radical de fórmula $-CH(=O)$.

Un grupo “éster” es un radical de fórmula $C(=O)O(R^\#)$ o $OC(=O)(R^\#)$, en donde $R^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “urea” es un radical de fórmula $-N$ (alquilo) $C(=O)N(R^\#)_2$, $-N$ (alquilo) $C(=O)NH(R^\#)$, $-N$ (alquilo) $C(=O)NH_2$, $-NHC(=O)N(R^\#)_2$, $-NHC(=O)NH(R^\#)$ o $NHC(=O)NH_2$, en donde cada alquilo y $R^\#$ son independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “imina” es un radical de fórmula $-N=C(R^\#)_2$ o $-C(R^\#)=N(R^\#)$, en donde cada $R^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “imida” es un radical de fórmula $-C(=O)N(R^\#)C(=O)(R^\#)$ o $N((C(=O)(R^\#))_2$, en donde cada $R^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “uretano” es un radical de fórmula $-OC(=O)N(R^\#)_2$, $-OC(=O)NH(R^\#)$, $-N(R^\#)C(=O)O(R^\#)$ o $-NHC(=O)O(R^\#)$, en donde cada $R^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “amidina” es un radical de fórmula $-C(=N(R^\#))N(R^\#)_2$, $-C(=N(R^\#))NH(R^\#)$, $-C(=N(R^\#))NH_2$, $-C(=NH)N(R^\#)_2$, $-C(=NH)NH(R^\#)$, $-C(=NH)NH_2$, $-N=C(R^\#)N(R^\#)_2$, $-$

$\text{N}=\text{C}(\text{R}^\#)\text{NH}(\text{R}^\#)$, $-\text{N}=\text{C}(\text{R}^\#)\text{NH}_2$, $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{C}(\text{R}^\#)=\text{N}(\text{R}^\#)$, $-\text{NHC}(\text{R}^\#)=\text{N}(\text{R}^\#)$, $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{C}(\text{R}^\#)=\text{NH}$ o $-\text{NHC}(\text{R}^\#)=\text{NH}$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “guanidina” es un radical de fórmula $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{C}(=\text{N}(\text{R}^\#))\text{N}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{NHC}(=\text{N}(\text{R}^\#))\text{N}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{C}(=\text{NH})\text{N}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{C}(=\text{N}(\text{R}^\#))\text{NH}(\text{R}^\#)$, $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{C}(=\text{N}(\text{R}^\#))\text{NH}_2$, $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{N}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{NHC}(=\text{N}(\text{R}^\#))\text{NH}(\text{R}^\#)$, $-\text{NHC}(=\text{N}(\text{R}^\#))\text{NH}_2$, $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}(\text{R}^\#)$, $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{N}=\text{C}(\text{N}(\text{R}^\#)_2)_2$, $-\text{N}=\text{C}(\text{NH}(\text{R}^\#))_2$ o $-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “enamina” es un radical de fórmula $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{C}(\text{R}^\#)=\text{C}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{NHC}(\text{R}^\#)=\text{C}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{C}(\text{N}(\text{R}^\#)_2)=\text{C}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{C}(\text{NH}(\text{R}^\#))=\text{C}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{C}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{C}(\text{R}^\#)=\text{C}(\text{R}^\#)(\text{N}(\text{R}^\#)_2)$, $\text{C}(\text{R}^\#)=\text{C}(\text{R}^\#)(\text{NH}(\text{R}^\#))$ o $-\text{C}(\text{R}^\#)=\text{C}(\text{R}^\#)(\text{NH}_2)$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “oxima” es un radical de fórmula $-\text{C}(=\text{NO}(\text{R}^\#))(\text{R}^\#)$, $-\text{C}(=\text{NOH})(\text{R}^\#)$, $-\text{CH}(=\text{NO}(\text{R}^\#))$ o $-\text{CH}(=\text{NOH})$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “hidrazida” es un radical de fórmula $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^\#)\text{N}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHN}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^\#)\text{NH}(\text{R}^\#)$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^\#)\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHNH}(\text{R}^\#)_2$ o $-\text{C}(=\text{O})\text{NHNH}_2$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “hidrazina” es un radical de fórmula $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{N}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{NHN}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{NH}(\text{R}^\#)$, $-\text{N}(\text{R}^\#)\text{NH}_2$, $-\text{NHNH}(\text{R}^\#)_2$ o $-\text{NHNH}_2$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “hidrazona” es un radical de fórmula $-\text{C}(=\text{N}-\text{N}(\text{R}^\#)_2)(\text{R}^\#)_2$, $-\text{C}(=\text{NNH}(\text{R}^\#))(\text{R}^\#)_2$, $-\text{C}(=\text{N}-\text{NH}_2)(\text{R}^\#)_2$, $-\text{N}(\text{R}^\#)(\text{N}=\text{C}(\text{R}^\#)_2)$ o $-\text{NH}(\text{N}=\text{C}(\text{R}^\#)_2)$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “azida” es un radical de fórmula $-\text{N}_3$.

Un grupo “isocianato” es un radical de fórmula $\text{N}=\text{C}=\text{O}$.

Un grupo “isotiocianato” es un radical de fórmula $\text{N}=\text{C}=\text{S}$.

Un grupo “cianato” es un radical de fórmula OCN .

Un grupo “tiocianato” es un radical de fórmula SCN .

Un grupo “tioéter” es un radical de fórmula $-\text{S}(\text{R}^\#)$, en donde $\text{R}^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “tiocarbonilo” es un radical de fórmula $-\text{C}(=\text{S})(\text{R}^\#)$, en donde $\text{R}^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “sulfinilo” es un radical de fórmula $-\text{S}(=\text{O})(\text{R}^\#)$, en donde $\text{R}^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “sulfona” es un radical de fórmula $-\text{S}(=\text{O})_2(\text{R}^\#)$, en donde $\text{R}^\#$ es como se definió anteriormente.

Un grupo “sulfonilamino” es un radical de fórmula $-\text{NH}\text{SO}_2(\text{R}^\#)$ o $-\text{N}(\text{alquilo})\text{SO}_2(\text{R}^\#)$, en donde cada alquilo y $\text{R}^\#$ se definen anteriormente.

Un grupo “sulfonamida” es un radical de fórmula $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^\#)_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{R}^\#)$ o $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}_2$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “fosfonato” es un radical de fórmula $-\text{P}(=\text{O})(\text{O}(\text{R}^\#))_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{O}(\text{R}^\#))(\text{R}^\#)$ o $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})(\text{R}^\#)$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Un grupo “fosfina” es un radical de fórmula $-\text{P}(\text{R}^\#)_2$, en donde cada $\text{R}^\#$ es independientemente como se definió anteriormente.

Cuando se dice que los grupos descritos en el presente documento, a excepción de los

grupos alquilo, están “sustituidos”, pueden estar sustituidos con cualquier sustituyente apropiado. Los ejemplos ilustrativos de sustituyentes son aquellos encontrados en los compuestos y formas de realización divulgados en la presente, así como halógeno (cloro, iodo, bromo o fluoro); alquilo; hidroxilo; alcoxi; alcoxialquilo; amino; alquilamino; carboxi; nitro; ciano; tiol; tioéter; imina; imida; amidina; guanidina; enamina; aminocarbonilo; acilamino; fosfonato; fosfina; tiocarbonilo; sulfinilo; sulfona; sulfonamida; cetona; aldehído; éster; urea; uretano; oxima; hidroxilamina; alcoxiamina; aralcoxiamina; N-óxido; hidrazina; hidrazida; hidrazona; azida; isocianato; isotiocianato; cianato; tiocianato; oxígeno (=O); B(OH)₂, O(alquil)aminocarbonilo; cicloalquilo, que puede ser monocíclico o fusionado o no fusionado policíclico (por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, o ciclohexilo), o un heterociclilo, que puede ser monocíclico o fusionado o no fusionado policíclico (por ejemplo, pirrolidilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiazinilo); arilo o heteroarilo monocíclico o fusionado o no fusionado policíclico (por ejemplo, fenilo, naftilo, pirrolilo, indolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, piridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, acridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidinilo, bencimidazolilo, benzotiofenilo, o benzofuranilo) ariloxi; aralquilo; heterocicliloxi; y heterociclil alcoxi.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a una sal preparada a partir de un ácido o una base no tóxica farmacéuticamente aceptable, que incluye un ácido o base inorgánica y un ácido o base orgánica.

Tal como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término “solvato” significa un compuesto, o una sal del mismo, que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de un solvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. En una forma de realización, el solvato es un hidrato.

Tal como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término “hidrato” significa un compuesto, o una sal del mismo, que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

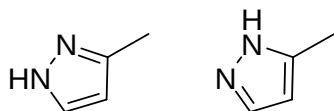
Tal como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término “profármaco” significa un compuesto derivado que se puede hidrolizar, oxidar o de lo contrario puede reaccionar en condiciones biológicas (*en vitro* o *en vivo*) para proporcionar un compuesto activo. Los ejemplos de profármacos incluyen, aunque no a modo de limitación, derivados y metabolitos de un compuesto que incluyen restos biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables y análogos de fosfato biohidrolizables. En ciertas formas de realización, los profármacos de compuestos con grupos funcionales carboxilo son los ésteres alquílicos inferiores del ácido carboxílico. Los ésteres de carboxilato pueden formarse esterificando cualquiera de los restos de ácido carboxílico presentes en la molécula. Los profármacos normalmente se pueden preparar utilizando métodos bien conocidos, como los descritos por *Burger's Medicinal Chemistry y Drug Discovery* 6th ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) y *Design and Application of Prodrugs* (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers Gmfh).

Tal como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término “estereoisómero” o “estereoméricamente puro” significa un estereoisómero de un compuesto que está sustancialmente libre de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por

ejemplo, un compuesto estereoméricamente puro que tiene un centro quiral estará sustancialmente libre del enantiómero opuesto del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro que tiene dos centros quirales estará sustancialmente libre de otros diastereómeros del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro típico comprende más de aproximadamente 80% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 20% en peso de otros estereoisómeros del compuesto, más de aproximadamente 90% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 10% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, más de aproximadamente 95% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 5% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o más de aproximadamente 97% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 3% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto. Los compuestos pueden tener centros quirales y pueden presentarse como racematos, enantiómeros individuales o diastereómeros, y mezclas de los mismos. Todas estas formas isoméricas están incluidas en las formas de realización descritas en el presente documento, incluidas sus mezclas. El uso de formas estereoméricamente puras de dichos compuestos, así como el uso de mezclas de esas formas, están abarcados por las formas de realización descritas en el presente documento. Por ejemplo, mezclas que comprenden cantidades iguales o desiguales de los enantiómeros de un compuesto particular pueden usarse en métodos y composiciones divulgadas en el presente documento. Estos isómeros pueden sintetizarse o resolverse asimétricamente utilizando técnicas estándar como columnas quirales o agentes de resolución quirales. Véase, por ejemplo, Jacques, J., *et al.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (WileyInterscience, New York, 1981); Wilen, S. H., *et al.*, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGrawHill, NY, 1962); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

También cabe señalar que los compuestos pueden incluir isómeros E y Z, o una mezcla de los mismos, e isómeros cis y trans, o una mezcla de los mismos. En ciertas formas de realización, los compuestos se aíslan como isómero cis o trans. En otras formas de realización, los compuestos son una mezcla de los isómeros cis y trans.

“Tautómeros” se refiere a formas isoméricas de un compuesto que están en equilibrio entre sí. Las concentraciones de las formas isoméricas dependerán del entorno en que se encuentra el compuesto y pueden ser diferentes dependiendo, por ejemplo, de si el compuesto es un sólido o está en una solución orgánica o acuosa. Por ejemplo, en una solución acuosa, los pirazoles pueden exhibir las siguientes formas isoméricas, que se denominan tautómeros entre sí:



Como entenderá fácilmente un experto en la técnica, una amplia variedad de grupos funcionales y otras estructuras pueden exhibir tautomerismo y todos los tautómeros de los compuestos están dentro del alcance de la presente divulgación.

También cabe señalar que los compuestos pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I),

azufre-35 (^{35}S), o carbono-14 (^{14}C), o pueden estar isotópicamente enriquecidos, tales como con deuterio (^2H), carbono-13 (^{13}C), o nitrógeno-15 (^{15}N). Tal como se usa en el presente documento, un “isotópologo” es un compuesto enriquecido isotópicamente. El término “enriquecido isotópicamente” se refiere a un átomo que tiene una composición isotópica distinta a la composición isotópica natural de ese átomo. “Enriquecido isotópicamente” también puede referirse a un compuesto que contiene al menos un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo. El término “composición isotópica” se refiere a la cantidad de cada isótopo presente en un átomo determinado. Los compuestos radiomarcados y enriquecidos isotópicamente son útiles como agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes terapéuticos para cáncer e inflamación, reactivos de investigación, por ejemplo, reactivos de ensayo de unión, y agentes de diagnóstico, por ejemplo, agentes de formación de imágenes *en vivo*. Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos descritos en el presente documento, ya sean radiactivas o no, queden abarcadas dentro del alcance de las formas de realización proporcionadas en el presente documento. En algunas formas de realización, se proporcionan isotopólogos de los compuestos, por ejemplo, los isotopólogos son compuestos enriquecidos en deuterio, carbono-13 o nitrógeno-15.

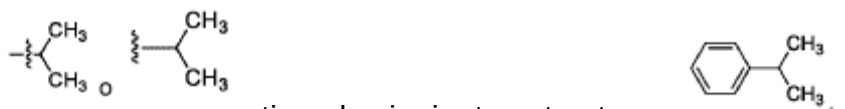
Cabe señalar que si hay una discrepancia entre una estructura representada y el nombre para esa estructura, a la estructura representada se le debe otorgar más peso.

Tal como se usa en el presente documento, el término “residuo” se refiere al resto químico dentro de un compuesto que permanece después de una reacción química. Por ejemplo, el término “residuo de aminoácido” o “residuo de aminoácido de N–alquilo” se refiere al producto de un acoplamiento de amida o acoplamiento de péptido de un aminoácido o un aminoácido de N–alquilo a una pareja de acoplamiento adecuada; en donde, por ejemplo, una molécula de agua es expulsada tras el acoplamiento de amida o peptídico del aminoácido o el N–alquilaminoácido, dando como resultado el producto que tiene el residuo de aminoácido o residuo de N–alquilaminoácido incorporado en el mismo.

Tal como se usa en el presente documento, “azúcar” o “grupo de azúcar” o “residuo de azúcar” se refiere a un resto carbohidrato que puede comprender unidades de 3 carbonos (dosa), unidades de 4 carbonos (tetrosa), unidades de 5 carbono (pentosa), unidades de 6 carbonos (hexosa), unidades de 7 carbonos (heptosa), o combinaciones de las mismas, y puede ser un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un tetrasacárido, un pentasacárido, un oligosacárido, o cualquier otro polisacárido. En algunos casos, un “azúcar” o “grupo de azúcar” o “residuo de azúcar” comprende furanosas (por ejemplo, ribofurano, fructofurano) o piranosas (por ejemplo, glucopirano, galactopirano), o una combinación de las mismas. En algunos casos, un “azúcar” o “grupo de azúcar” o “residuo de azúcar” comprende aldosas o cetosas, o una combinación de las mismas. Los ejemplos no limitantes de monosacáridos incluyen ribosa, desoxirribosa, xilosa, arabinosa, glucosa, manosa, galactosa y fructosa. Los ejemplos no limitantes de disacáridos incluyen sacarosa, maltosa, lactosa, lactulosa y trehalosa. Otros “azúcares” o “grupos de azúcares” o “residuos de azúcares” incluyen polisacáridos y/u oligosacáridos, incluyendo, aunque sin limitación, amilosa, amilopectina, glucógeno, inulina y celulosa. En algunos casos, un “azúcar” o “grupo de azúcar” o “residuo de azúcar” es un aminoazúcar. En algunos casos, un “azúcar” o “grupo de azúcar” o “residuo de azúcar” es un residuo de glucamina (1–amino–1–desoxi–D–glucitol) unido al resto de la molécula a través de su grupo amino para

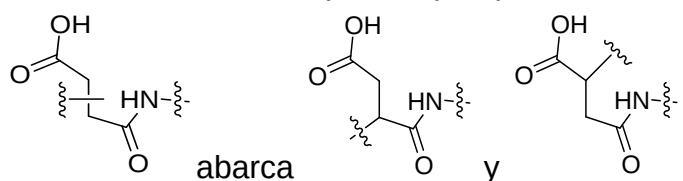
formar un enlace amida con el resto de la molécula (es decir, una glucamida).

Ciertos grupos, restos, sustituyentes y átomos se representan con una línea ondulante, por ejemplo, que cruza un enlace o enlaces, para indicar el átomo a través del cual se unen los grupos, restos, sustituyentes y átomos. Por ejemplo, un grupo fenilo que se sustituye con un grupo propilo representado como:



tiene la siguiente estructura:

Las ilustraciones que muestran sustituyentes unidos a un grupo no cíclico a través de un enlace entre dos átomos pretenden indicar, a menos que se especifique lo contrario, que el sustituyente puede estar unido a cualquier átomo del enlace a través del cual pasa el enlace sustituyente, de acuerdo con las técnicas establecidas en el presente documento o que son conocidas en el campo al que pertenece la presente divulgación. Así, por ejemplo,



Tal como se usa en el presente documento, “agente de unión” se refiere a cualquier molécula, por ejemplo, anticuerpo, capaz de unirse con especificidad a una pareja de unión determinada, por ejemplo, un antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” se refiere a un compuesto orgánico que contiene grupos funcionales amino ($-NH_2$) y carboxilo ($-COOH$), junto con una cadena lateral (grupo R), que es específico de cada aminoácido. Los aminoácidos pueden ser proteinogénicos o no proteinogénicos. Por “proteinogénico” se entiende que el aminoácido es uno de los veinte aminoácidos naturales que se encuentran en las proteínas. Los aminoácidos proteinogénicos incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Por “no proteinogénico” se entiende que los aminoácidos no se encuentran naturalmente en las proteínas o no se producen directamente por la maquinaria celular (por ejemplo, es el producto de una modificación postraduccion). Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no proteinogénicos incluyen ácido gamma-aminobutírico (GABA), taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico), teanina (L-γ-glutamiletilamida), hidroxiprolina, beta-alanina, ornitina y citrulina.

Tal como se usa en el presente documento, “péptido”, en sus diversas formas gramaticales, se define en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos u otros peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas mediante enlaces peptídicos o mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, y similares. Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales, proteinogénicos o no proteinogénicos, o sintéticos, incluida la glicina y los isómeros ópticos D y L, y análogos y peptidomiméticos de aminoácidos. Si la cadena peptídica es corta, por ejemplo, de dos, tres o más aminoácidos, comúnmente se le llama oligopéptido. Si la cadena peptídica es más larga, el péptido normalmente se denomina polipéptido o proteína. La definición abarca

proteínas de longitud completa, análogos, mutantes y fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, como en la molécula están presentes grupos amino y carboxilo ionizables, se puede obtener un péptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Un péptido puede obtenerse directamente del organismo fuente o puede producirse de forma recombinante o sintética.

La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se puede numerar usando cualquier esquema de numeración conocido, incluidos los descritos por Kabat *et al.* (esquema de numeración "Kabat"); Al-Lazikani *et al.*, 1997, J. Mol. Biol., 273:927–948 (esquema de numeración "Chothia"); MacCallum *et al.*, 1996, J. Mol. Biol. 262:732–745 (esquema de numeración "Contact"); Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55–77 (esquema de numeración "IMGT"); y Honegge y Pluckthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657–70 (esquema de numeración "AHO"). A menos que se especifique lo contrario, el esquema de numeración utilizado en este documento es el esquema de numeración de Kabat. Sin embargo, la selección de un esquema de numeración no pretende implicar diferencias en secuencias cuando no existen, y el experto en la técnica puede confirmar fácilmente la posición de una secuencia examinando la secuencia de aminoácidos de uno o más anticuerpos. A menos que se indique lo contrario, el "esquema de numeración EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo (por ejemplo, como se informa en Kabat *et al.*, *supra*).

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-HER2" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor HER2, por ejemplo, trastuzumab (Herceptin). En una forma de realización, trastuzumab puede elaborarse y usarse como se describe en los documentos US6407213 y US5821337, cuyas divulgaciones completas se incorporan aquí por referencia.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-HER3" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor HER3, por ejemplo, patritumab. En una forma de realización, patritumab se puede elaborar y utilizar como se describe en el documento US7705130, cuya divulgación completa se incorpora aquí por referencia.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-PTK7" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor PTK7, por ejemplo, cofetuzumab. En una forma de realización, cofetuzumab se puede elaborar y utilizar como se describe en el documento US9777070, cuya divulgación completa se incorpora aquí por referencia.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ifinatumab" se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente al receptor B7H3. En una forma de realización, ifinatumab se puede elaborar y utilizar como se describe en los documentos US10117952 o WO2022102695, cuyas divulgaciones completas se incorporan en aquí por referencia.

Tal como se usa en el presente documento, el término "actividad de destrucción celular" se refiere a la actividad que disminuye o reduce la viabilidad celular de la línea celular analizada.

En las reivindicaciones que siguen a la descripción anterior, excepto cuando el contexto requiera lo contrario debido al texto expreso o una implicación necesaria, la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende(n)" se usa en sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas pero no excluir la presencia o adición de características adicionales en diversas formas de

realización.

6.2. Conjugados

En algunas formas de realización, un conjugado, o una sal, tautómero, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, incluye una proteína unida a al menos una carga útil o residuo de carga útil (también denominado en el presente documento unidad de fármaco) y unido a al menos un resto hidrófilo a través de un enlazador covalente. El enlazador covalente está unido directa o indirectamente a cada uno de la proteína, el residuo de carga útil y el resto hidrófilo. En algunas formas de realización, la proteína es un agente de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas formas de realización, la proteína está unida directamente a un enlazador covalente, tal como un enlazador establecido en el presente documento. En tales casos, el agente de unión se encuentra a una posición de enlace alejada del enlazador covalente. El enlazador covalente también puede estar unido directamente a un residuo de carga útil de manera que el enlazador covalente esté a una posición de enlace de un residuo de carga útil. La carga útil puede ser cualquier carga útil establecida en este documento. En algunas formas de realización, el enlazador covalente también está unido directamente a un resto hidrófilo de modo que el enlazador covalente está a una posición de enlace de un resto hidrófilo. El resto hidrófilo puede ser cualquier resto hidrófilo (HG) establecido en el presente documento.

En algunas formas de realización, el agente de unión está unido indirectamente a un enlazador covalente de manera que el agente de unión está a más de una posición de enlace del enlazador covalente. En tales casos, el agente de unión está unido a través de otro resto al enlazador covalente. Por ejemplo, el agente de unión puede estar unido a un grupo maleimida que está unido a un grupo polietilenglicol que está unido al enlazador covalente.

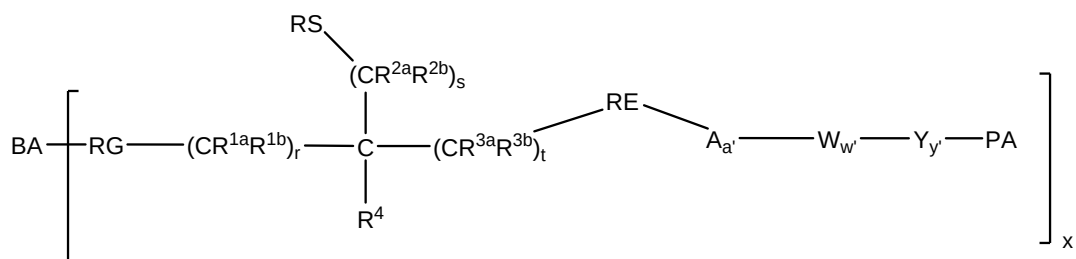
En algunos ejemplos, el enlazador covalente también está unido indirectamente a un residuo de carga útil de modo que el enlazador covalente está a más de una posición de enlace de un residuo de carga útil. El enlazador covalente está unido a través de otro resto a la carga útil. Por ejemplo, el enlazador covalente puede estar unido a un dipéptido, tal como, aunque sin limitación, Val–Ala o Val–Cit, que puede estar unido a PAB que puede estar unido al residuo de carga útil.

En algunas formas de realización, el enlazador covalente está unido indirectamente a un resto hidrófilo de tal manera que el enlazador covalente está a más de una posición de enlace de un resto hidrófilo. El enlazador covalente está unido a través de otro resto al resto hidrófilo.

6.2.1. Aspecto 1

En el presente documento se proporcionan ADC, por ejemplo, para usar en terapia, tal como una terapia contra el cáncer.

Una forma de realización es un compuesto ADC de Fórmula (I):



(I)

o una sal, tautómero, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, BA es un agente de unión seleccionado de un anticuerpo humanizado, quimérico o humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo;

RG es un residuo de grupo reactivo;

RS es un grupo estabilizante de anillo abierto;

RE es un potenciador de anillo abierto;

cada uno de R^{1a} y R^{1b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{1a} y R^{1b} junto con el átomo al cual están unidos forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;

cada uno de R^{2a} y R^{2b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{2a} y R^{2b} junto con el átomo al cual están unidos forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;

cada uno de R^{3a} y R^{3b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{3a} y R^{3b} junto con el átomo al cual están unidos forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;

R^4 es H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; o cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;

cada uno de r, s, y t es, independientemente, 0, 1, o 2;

A es un residuo de unidad de extensión;

el subíndice a' es 0 o 1;

W es una unidad escindible;

el subíndice w' es 0 o 1;

Y es una unidad espaciadora;

el subíndice y' es 0 o 1;

PA es un residuo de carga útil; y

el subíndice x es de 1 a 15.

En una forma de realización, el subíndice x es de 1 a 12. En una forma de realización, el subíndice x es de 1 a 10. En una forma de realización, el subíndice x es de 2 a 10. En una forma de realización, el subíndice x es de 3 a 10. En una forma de realización, el subíndice x es de 4 a 10. En una forma de realización, el subíndice x es de 4 a 9. En una forma de realización, el subíndice x es de 4 a 8.

En algunas formas de realización, cada uno de R^{1a} , R^{1b} , R^{2a} , R^{2b} , R^{3a} , R^{3b} , y R^4 es, independientemente, H.

En algunas formas de realización, RS es $-\text{NR}^{5a}\text{R}^{5b}$, en donde cada uno de R^{5a} y R^{5b} es, independientemente, H, o alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido.

En algunas formas de realización, RS es un grupo amino ($-\text{NH}_2$) o $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

En algunas formas de realización, RS es un grupo amino.

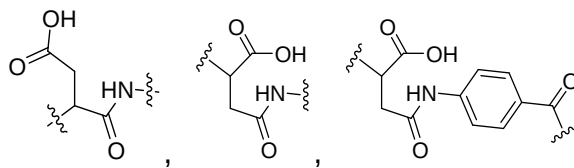
En algunas formas de realización, RE es un enlace, $-\text{O}-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^6-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NR}^6-$, $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{NR}^6-$, $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{NR}^6-$, o $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHS}(=\text{O})_2\text{NR}^6-$; y R^6 es H o

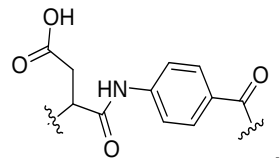
alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido.

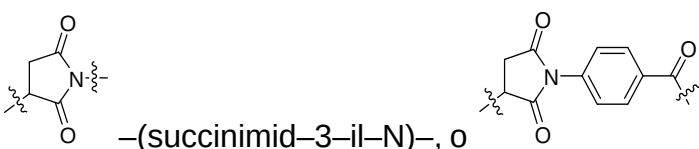
En algunas formas de realización, R^6 es H, metilo, etilo, o isopropilo.

En algunas formas de realización, RE es $-OC(=O)NR^6-$.

En algunas formas de realización, RE es $-OC(=O)NH-$.

En algunas formas de realización, RG es , o



En algunas formas de realización, RG es , o

En algunas formas de realización, r es 0.

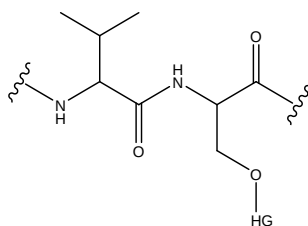
En algunas formas de realización, s es 1.

En algunas formas de realización, t es 1 o 2.

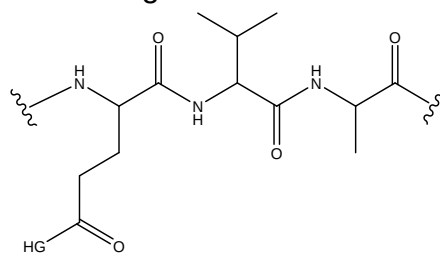
En algunas formas de realización, r es 0, s es 1, y t es 1 o 2.

En algunas formas de realización, A es un enlace, $-(CH_2)_n-C(=O)-$, $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_n-C(=O)-$, $-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-CH[-(CH_2)_n-COOH]-C(=O)-$, $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_n-C(=O)-$, o $-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)-$, en donde cada n representa independientemente un número entero de 1, 2, 3, 4, o 5.

En algunas formas de realización, $W_{w'}$ es una de las siguientes fórmulas:



Fórmula (Ia), o

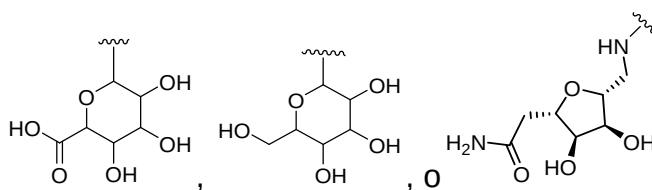


Fórmula (Ib),

y HG es un resto hidrófilo o hidrógeno.

En algunas formas de realización, HG es un sacárido, fosfato éster, sulfato éster, un fosfodiéster, o un fosfonato.

En algunas formas de realización, HG es un sacárido, y el sacárido es β -D-galactosa, N-acetil-P-D-galactosamina, N-acetil- α -D-galactosamina, N-acetil-P-D-glucosamina, ácido β -D-glucurónico, ácido α -L-idurónico, α -D-galactosa, α -D-glucosa, β -D-glucosa, α -D-manosa, β -D-manosa, α -L-fucosa, β -D-xilosa, un ácido neuramínico, sulfato, fosfato, carboxilo, amino, o una modificación O-acetilo de los mismos. En algunas formas de realización, HG se selecciona de β -D-galactosa y ácido β -D-glucurónico.



En algunas formas de realización, HG es

En algunas formas de realización, Y_y es una unidad PAB.

En algunas formas de realización, la unidad de expansión ($-A-$) está presente y extiende la estructura del enlazador covalente para proporcionar más distancia entre un conjunto de enlazador autoestabilizante y una unidad de fármaco (carga útil o residuo de carga útil). El conjunto de enlazador autoestabilizante puede incluir los componentes de Fórmula (I) distintos del agente de unión (BA), la unidad de extensión (A), la unidad escindible (W), la unidad espaciadora (Y) y el residuo de carga útil (PA). En algunas formas de realización, el enlazador autoestabilizante incluye el residuo de grupo reactivo (RG), el grupo estabilizante de anillo abierto (RS), el potenciador de anillo abierto (RE), y los átomos de carbono y los grupos R que conectan RG, RS y/o RE. Una unidad de extensión puede vincular el conjunto del conector autoestabilizante a la unidad escindible cuando la unidad escindible está presente, el conjunto del enlazador autoestabilizante a la unidad espaciadora cuando la unidad escindible está ausente y la unidad espaciadora está presente, o el conjunto del enlazador autoestabilizante a la unidad de fármaco cuando tanto la unidad escindible como la unidad espaciadora están ausentes. Una unidad de extensión puede unirse a más de una unidad escindible, unidad espaciadora y/o unidad de fármaco. El conjunto de enlazador autoestabilizante, la unidad escindible, la unidad espaciadora y la unidad de fármaco pueden ser cualquier conjunto de enlazador autoestabilizante, unidad escindible, unidad espaciadora y unidad de fármaco, respectivamente, descritos en el presente documento.

La unidad de extensión puede alterar las propiedades fisicoquímicas del fármaco-enlazador dependiendo de los componentes de la unidad de extensión. En algunas implementaciones, la unidad de extensión puede aumentar la solubilidad del fármaco-enlazador y puede incluir uno o más grupos que mejoran la solubilidad tales como grupos iónicos o polímeros solubles en agua. Los polímeros solubles en agua pueden ser solubles en agua a temperatura ambiente y pueden incluir grupos de poli(etileno)glicol así como otros polímeros como polietileniminas.

Una unidad de extensión puede comprender uno o más grupos de extensión. Los ejemplos de grupos de extensión incluyen, por ejemplo, $-NH-$ alquilenoc₁₋₁₀, $-NH-$ alquilenoc₁₋₁₀ $-NH-C(O)-$ alquilenoc₁₋₁₀, $-NH-$ alquilenoc₁₋₁₀-C(O)-NH-alquilenoc₁₋₁₀, $-NH-(CH_2CH_2O)_u-$, $-NH-(CH_2CH_2O)_u-CH_2-$, $-NH-(CH_2CH_2NH)_u-(CH_2)_u-NH-(CH_2CH_2NH)_u-(CH_2)_u-NH-C(O)-(CH_2)_u-NH-(C_3-C_8 \text{ carbociclo})-$, $-NH-(arileno)-$ y $-NH-(heterociclo C_3-C_8)-$, en donde cada u es independientemente 1-10.

En algunas formas de realización, la unidad escindible ($-W_w-$) está presente y puede unir el conjunto enlazador autoestabilizante a la unidad espaciadora cuando la unidad espaciadora está presente o unir el conjunto enlazador autoestabilizante a la unidad de fármaco cuando la unidad espaciadora está ausente. La conexión del conjunto de enlazador autoestabilizante a la unidad espaciadora o a la unidad de fármaco puede ser directamente desde el conjunto de enlazador autoestabilizante cuando la unidad de extensión está ausente o a través de la unidad de extensión si la unidad de extensión está presente.

En algunas formas de realización, la unidad escindible está directamente conjugada al conjunto de enlazador autoestabilizante en un extremo y a la unidad de fármaco en el otro

extremo. En algunas formas de realización, la unidad escindible está directamente conjugada a la unidad de extensión en un extremo y a la unidad de fármaco en el otro extremo. En formas de realización adicionales, la unidad escindible está conjugada directamente con la unidad de extensión en un extremo y con la unidad espaciadora en el otro extremo. En aún otras formas de realización, la unidad escindible está directamente conjugada con el conjunto de enlazador autoestabilizante en un extremo y con la unidad espaciadora en el otro extremo. En algunas formas de realización, la unidad de extensión y/o la unidad espaciadora pueden estar ausentes.

La unidad escindible puede formar un enlace escindible con una unidad de fármaco (PA) o una unidad espaciadora. Los grupos reactivos para formar enlaces escindibles pueden incluir, por ejemplo, grupos sulfhidrilo para formar enlaces disulfuro; grupos aldehído, cetona o hidrazina para formar enlaces hidrazona; grupos carboxílicos o amino para formar enlaces peptídicos; y grupos carboxílicos o hidroxilo para formar enlaces éster.

La unidad escindible puede incluir un enlazador que contiene disulfuro escindible mediante intercambio de disulfuro, un enlazador lábil a pH ácido, o un enlazador escindible mediante una enzima como una hidrolasa, peptidasa, esterasa o glucoronidasa. La unidad escindible puede incluir uno o más sitios de escisión.

En algunas formas de realización, la unidad escindible incluye uno o más aminoácidos, tales como 1 a 12. La unidad escindible puede incluir, por ejemplo, una unidad monopéptido, dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapéptido.

Cada aminoácido puede ser un aminoácido natural o no natural, y/o un isómero D o L del mismo, siempre que esté disponible un enlace escindible. En algunas formas de realización, la unidad escindible incluye únicamente aminoácidos naturales. Cada aminoácido puede ser un aminoácido proteinógeno o no proteinógeno.

En algunas formas de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente del grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, valina, cisteína, metionina, selenocisteína, ornitina, penicilamina, β -alanina, ácido aminoalcanoico, ácido aminoalquinoico, ácido aminoalcanodioico, ácido aminobenzoico, ácido amino-heterociclo-alcanoico, ácido heterociclocarboxílico, citrulina, estatina, ácido diaminoalcanoico, y derivados de los mismos. En algunas formas de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente del grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, valina, cisteína, metionina y selenocisteína. En algunas formas de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente del grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, y valina.

En algunas formas de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente de un isómero L de los siguientes aminoácidos naturales: alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano y valina. En algunas formas de realización, cada aminoácido es un isómero D de los siguientes aminoácidos naturales: alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina,

lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano y valina.

En algunas formas de realización, la unidad escindible es el dipéptido –Val–Cit–, –Phe–Lys–, o –Val–Ala.

En algunas formas de realización, la unidad escindible incluye uno o dos aminoácidos terminales y está unida a la unidad de fármaco y/o unidad espaciadora a través de unidades funcionales presentes en un aminoácido terminal, por ejemplo, su extremos de ácido carboxílico o amino.

En algunas formas de realización, el enlace entre la unidad escindible y la unidad de fármaco puede ser escindido enzimáticamente por una o más enzimas, incluida una proteasa asociada al tumor, para liberar la unidad de fármaco (–PA), que puede ser protonada *en vivo* tras su liberación para proporcionar un fármaco (PA).

Se pueden diseñar unidades escindibles útiles para optimizar su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima particular, como una proteasa asociada al tumor. En una forma de realización, un enlace entre la unidad escindible y la unidad de fármaco o unidad espaciadora es aquel cuya escisión es catalizada por catepsina B, C, y/o D, o una proteasa de plasmina.

En algunas formas de realización, la unidad espaciadora (–Y_y–) está presente y extiende el marco del enlazador covalente. Una unidad espaciadora puede unir una unidad escindible a la unidad de fármaco o una unidad de extensión a la unidad de fármaco o un conjunto enlazador autoestabilizante a una unidad de fármaco. La unidad espaciadora puede incluir uno o más grupos autoinmolantes o no autoinmolantes. En algunas formas de realización, la unidad espaciadora incluye uno o más grupos autoinmolantes. En este contexto, el término “grupo autoinmolante” se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir covalentemente dos restos químicos espaciados en una molécula tripartita normalmente estable. El grupo autoinmolante se separará espontáneamente del segundo resto químico si se escinde su enlace con el primer resto. En otras formas de realización, la unidad espaciadora no es autoinmolante. En tales formas de realización, parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida a la unidad de fármaco.

En algunas formas de realización, –Y_y– es un grupo autoinmolante y está unido a una unidad escindible mediante un átomo de carbono de metileno del grupo autoinmolante, y unido directamente a la unidad de fármaco mediante un grupo carbonato, carbamato o éter. En algunas formas de realización, –Y_y– es una unidad de alcohol p–aminobencílico (PAB) (por ejemplo, –NH–(C₆H₄)–CH₂–O–C(=O)–. La porción de fenileno de la unidad PAB está opcionalmente sustituida con –alquilo C₁–C₈, –O–(alquilo C₁–C₈), –halógeno, –nitro, o –ciano.

En otra forma de realización, –Y_y– es un grupo carbonato.

Otros ejemplos de grupos autoinmolantes incluyen, aunque no a modo de limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares a las unidades PAB tales como derivados de 2–aminoimidazol–5–metanol (ver, por ejemplo, Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto– o para–aminobencilacetales. Las unidades espaciadoras adecuadas incluyen aquellas que sufren ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas del ácido 4–aminobutírico sustituido e insustituido (ver, por ejemplo, Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), sistemas biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] anulares apropiadamente sustituidos (ver, por ejemplo, Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815), y amidas del ácido 2–aminofenilpropiónico (ver, por ejemplo, Amsberry *et*

al., 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen aminas que se sustituyen en la posición α de la glicina (ver, por ejemplo, Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) también son ejemplos de grupos autoinmolantes adecuados.

Otras unidades espaciadoras adecuadas se describen en la publicación estadounidense n.º 2005-0238649, cuya descripción se incorpora aquí por referencia.

Las unidades de extensión, unidades escindibles y unidades espaciadoras adecuadas para su uso con los enlazadores, plataformas y ADC divulgados actualmente se describen en los documentos WO 2004/010957, WO 2007/038658, WO 2005/112919, patentes de EE. UU. Nros. 6.214.345, 7.659.241, 7.498.298, 7.968.687 y 8.163.888, y Publicaciones de EE. UU. Nros. 2009-0111756, 2009-0018086 y 2009-0274713, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad y para todos los propósitos.

Agentes de unión

En el presente documento se proporcionan agentes de unión (BA), por ejemplo, para usar en un ADC descrito en el presente documento.

Los compuestos de Fórmula (I) pueden incluir cualquier BA descrito en el presente documento.

En algunas formas de realización, BA es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, un anticuerpo humanizado, quimérico o humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a B7H3 humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es ifinatamab.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a PTK7. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es cofetuzumab.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a HER3. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es patritumab.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a HER2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es trastuzumab.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo diseñado humano, un anticuerpo de cadena simple (scFv), un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

En algunas formas de realización, el dominio Fc es una IgG1 con función efectora reducida.

Cargas útiles

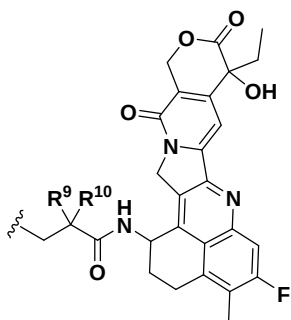
En el presente documento se proporcionan cargas útiles (PA), por ejemplo, para usar en una plataforma y/o ADC descrito en el presente documento.

Los compuestos de Fórmula (I) pueden incluir cualquier PA descrito en el presente documento.

En algunas formas de realización, cada PA es independientemente un agente citotóxico.

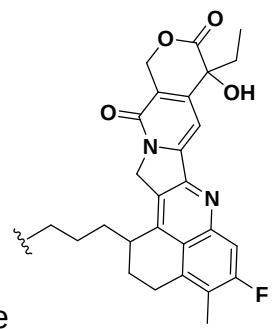
En algunas formas de realización, cada PA se selecciona independientemente del grupo que consiste en DXd, 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38), y monometil auristatina E (MMAE).

En algunas formas de realización, cada PA es independientemente un compuesto de fórmula (VI):

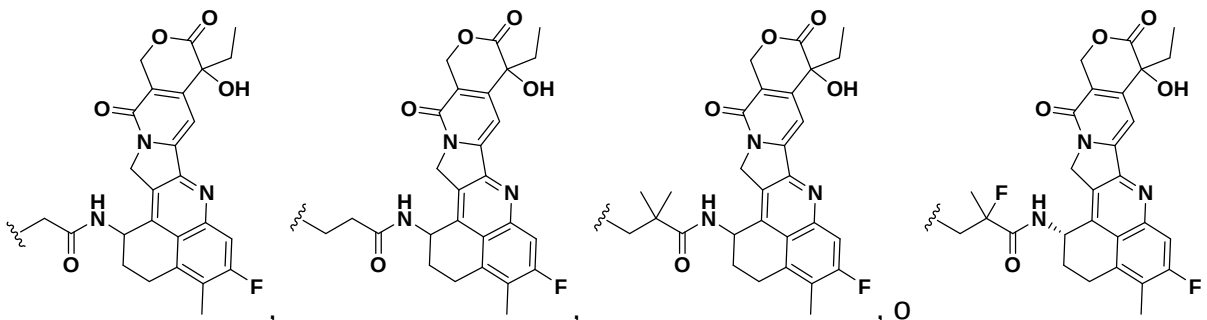


(VI),

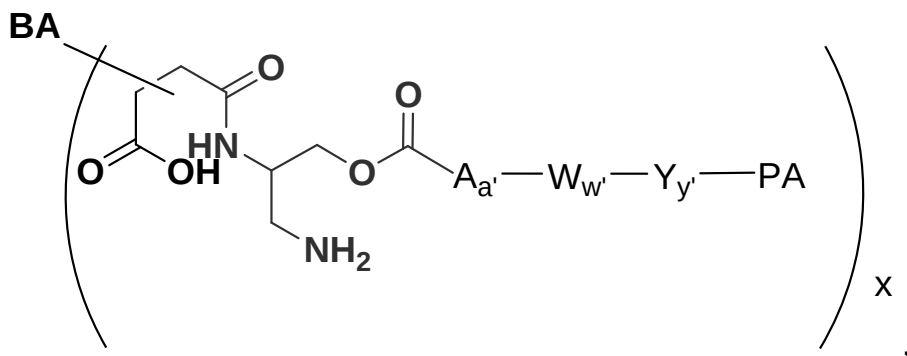
y cada uno de R⁹ y R¹⁰ es independientemente hidrógeno, halógeno, o alquilo C₁₋₄ sustituido o insustituido.

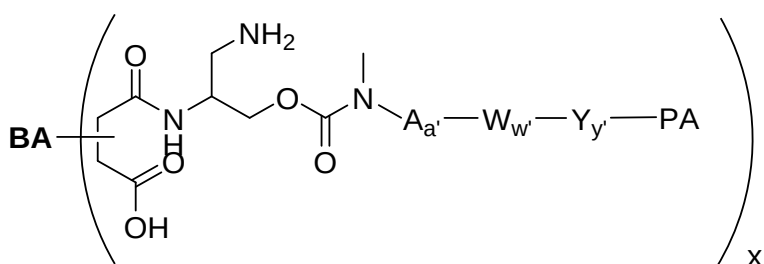
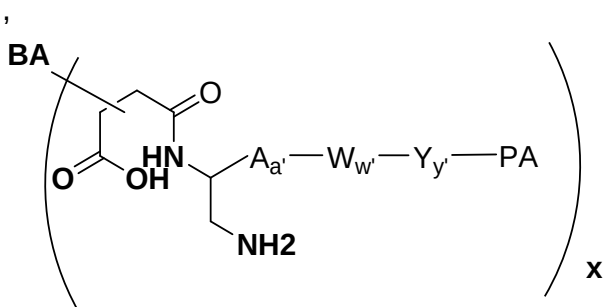
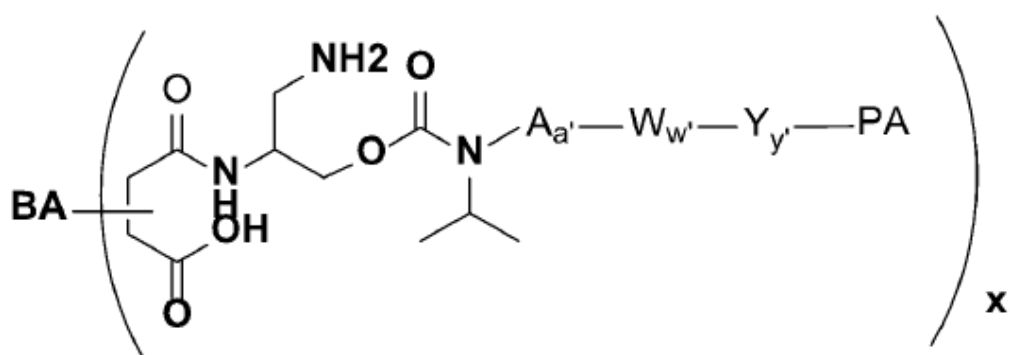
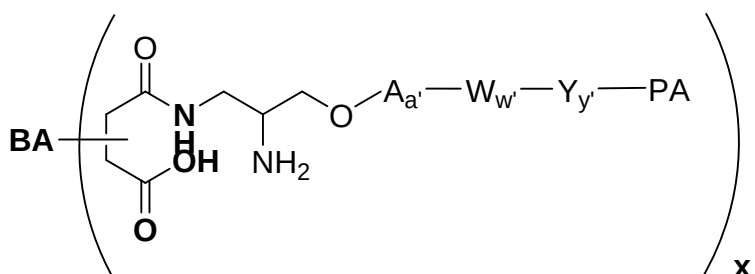
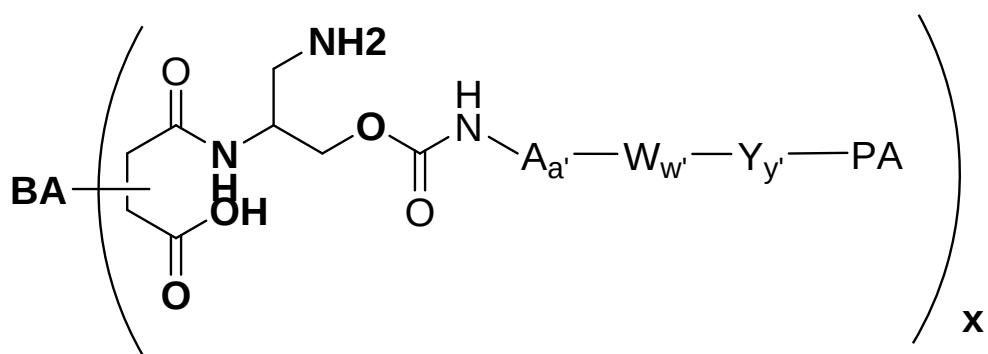


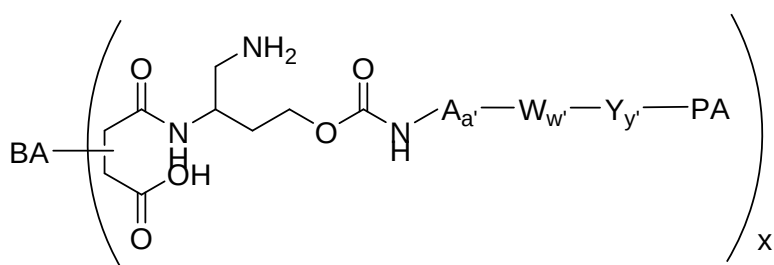
En algunas formas de realización, cada PA es independientemente



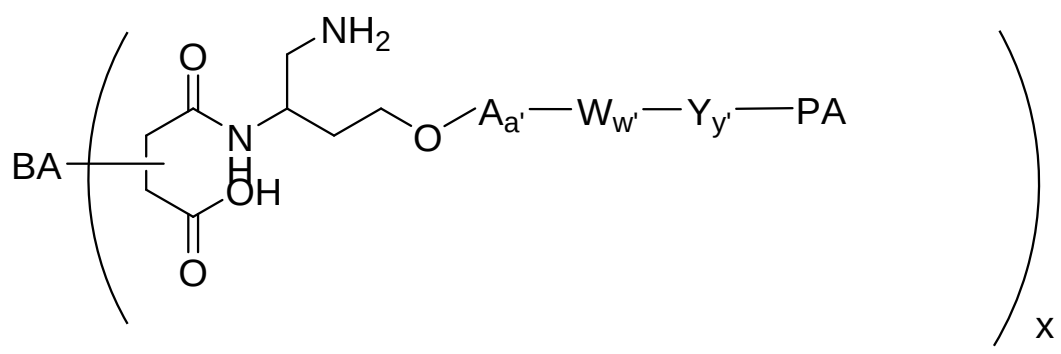
En algunas formas de realización, el ADC tiene la siguiente fórmula:





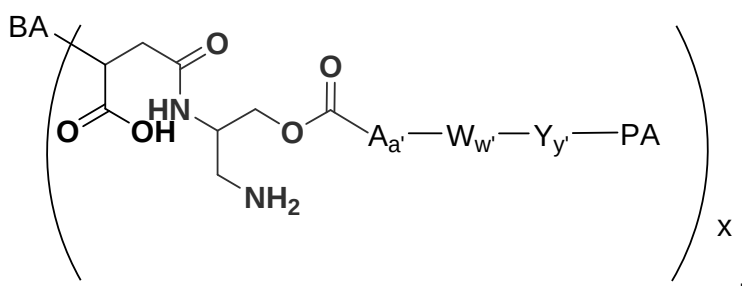


, 0

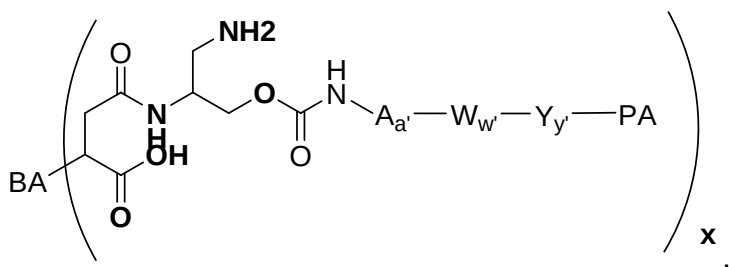


en donde los valores para las variables (por ejemplo, BA, PA, A, W, Y, a', w', y', x) son como se describió anteriormente.

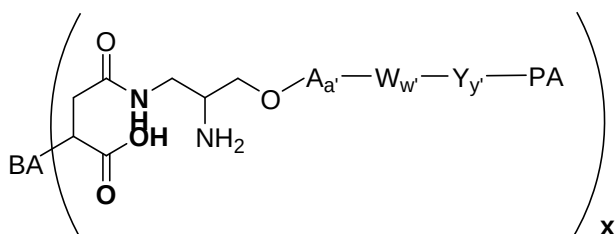
En algunas formas de realización, el ADC tiene la siguiente fórmula:



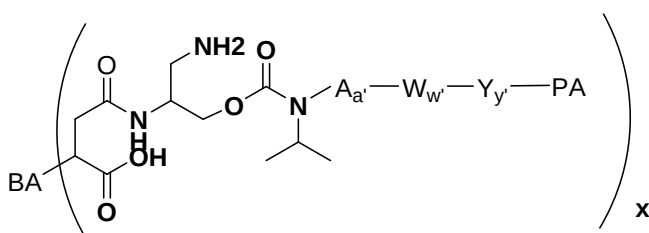
,



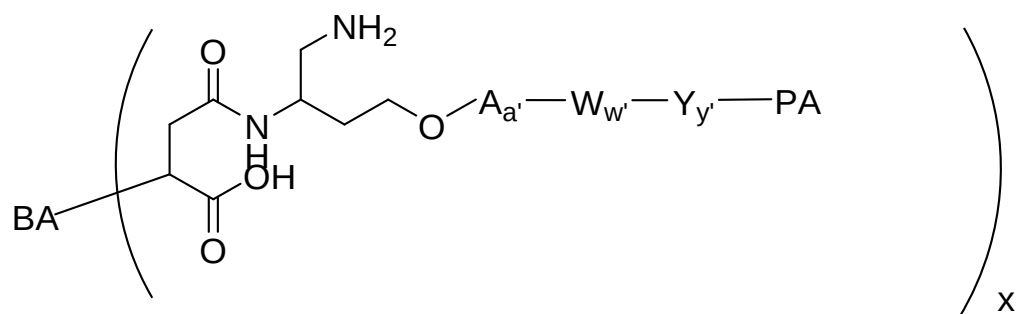
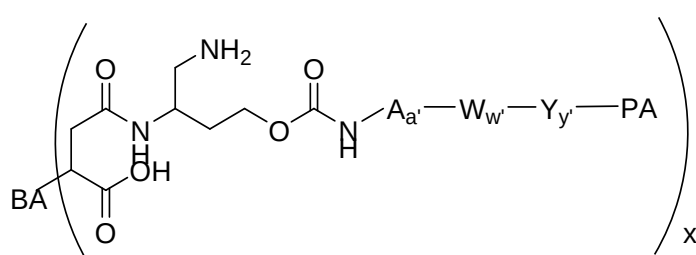
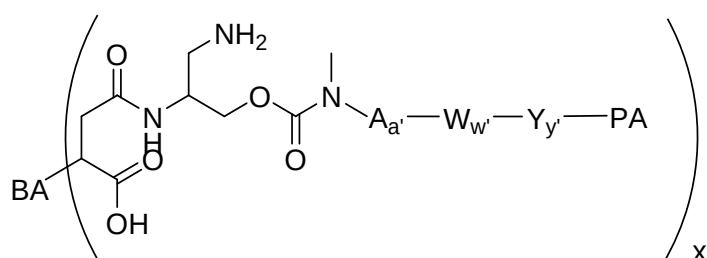
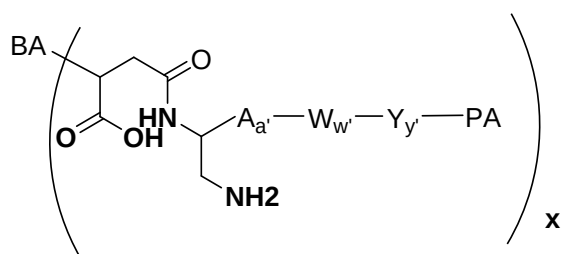
,



,



,

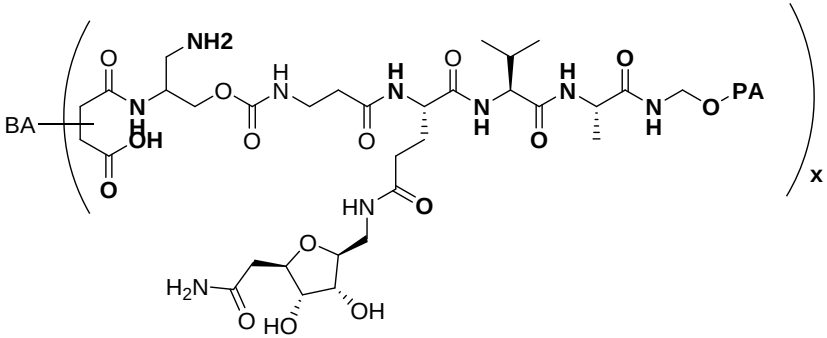
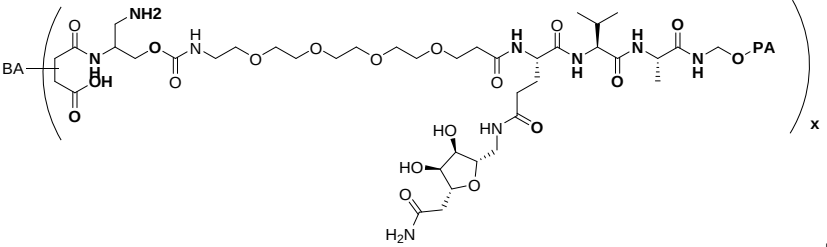
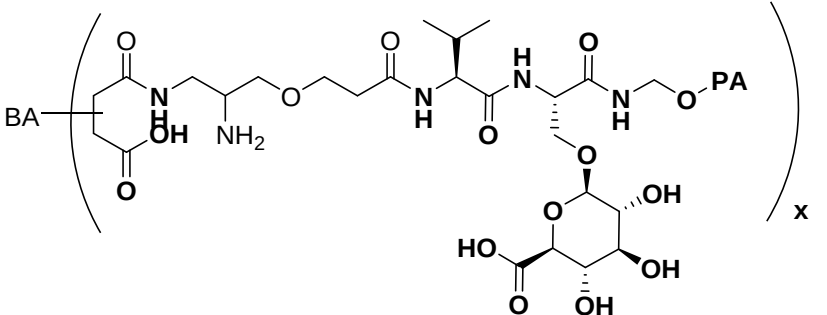
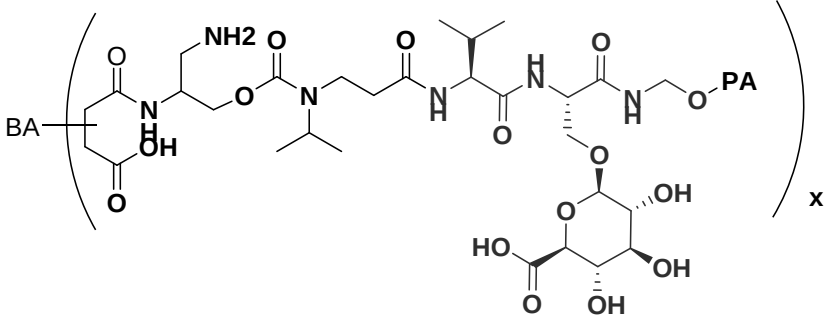
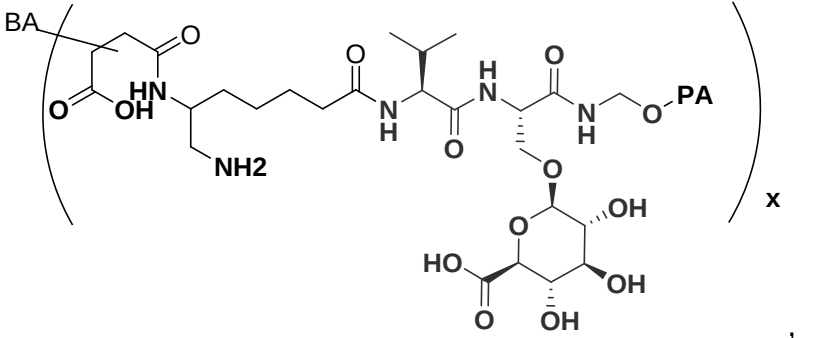


en donde los valores para las variables (por ejemplo, BA, PA, A, W, Y, a', w', y', x) son como se describió anteriormente.

6.2.2. Aspecto 2

En algunas formas de realización, el compuesto ADC está representado por una de las siguientes fórmulas, o una sal, solvato y/o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo:

Nro.	Estructura
ADC4-7o'	$\left(\text{BA} - \left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{N}(\text{A}_{a'}) - \text{W}_{w'} - \text{Y}_{y'} - \text{PA} \end{array} \right) \right)_x$

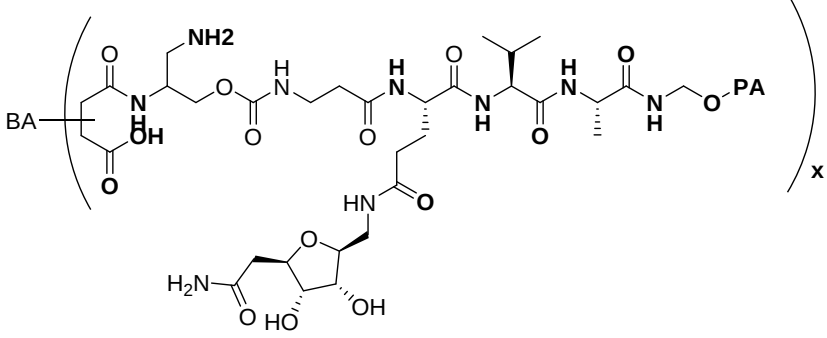
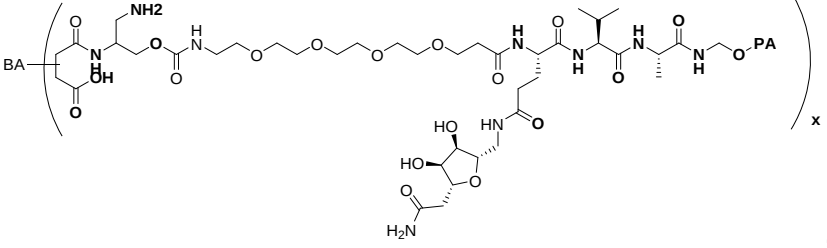
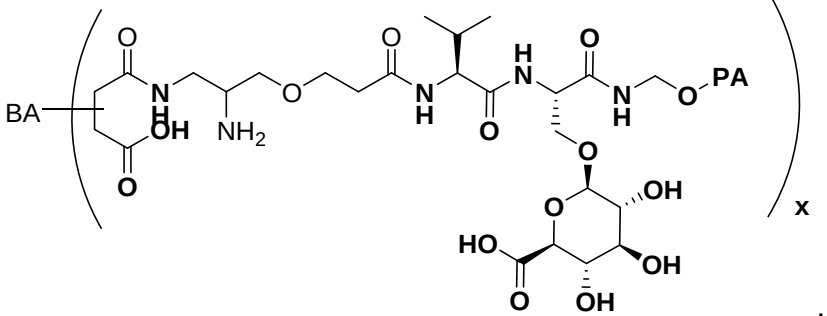
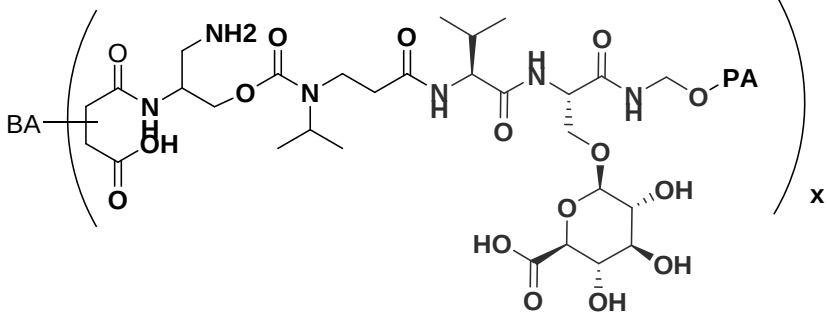
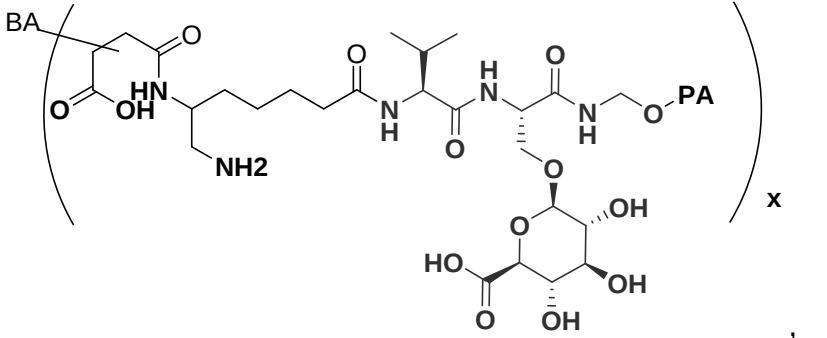
ADC4-8o'	
ADC4-9o'	
ADC4-10o'	
ADC4-11o'	
ADC4-12o'	

ADC4-13o'	
ADC4-14o'	
ADC4-16o'	

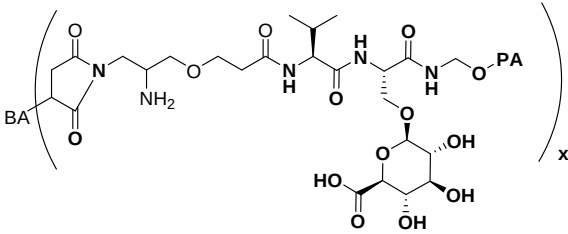
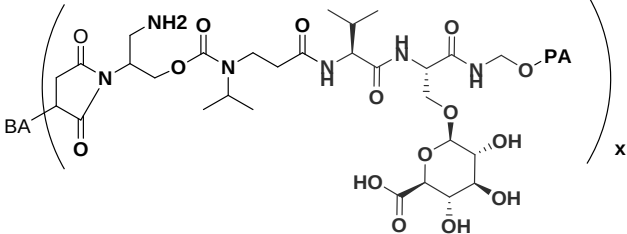
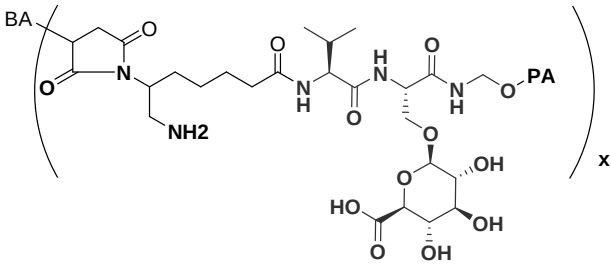
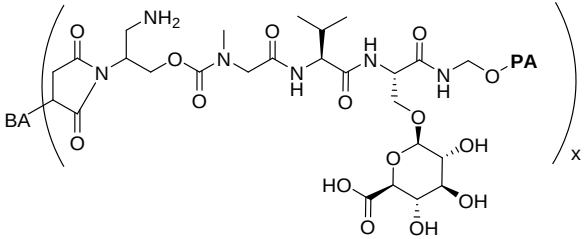
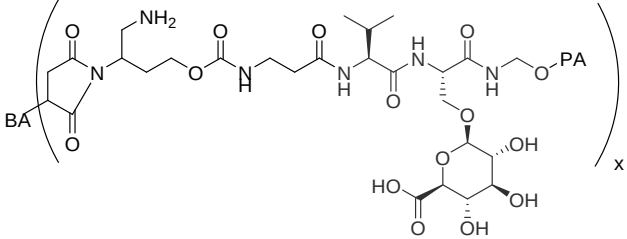
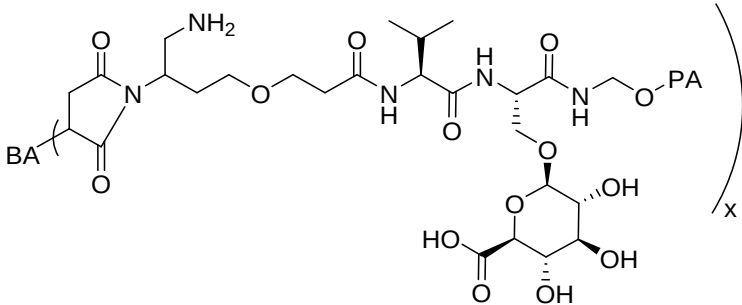
en donde BA es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el subíndice x es de 1 a 15, y PA es como se describió antes en el Aspecto 1. Los valores alternativos para BA son como se establece en el presente documento, por ejemplo, con respecto al Aspecto 1. Los valores alternativos para la variable subíndice x son como se establece en el presente documento, por ejemplo, con respecto a los compuestos de Fórmula (I).

En algunas formas de realización, el compuesto ADC está representado por una de las siguientes fórmulas, o una sal, solvato y/o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo:

Nro.	Estructura
ADC4-7o'	

ADC4-8o'	
ADC4-9o'	
ADC4-10o'	
ADC4-11o'	
ADC4-12o'	

ADC4-13o'	
ADC4-14o'	
ADC4-16o'	
ADC4-7'	
ADC4-8'	
ADC4-9'	

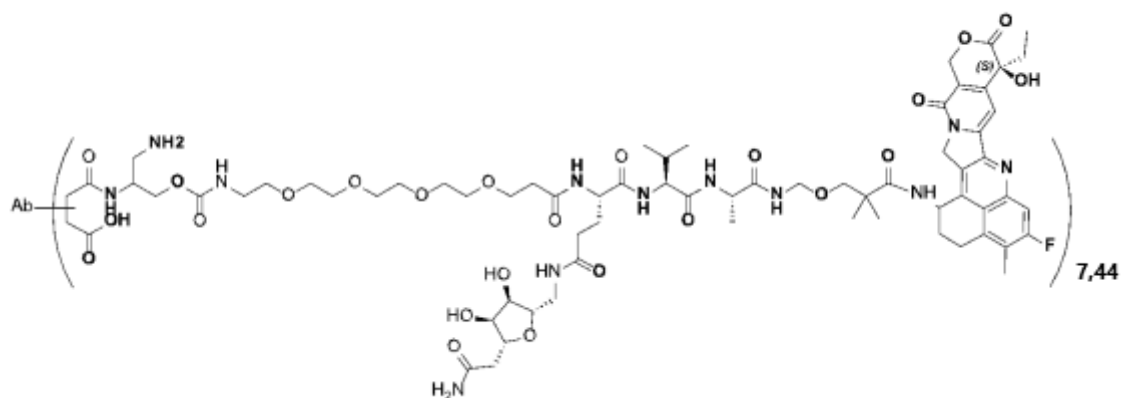
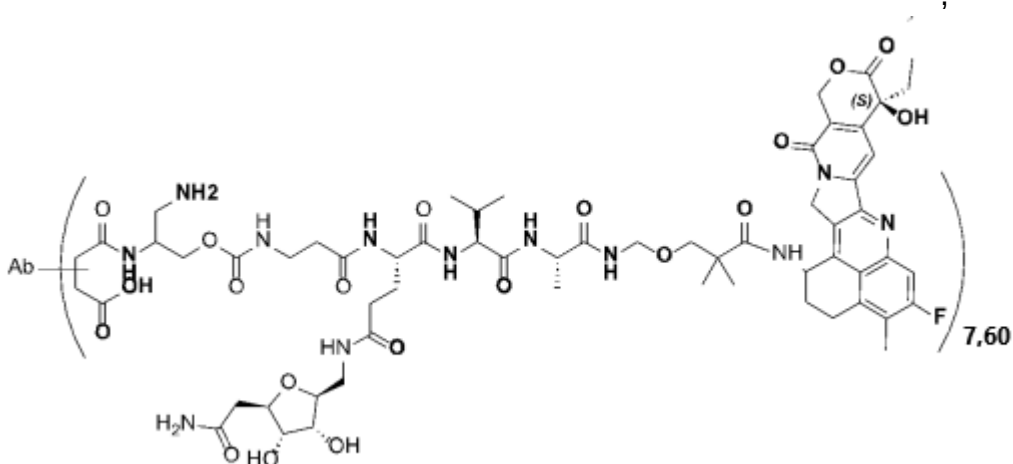
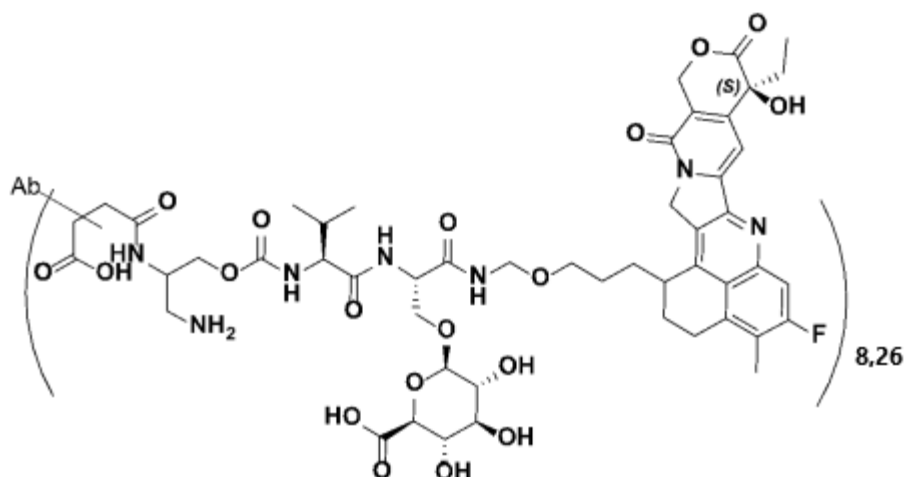
ADC4-10'		,
ADC4-11'		,
ADC4-12'		,
ADC4-13'		,
ADC4-14'		, 0
ADC4-16'		,

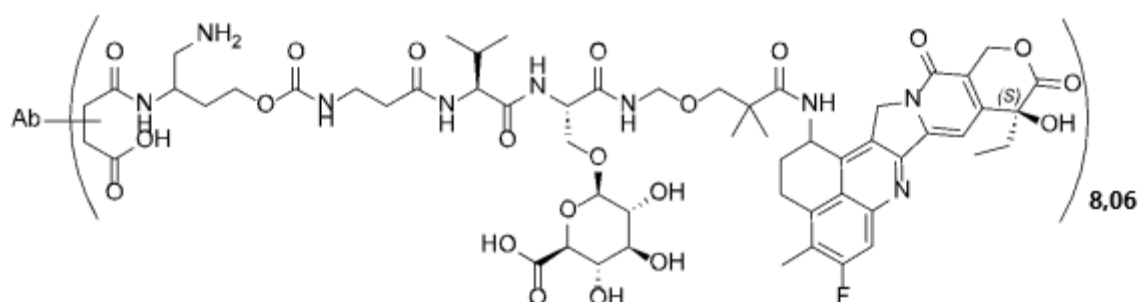
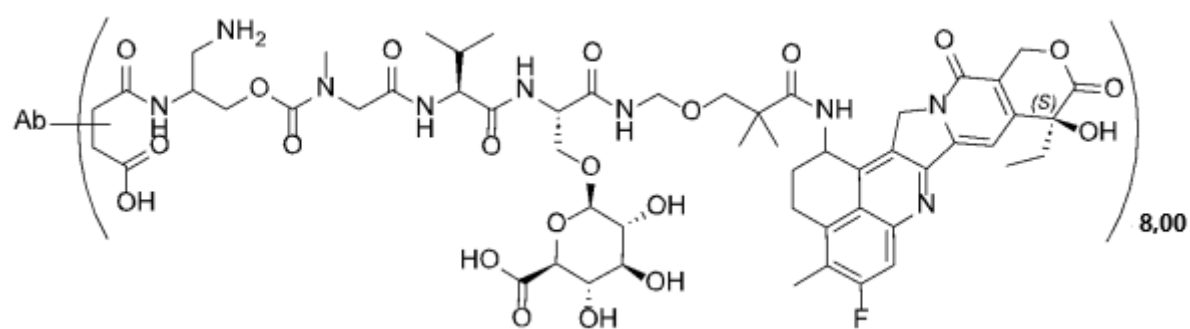
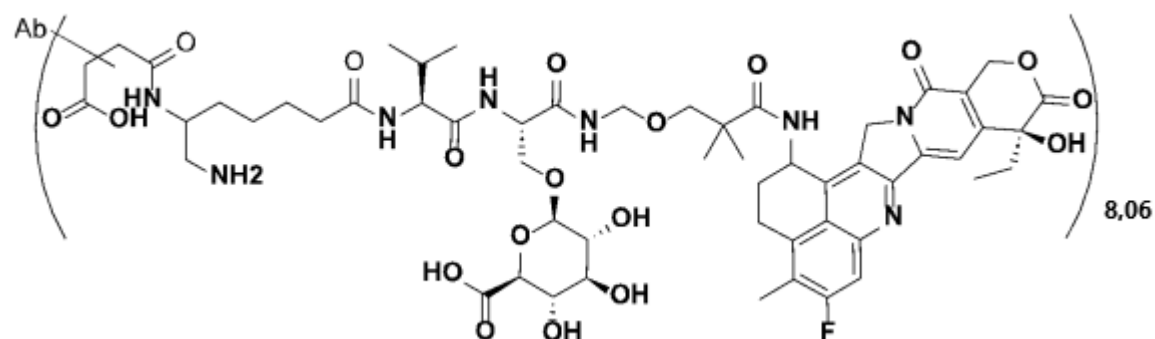
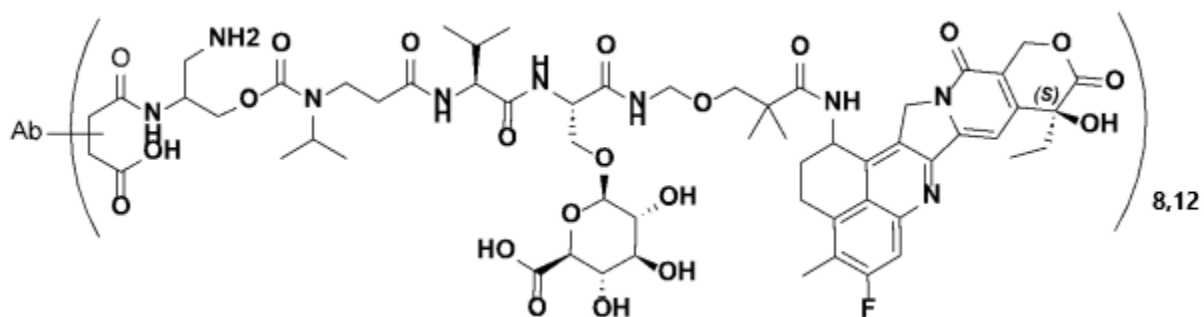
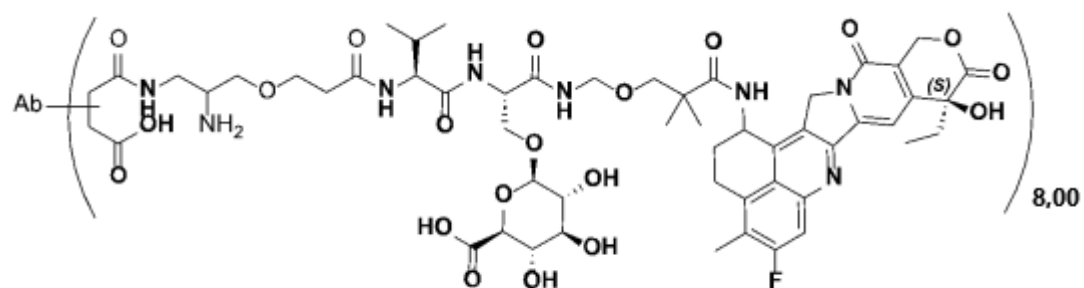
en donde BA es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el subíndice x es de 1 a 15, y PA es como se describió antes en el Aspecto 1. Los valores alternativos para BA son como se establece en el presente documento, por ejemplo, con respecto al Aspecto 1. Los valores alternativos para la variable subíndice x son como se establece en el presente documento, por ejemplo, con respecto a

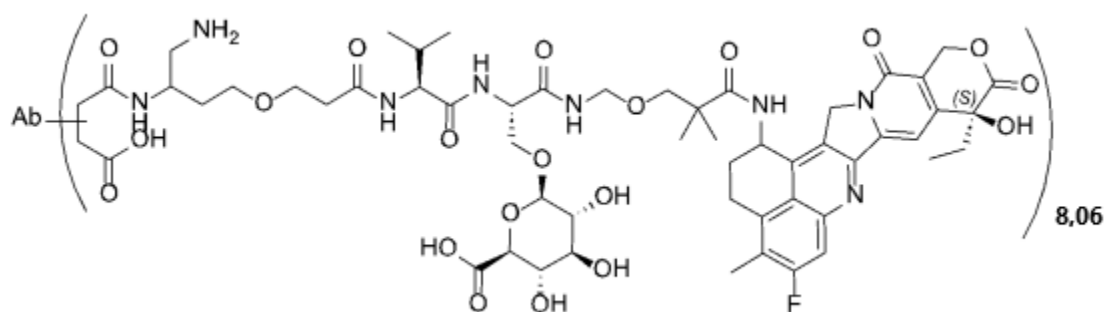
los compuestos de Fórmula (I).

6.2.3. Aspecto 3

En algunas formas de realización, el compuesto ADC está representado por una de las siguientes fórmulas, o una sal, solvato y/o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo:







en donde Ab es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas formas de realización, Ab es ifinatamab.

En algunas formas de realización, el compuesto ADC está representado por una de las siguientes fórmulas, o una sal, solvato y/o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo:

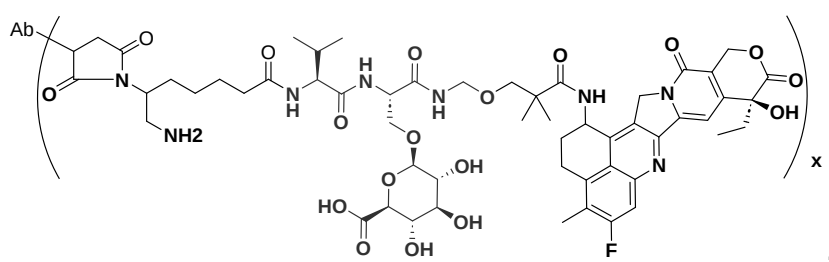
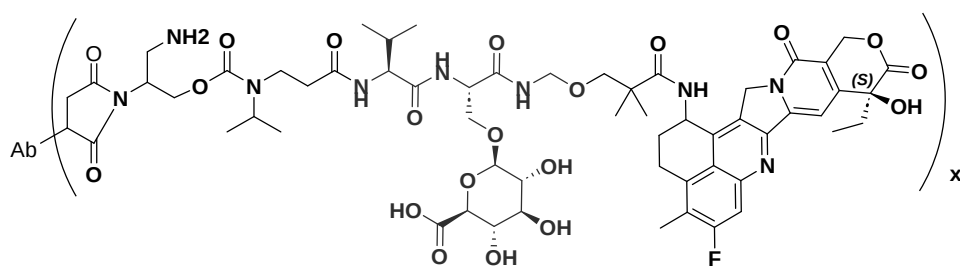
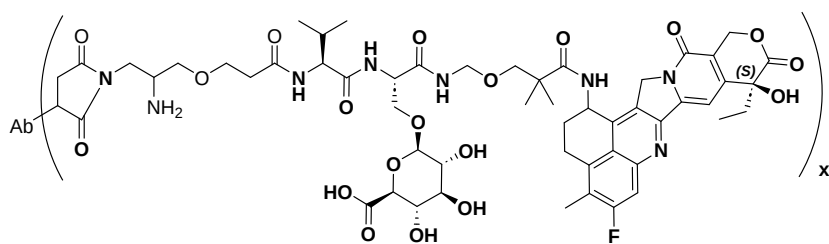
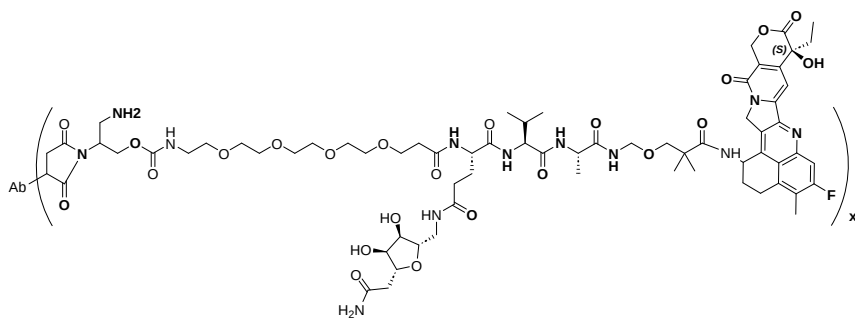
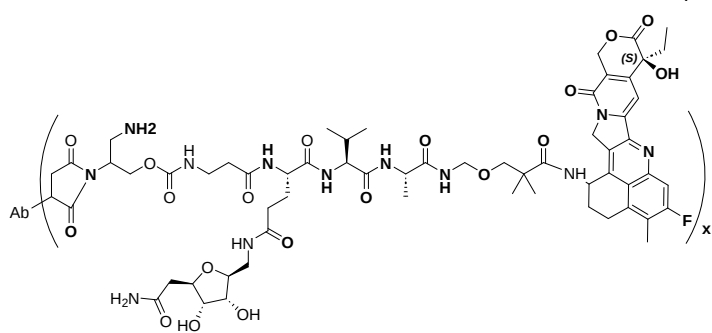
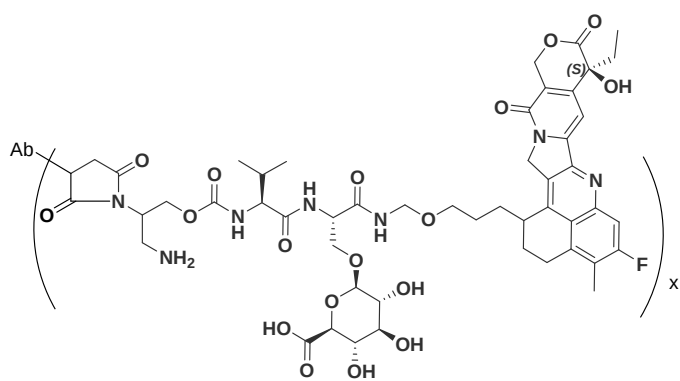
Nro.	Estructura
ADC4-7o	
ADC4-8o	
ADC4-9o	

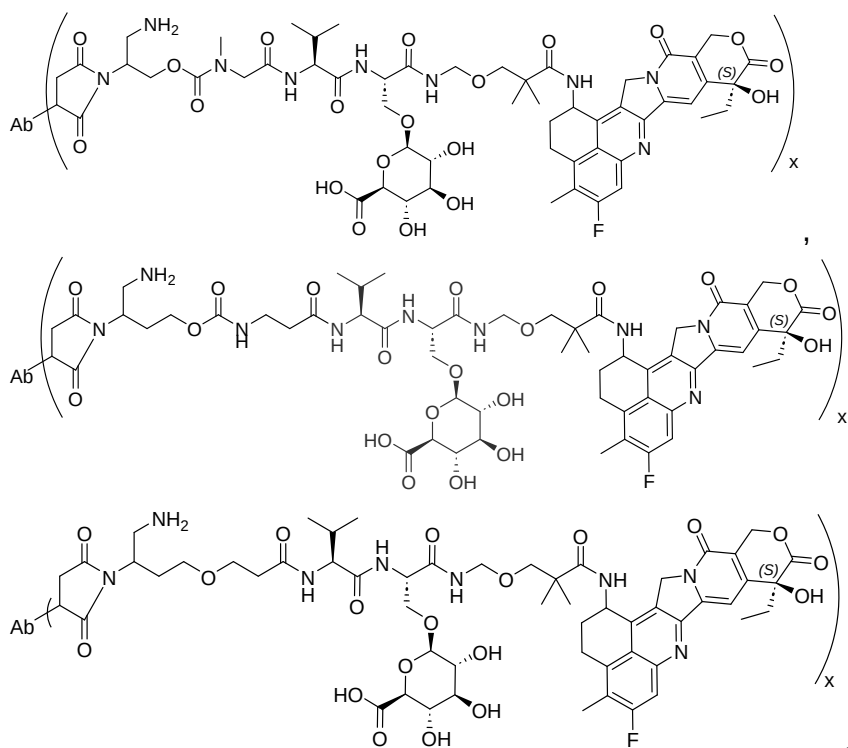
ADC4-10o	
ADC4-11o	
ADC4-12o	
ADC4-13o	
ADC4-14o	
ADC4-16o	

en donde Ab es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas formas de realización, Ab es ifinatamab.

En algunas formas de realización, el compuesto ADC está representado por una de las siguientes fórmulas, o una sal, solvato y/o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo:





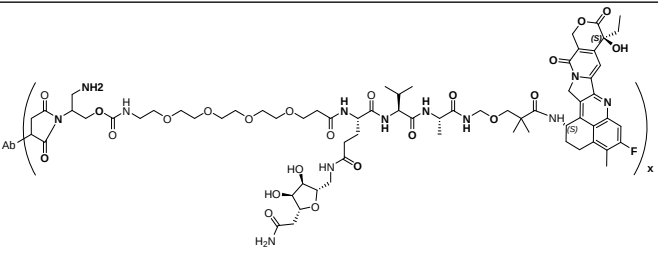
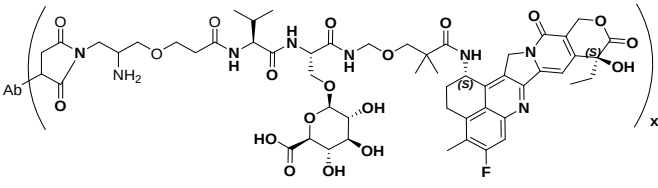
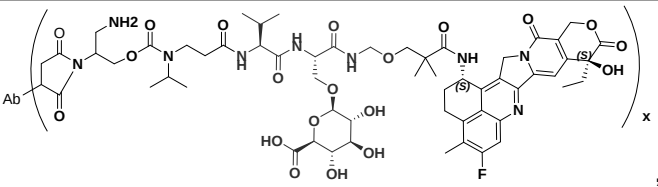
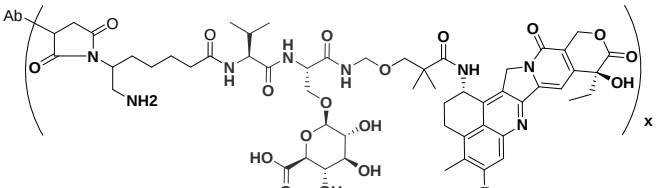
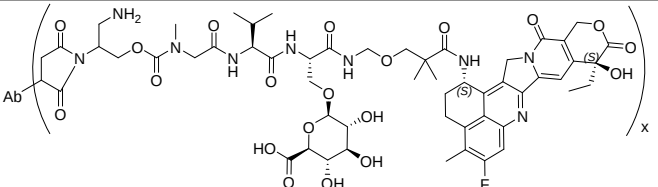
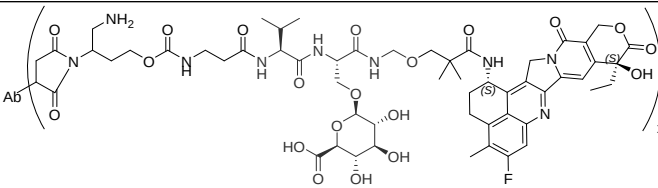
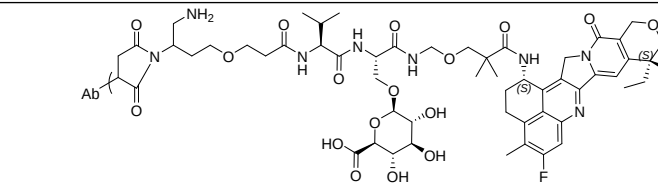
0

en donde Ab es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y x es de 1 a 15.

En algunas formas de realización, Ab es ifinatamab.

En algunas formas de realización, el compuesto ADC está representado por una de las siguientes fórmulas, o una sal, solvato y/o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo:

Nro.	Estructura
ADC4-7	
ADC4-8	

ADC4-9	
ADC4-10	
ADC4-11	
ADC4-12	
ADC4-13	
ADC4-14	
ADC4-16	

en donde Ab es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y x es de 1 a 15.

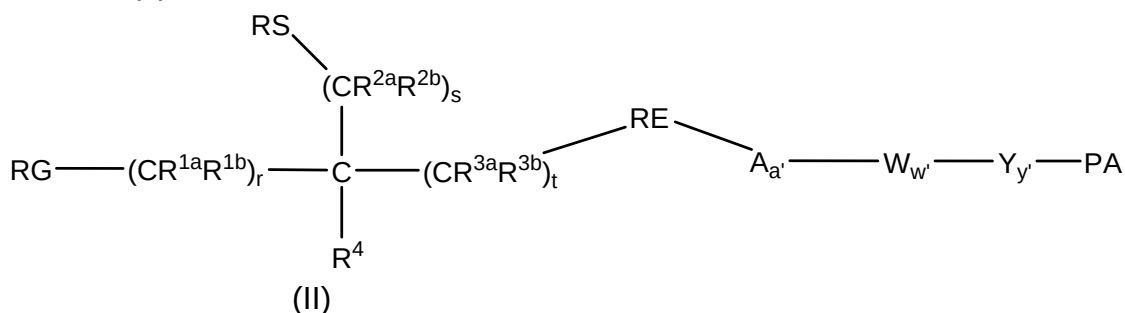
En algunas formas de realización, Ab es ifinatamab.

6.2.4. Aspecto 4

Asimismo en el presente documento se proporcionan plataformas, por ejemplo, para usar en la preparación de un ADC, tal como un ADC descrito en el presente documento.

En algunas formas de realización, la plataforma es un compuesto enlazador-carga útil de

Fórmula (II):



o una sal, tautómero, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, RG es un grupo reactivo;

RS es un grupo estabilizante de anillo abierto;

RE es un potenciador de anillo abierto;

cada uno de R^{1a} y R^{1b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{1a} y R^{1b} junto con el átomo al cual están unidos forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;

cada uno de R^{2a} y R^{2b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{2a} y R^{2b} junto con el átomo al cual están unidos forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;

cada uno de R^{3a} y R^{3b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{3a} y R^{3b} junto con el átomo al cual están unidos forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;

R^4 es H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; o cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;

cada uno de r, s, y t es, independientemente, 0, 1 o 2;

A es un residuo de unidad de extensión;

el subíndice a' es 0 o 1;

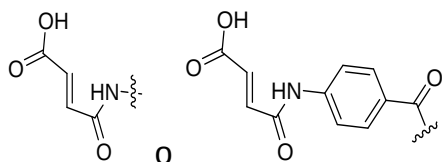
W es una unidad escindible;

el subíndice w' es 0 o 1;

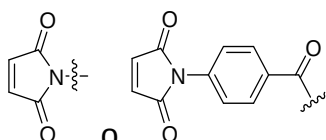
Y es una unidad espaciadora;

el subíndice y' es 0 o 1; y

PA es un residuo de carga útil.



En algunas formas de realización, RG es



En algunas formas de realización, RG es

En algunas formas de realización, cada uno de R^{1a} , R^{1b} , R^{2a} , R^{2b} , R^{3a} , R^{3b} , y R^4 es, independientemente, H.

En algunas formas de realización, RS es un grupo amino, o $-\text{NR}^{5a}\text{R}^{5b}$, en donde cada uno de R^{5a} y R^{5b} es, independientemente, H, o alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido.

En algunas formas de realización, RS es un grupo amino, o $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

En algunas formas de realización, RS es un grupo amino.

En algunas formas de realización, RE es un enlace, $-\text{O}-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^6-$, $-$

NHC(=O)NR^6- , $-\text{OS(=O)}_2\text{NR}^6-$, $-\text{NHS(=O)}_2\text{NR}^6-$ o $-\text{OC(=O)NHS(=O)}_2\text{NR}^6-$; y R^6 es H o alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido.

En algunas formas de realización, R^6 es H, metilo, etilo o isopropilo.

En algunas formas de realización, RE es $-\text{OC(=O)NR}^6-$.

En algunas formas de realización, RE es $-\text{OC(=O)NH}-$.

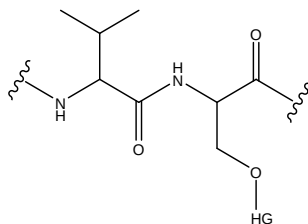
En algunas formas de realización, r es 0.

En algunas formas de realización, s es 1.

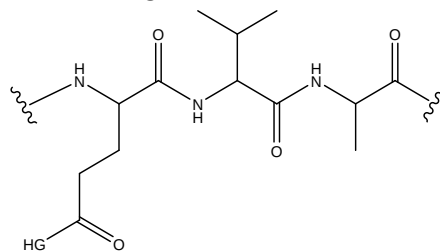
En algunas formas de realización, t es 1 o 2.

En algunas formas de realización, A es un enlace, $-(\text{CH}_2)_n-\text{C(=O)}-$, $-\text{CH}_2-\text{C(=O)}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{C(=O)}-$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C(=O)}-$, $-\text{CH}[-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}]-\text{C(=O)}-$, $-\text{CH}_2-\text{C(=O)}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{C(=O)}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{C(=O)}-$ o $-\text{C(=O)}-(\text{CH}_2)_n-\text{C(=O)}-$, en donde cada n representa independientemente un número entero de 1, 2, 3, 4 o 5.

En algunas formas de realización, $\text{W}_{\text{w'}}$ es una de las siguientes fórmulas:



Fórmula (Ia), o

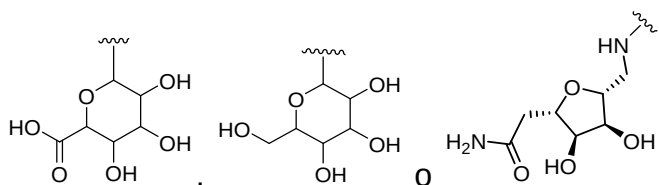


Fórmula (Ib),

y HG es un resto hidrófilo o hidrógeno.

En algunas formas de realización, HG es un sacárido, fosfato éster, sulfato éster, un fosfodiéster o un fosfonato.

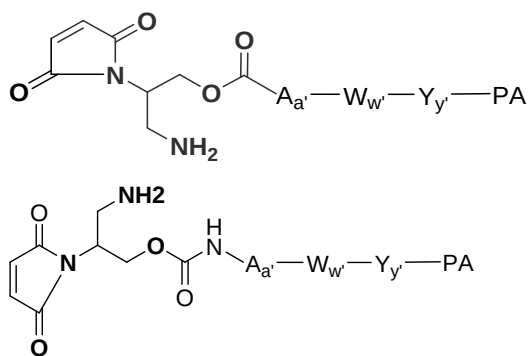
En algunas formas de realización, el sacárido, y el sacárido es β -D-galactosa, N-acetil-P-D-galactosamina, N-acetil- α -D-galactosamina, N-acetil-P-D-glucosamina, ácido β -D-glucurónico, ácido α -L-idurónico, α -D-galactosa, α -D-glucosa, β -D-glucosa, α -D-manosa, β -D-manosa, α -L-fucosa, β -D-xilosa, un ácido neuramínico, sulfato, fosfato, carboxilo, amino, o una modificación O-acetilo de los mismos. En algunas formas de realización, HG se selecciona de β -D-galactosa y ácido β -D-glucurónico.

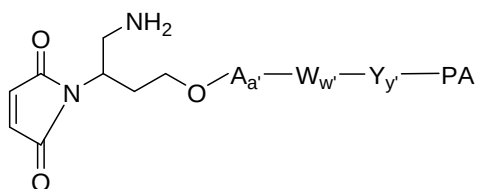
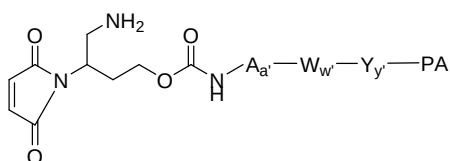
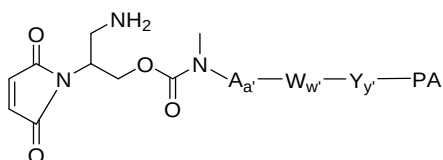
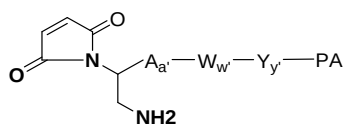
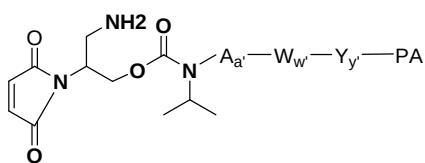
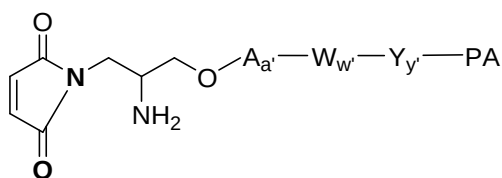


En algunas formas de realización, HG es

En algunas formas de realización, $\text{Y}_{\text{y'}}$ es una unidad PAB.

En algunas formas de realización, el compuesto tiene la siguiente fórmula:



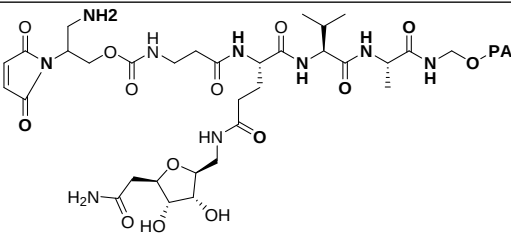
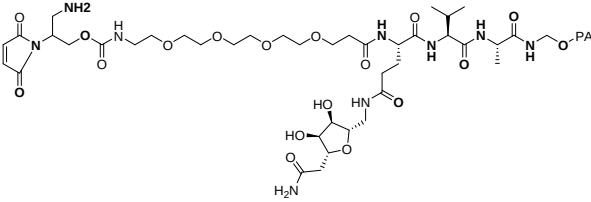
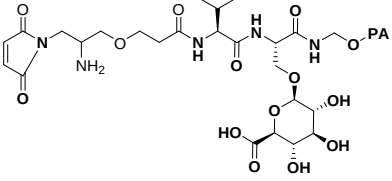
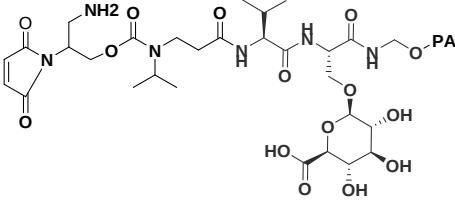
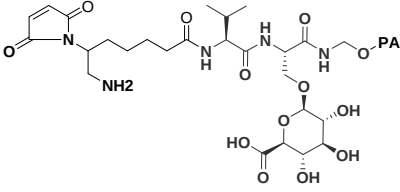
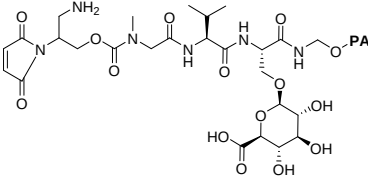
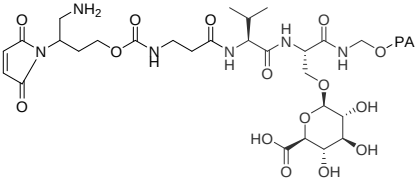


en donde los valores para las variables (por ejemplo, BA, PA, A, W, Y, a', w', y', x) son como se describió anteriormente.

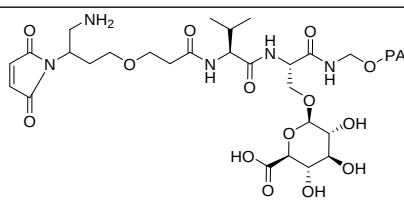
6.2.5. Aspecto 5

En algunas formas de realización, el compuesto enlazador-carga útil está representado por una de las siguientes fórmulas, o una sal, solvato y/o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo:

Nro.	Estructura
LP 4-7	

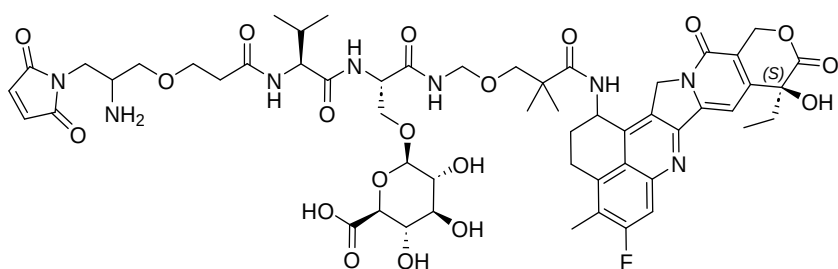
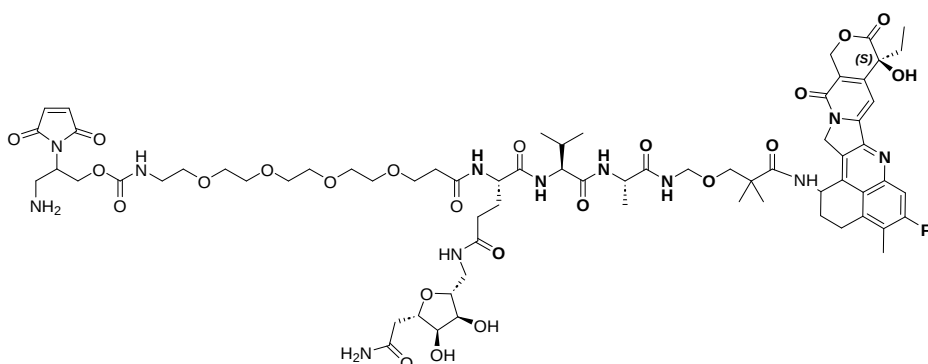
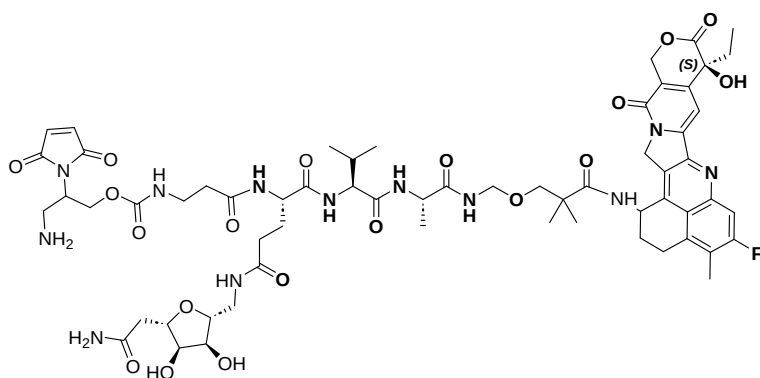
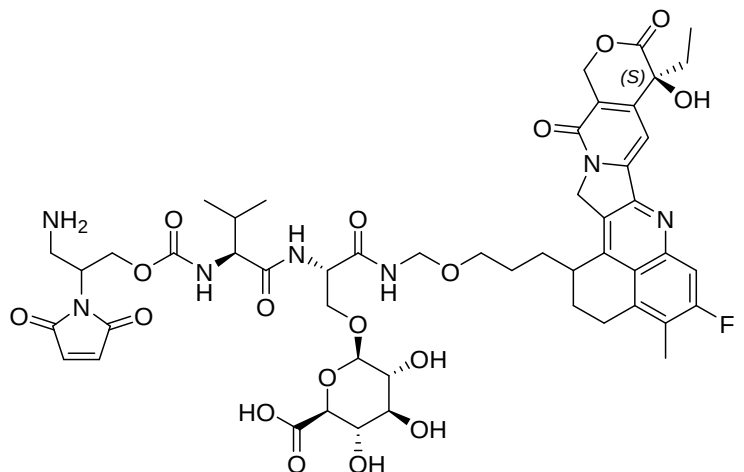
LP 4-8	
LP 4-9	
LP 4-10	
LP 4-11	
LP 4-12	
LP 4-13	
LP 4-14	

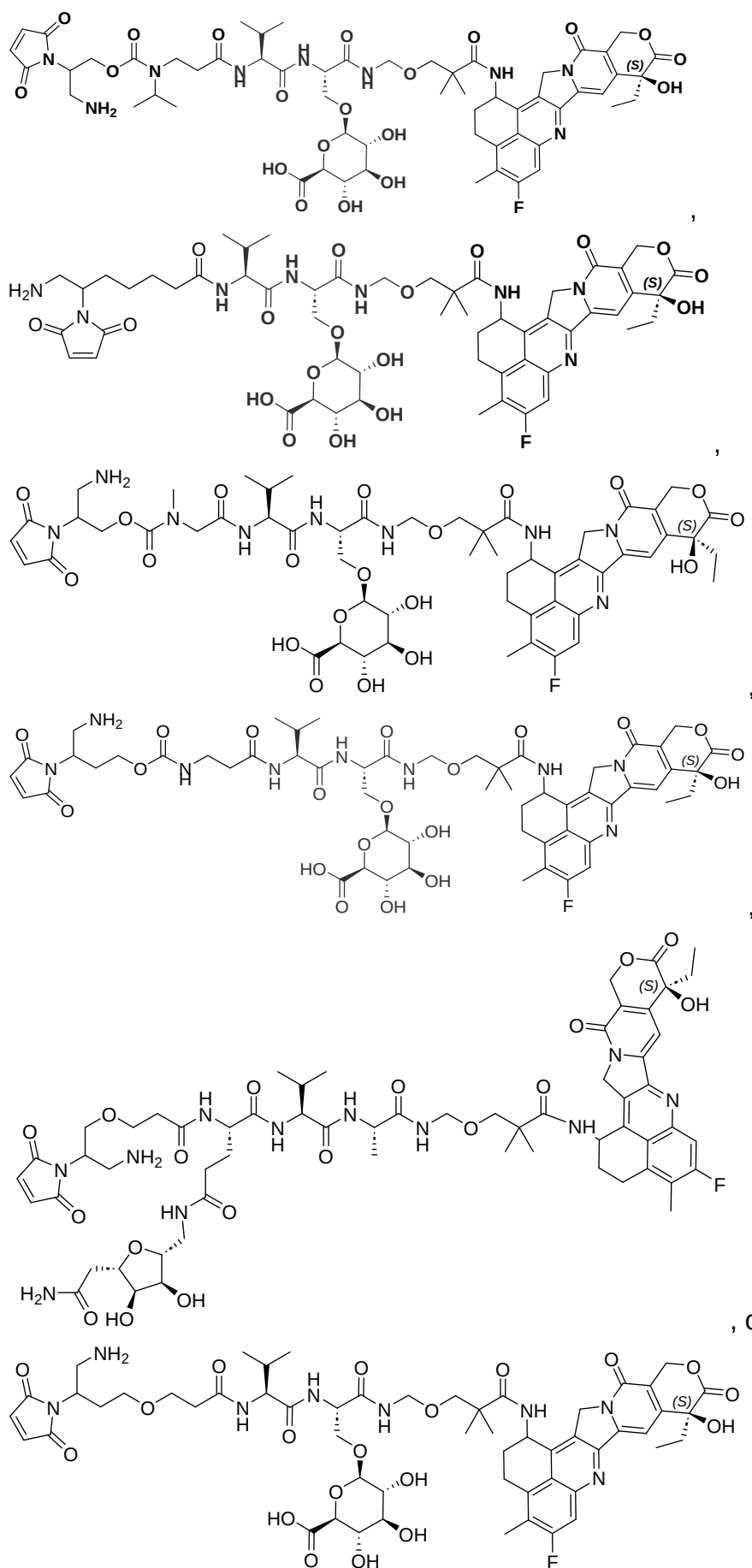
LP 4-16



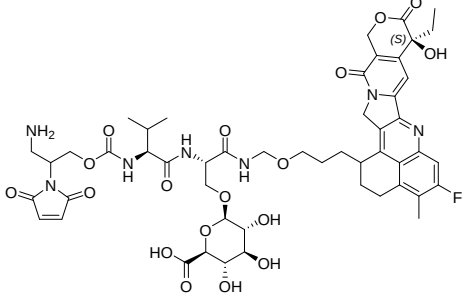
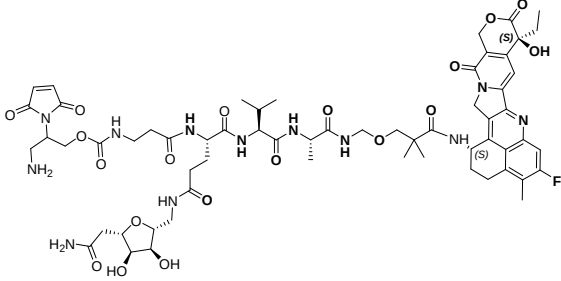
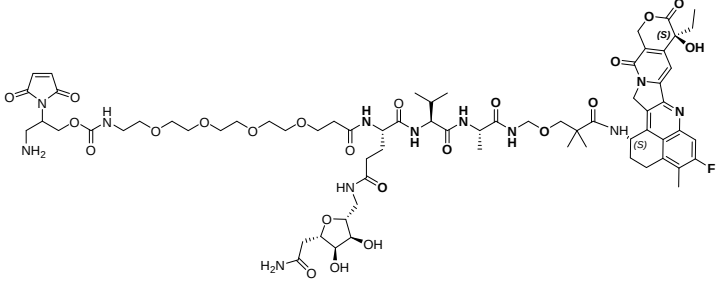
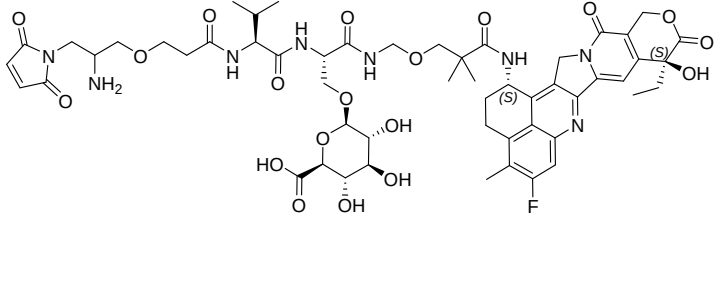
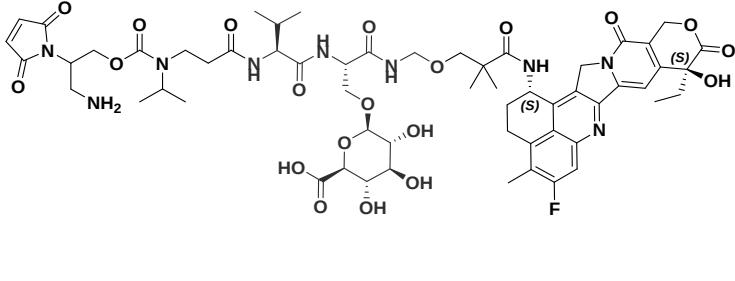
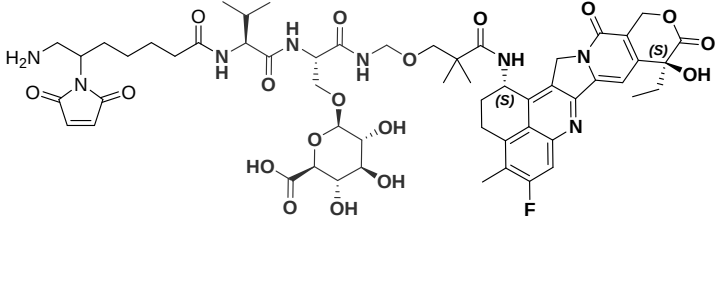
en donde PA es como se describió antes para el Aspecto 1.

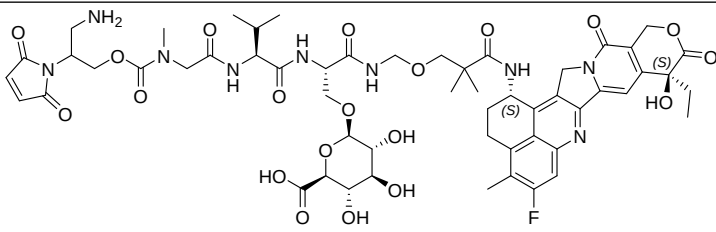
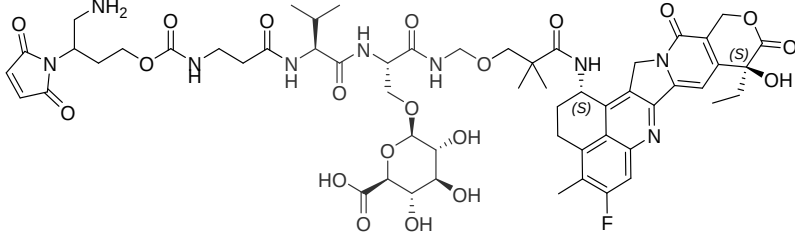
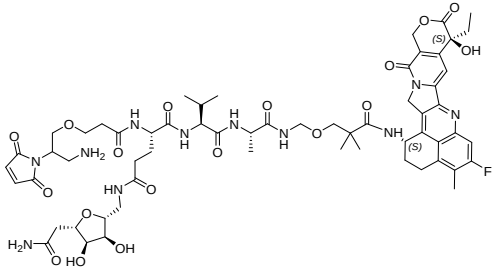
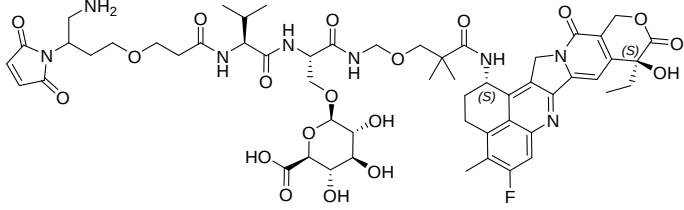
En algunas formas de realización, el compuesto enlazador-carga útil es cualquiera de los siguientes, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos:





En algunas formas de realización, el compuesto enlazador-carga útil es cualquiera de los siguientes, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos:

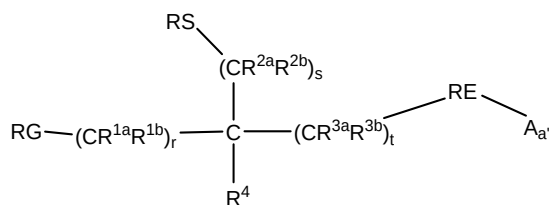
Nro.	Estructura
2-7	
2-8	
2-9	
2-10	
2-11	
2-12	

2-13	
2-14	
2-15	
2-16	

6.2.6. Aspecto 6

Asimismo, en el presente documento se proporcionan enlazadores covalentes, por ejemplo, para usar en una plataforma y/o ADC descrito en el presente documento.

En algunas formas de realización (por ejemplo, de un enlazador para usar en una plataforma), el enlazador es un compuesto de Fórmula (III):



(III)

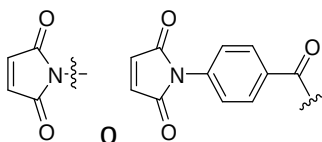
o una sal, tautómero, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, RG es un grupo reactivo;

RS es un grupo estabilizante de anillo abierto;

RE es un potenciador de anillo abierto;

cada uno de R^{1a} y R^{1b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{1a} y R^{1b} junto con el átomo al cual están unidos

forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;
 cada uno de R^{2a} y R^{2b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido;
 cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{2a} y R^{2b} junto con el átomo al cual están unidos
 forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;
 cada uno de R^{3a} y R^{3b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido;
 cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{3a} y R^{3b} junto con el átomo al cual están unidos
 forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;
 R^4 es H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; o cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido;
 cada uno de r, s y t es, independientemente, 0, 1 o 2;
 A es una unidad de extensión; y
 el subíndice a' es 0 o 1.



En algunas formas de realización, RG es

En algunas formas de realización, cada uno de R^{1a} , R^{1b} , R^{2a} , R^{2b} , R^{3a} , R^{3b} , y R^4 es, independientemente, H.

En algunas formas de realización, RS es un grupo amino o $-NR^{5a}R^{5b}$, en donde cada uno de R^{5a} y R^{5b} es, independientemente, H, o alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido.

En algunas formas de realización, RS es un grupo amino o $-N(CH_3)_2$.

En algunas formas de realización, RS es un grupo amino.

En algunas formas de realización, RE es un enlace, $-O-$, $-OC(=O)-$, $-OC(=O)NR^6-$, $-NHC(=O)NR^6-$, $-OS(=O)_2NR^6-$, $-NHS(=O)_2NR^6-$ o $-OC(=O)NHS(=O)_2NR^6-$; y R^6 es H o alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido.

En algunas formas de realización, R^6 es H, metilo, etilo o isopropilo.

En algunas formas de realización, RE es $-OC(=O)NR^6-$.

En algunas formas de realización, RE es $-OC(=O)NH-$.

En algunas formas de realización, r es 0.

En algunas formas de realización, s es 1.

En algunas formas de realización, t es 1 o 2.

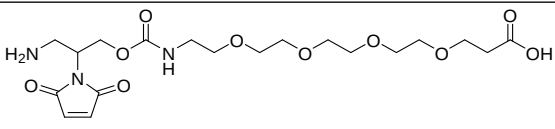
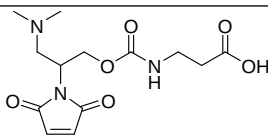
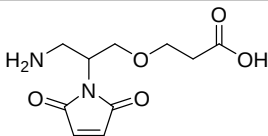
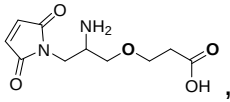
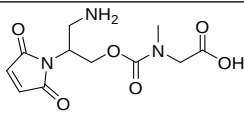
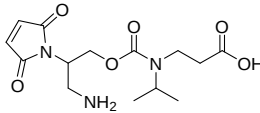
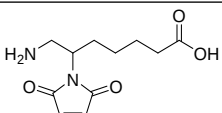
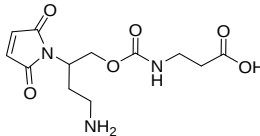
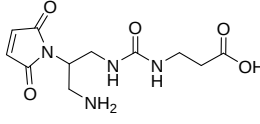
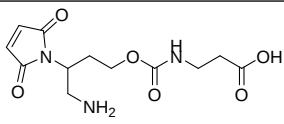
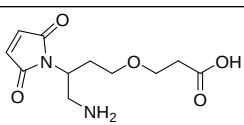
En algunas formas de realización, A es un enlace, $-(CH_2)_n-C(=O)R^7$, $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_n-C(=O)R^7$, $-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-C(=O)R^7$, $-CH[-(CH_2)_n-COOH]-C(=O)R^7$, $-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_n-C(=O)R^7$ o $-C(=O)-(CH_2)_n-C(=O)R^7$, en donde cada n representa independientemente un número entero de 1, 2, 3, 4 o 5; R^7 es OH o $NR^{8a}R^{8b}$; y cada uno de R^{8a} y R^{8b} es, independientemente, H; alquilo C_{1-4} sustituido o insustituido; cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido; o R^{8a} y R^{8b} junto con el átomo al cual están unidos forman un cicloalquilo C_{3-5} sustituido o insustituido.

En algunas formas de realización, R^7 es OH, NH_2 , $NHCH_3$ o $N(CH_3)_2$.

6.2.7. Aspecto 7

En algunas formas de realización, el compuesto enlazador es cualquiera de los siguientes, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos:

Nro.	Estructura
1-2	

1-4	 ,
1-5	 ,
1-6	 ,
1-7	 ,
1-8	 ,
1-9	 ,
1-10	 ,
1-11	 ,
1-12	 ,
1-13	 , 0
1-14	 .

6.3. Métodos o procesos para preparar los conjugados

En el presente documento se proporcionan métodos para preparar un conjugado poniendo en contacto un agente de unión (BA) con un compuesto enlazador-carga útil en condiciones adecuadas para formar un enlace entre el agente de unión y el compuesto enlazador-carga

útil. Las condiciones de reacción pueden ser cualquier condición de reacción adecuada conocida en la técnica. El agente de unión puede ser un anticuerpo y el enlace puede formar un conjugado anticuerpo-fármaco.

Se proporcionan ejemplos de tales reacciones en los Ejemplos siguientes.

En algunas formas de realización, los métodos para preparar un conjugado incluyen tratar o poner en contacto un compuesto con un agente de unión en condiciones de acoplamiento. El compuesto puede incluir un enlazador reactivo unido a al menos una carga útil. El compuesto puede ser cualquiera de los compuestos enlazadores o de plataforma divulgados en el presente documento.

6.4. Composiciones farmacéuticas

En el presente documento también se proporcionan composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un ADC establecido en el presente documento. En algunas formas de realización, las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) comprenden además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación se pueden preparar mezclando un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, aunque no a modo de limitación, tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecil dimetil bencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenol, butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en la presente memoria incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas de hialuronidasa neutra-activa soluble (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP y métodos de uso ejemplares, incluyendo rHuPH20, se describen en las patentes estadounidenses números US 7.871.607 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales como condroitinasas.

En la patente de EE. UU. nº 6.267.958 se describen formulaciones liofilizadas ejemplares. Las formulaciones acuosas incluyen las descritas en las patentes estadounidenses nº 6.171.586 y WO2006/044908, donde estas últimas formulaciones incluyen un tampón de acetato de histidina.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el conjugado de fármaco–anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *en vivo* son generalmente estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

6.5. Métodos de uso

En algunas formas de realización, se establece en el presente documento un método para tratar una enfermedad o trastorno (por ejemplo, un cáncer) en un sujeto (por ejemplo, paciente) que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un ADC divulgado en este documento.

Los conjugados de anticuerpo–fármaco divulgados en el presente documento se pueden administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyección, como inyección intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversos esquemas de dosificación, incluyendo, aunque sin limitación, administraciones únicas o múltiples en distintos momentos, administración en bolo e infusión en pulsos.

Los conjugados de anticuerpo–fármaco de la divulgación se pueden formular, dosificar y administrar de una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los médicos.

7. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos pretenden ser ejemplares y no deben considerarse limitantes de ninguna manera. A menos que se especifique lo contrario, los métodos experimentales en los Ejemplos que se describen a continuación son métodos convencionales. A menos que se especifique lo contrario, los reactivos y materiales están disponibles comercialmente. Todos los solventes y productos químicos empleados fueron de grado analítico o pureza química. Los solventes se redestilaron antes de su uso. Los solventes anhidros se prepararon según métodos estándar o métodos de referencia. El gel de sílice (mallas 100–200) para cromatografía en columna y el gel de sílice (GF254) para cromatografía en capa fina (TLC) están disponibles comercialmente en Tsingdao Haiyang Chemical Co., Ltd. o Yantai Chemical Co., Ltd. de China; todos se eluyeron con éter de petróleo (60–90 °C)/acetato de etilo (v/v) y se visualizaron con yodo o la solución de ácido molibdfosfórico en etanol, a menos que se especifique lo contrario. Todos los solventes de extracción, a menos que se especifique lo contrario, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Los espectros de ¹H RMN se registraron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Varian 400MR Bruck–400 con TMS (tetrametilsilano) como estándar interno. Las constantes de acoplamiento se dieron en hercios. Los picos se reportaron como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), quinteto (p), sexteto (h), septeto (hept), multiplete (m), o una

combinación de los mismos; br significa amplio. Los datos de LC/MS se registraron utilizando un espectrómetro de masas con trampa de iones y cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent1100,1200 (trampa LC–MSD) equipado con un detector de matriz de diodos (DAD) detectado a 214 nm y 254 nm, y una trampa de iones (fuente ESI). Todos los nombres de los compuestos, excepto los reactivos, fueron generados por ChemDraw® 18.0. En aras de la concisión, en el presente documento se utilizan ciertas abreviaturas. Un ejemplo es la abreviatura de una sola letra para representar un aminoácido. Los aminoácidos y sus correspondientes abreviaturas de tres letras y una sola letra son las siguientes:

alanina	Ala	(A)
arginina	Arg	(R)
asparagina	Asn	(N)
ácido aspártico	Asp	(D)
cisteína	Cys	(C)
ácido glutámico	Glu	(E)
glutamina	Gln	(Q)
glicina	Gly	(G)
histidina	His	(H)
isoleucina	Ile	(I)
leucina	Leu	(L)
lisina	Lys	(K)
metionina	Met	(M)
fenilalanina	Phe	(F)
prolina	Pro	(P)
serina	Ser	(S)
treonina	Thr	(T)
triptófano	Trp	(W)
tirosina	Tyr	(Y)
valina	Val	(V)

En los siguientes ejemplos, se usan las siguientes abreviaturas:

TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
MeOH	Metanol
HOBt	1–hidroxibenzotriazol
DIPEA	N,N–diisopropiletilamina
DMF	N,N–dimetilformamida
NH ₄ Cl	cloruro de amonio
LiOH	hidróxido de litio
HCl	ácido clorhídrico
TFA	ácido trifluoroacético
K ₂ CO ₃	carbonato de potasio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sodio
EtOAc	acetato de etilo

HPLC preparativa	cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa
Cu(OAc) ₂	acetato cúprico anhidro
Pb(OAc) ₄	tetraacetato de plomo
TSTU	2-succinimido-1,1,3,3-tetra-metiluronio tetraflúor
Et ₂ N	Dietilamina
t.a.	temperatura ambiente
MS	espectrometría de masas
ESI	ionización por pulverización de electrones
FA	ácido fórmico
MTBE	Metil ter-butil éter
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
FCC	cromatografía en columna instantánea
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DSC	carbonato de N,N'-disuccinimidilo
AcOH	ácido acético
Tol	Tolueno
DMA	Dimetilacetamida
DCM	Diclorometano
TBAB	bromuro de tetrabutilamonio
HATU	Hexafluorofosfato azabenzotriazol tetrametil uronio

Métodos de análisis por UPLC

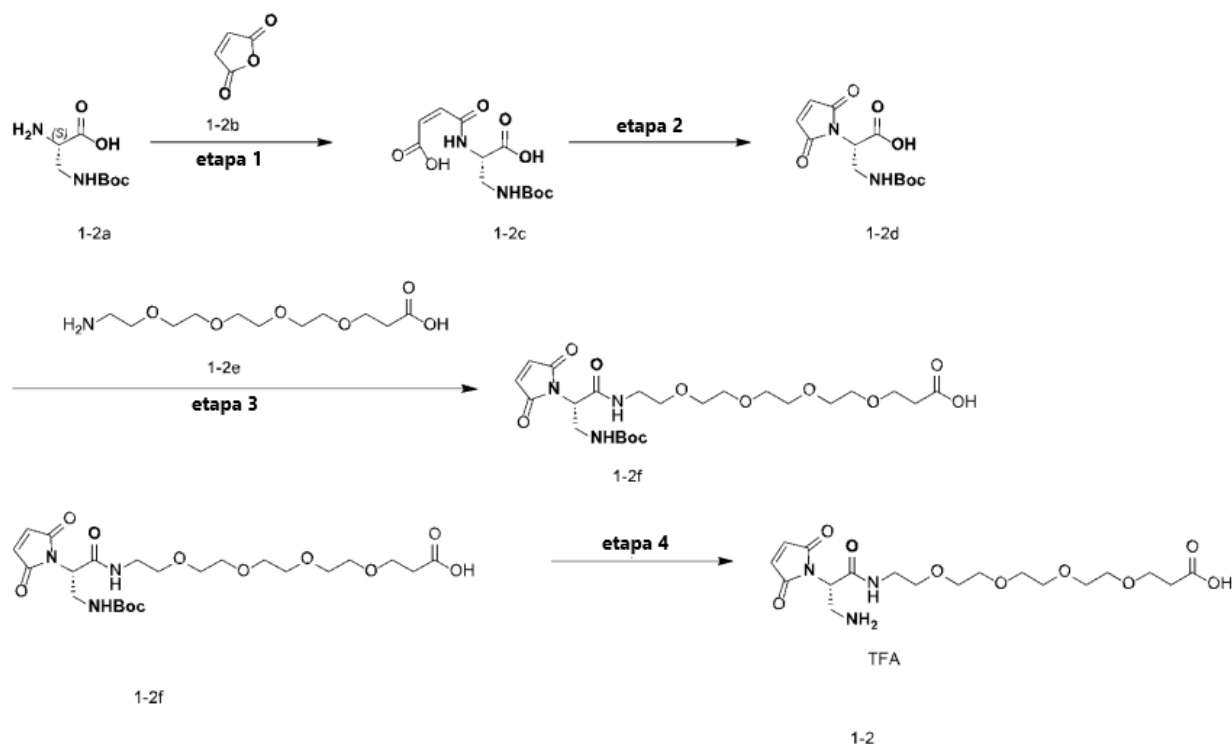
Método A: Fase móvil A: 0,1% FA en agua, B: MeCN; Gradiente: 10% B mantener 0,2 min, 10% – 95% B, 5,8 min, 95% B mantener 0,5 min; Velocidad de flujo: 0,6 ml/min; Columna: ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 µm.

Método B: Fase móvil A: 0,1% FA en agua, B: MeCN; Gradiente: 10% B mantener 0,5 min, 10% – 90% B, 2,5 min, 90% B mantener 0,2 min; Velocidad de flujo: 0,6 ml/min; Columna: ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 µm.

Método C: Fase móvil A: 0,1% FA en agua, B: MeCN; Gradiente: 10% B mantener 0,2 min, 10% – 90% B, 1,3 min, 90% B mantener 0,3 min; Velocidad de flujo: 0,6 ml/min; Columna: ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 µm.

Los compuestos **1-1** y **1-3** comercialmente disponibles se adquirieron de MedChemExpress.

Ejemplo 1-2



Paso 1: ácido (S,Z)-4-((2-((ter-butoxicarbonil)amino)-1-carboxietil)amino)-4-oxobut-2-enoico (**1-2c**)

Se preparó una mezcla de **1-2a** (445,0 mg, 2,18 mmol) y **1-2b** (213,7 mg, 2,18 mmol) en ácido acético glacial (10 ml). La mezcla se agitó a t.a. durante 2,5 hr. Se agregó DCM/hexano (1:1, 30 ml) a la mezcla de reacción, luego un sólido blanco se precipitó, se filtró, y el sólido se coevaporó con Tol dos veces para eliminar el AcOH para proporcionar **1-2c** (530 mg, ~80,4% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 301,2 [M-H].

Paso 2: ácido (S)-3-((ter-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico (**1-2d**)

A una suspensión de **1-2c** (530 mg, 1,75 mmol) en Tol (18 ml) y DMA (1 ml) se le agregó TEA (532,3 mg, 5,26 mmol) y tamices moleculares 4Å, y luego la mezcla se calentó hasta 120 °C y se agitó a esta temperatura durante 4 hr. La mezcla se concentró al vacío para eliminar el Tol, y luego se purificó por HPLC preparativa (FA). La fracción se liofilizó para proporcionar **1-2d** (201 mg, 40,3% de rendimiento) en forma de polvo blanco.

MS (ESI) m/z: 304,3 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 7,09 (s, 2H), 6,99 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 4,60 (dd, J = 10,8, 4,0 Hz, 1H), 3,59–3,53 (m, 1H), 3,46–3,38 (m, 1H), 1,32 (s, 9H).

Paso 3: ácido (S)-7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2,2-dimetil-4,8-dioxo-3,12,15,18,21-pentaoxa-5,9-diazatetracosan-24-oico (**1-2f**)

A una solución de **1-2d** (25 mg, 0,09 mmol) en DMF (1 ml) se le agregó TSTU (26,5 mg, 0,09 mmol) y DIPEA (45,5 mg, 0,35 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 10 min. **1-2d** se convirtió en éster activo. Se agregó **1-2e**. La mezcla se agitó a t.a. durante 1 hr. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa (FA 0,1%), y la fracción se liofilizó para proporcionar **1-2f** (22 mg, 46,5% de rendimiento) en forma de polvo blanco.

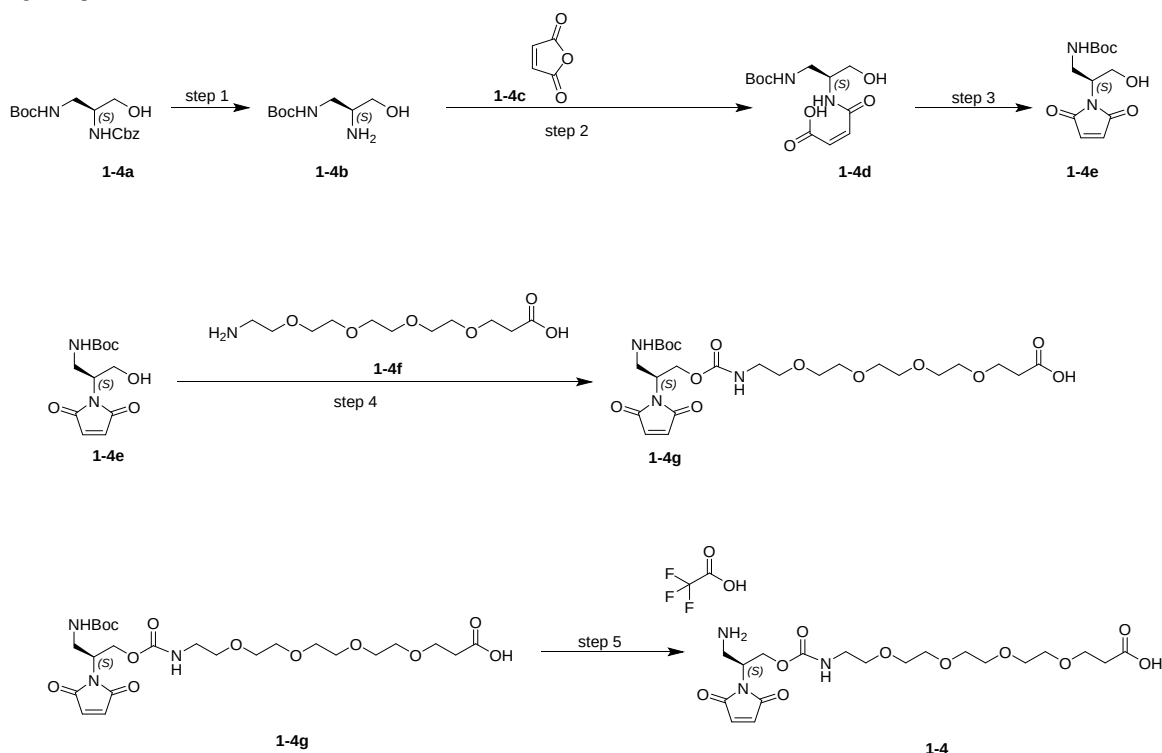
MS (ESI) m/z: 554,5 [M+Na]⁺.

Paso 4: ácido (S)-1-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3-oxo-7,10,13,16-

tetraoxa-4-azanonadecan-19-oico sal de TFA (**1-2**)

Una mezcla de **1-2f** (22,0 mg, 0,04 mmol) en DCM/TFA (1:1, 2 ml) se agitó a t.a. durante 1 hr. La mezcla se concentró al vacío para proporcionar un producto en bruto y luego se disolvió en agua para la liofilización. Se obtuvo **1-2** (17,5 mg, sal de TFA) en forma de sólido espumoso amarillo.

MS (ESI) m/z: 432,4 [M+H]⁺.

Ejemplo 1-4Paso 1: (S)-(2-amino-3-hidroxipropil)carbamato de ter-butilo (**1-4b**)

A una mezcla de **1-4a** (2,0 g, 6,17 mmol) (Referencia sintética: *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998, vol. 41, # 15, p. 2786 – 2805) en MeOH (10 ml) se agregó Pd/C húmedo (106 mg). La suspensión negra se purgó con un balón de H₂ 3 veces y luego se agitó a t.a. durante 1 hr bajo un balón de H₂. La mezcla se filtró con una cabeza de jeringa y se lavó con MeOH/H₂O (5:1, 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío para proporcionar **1-4b** (1,3 g, en bruto) en forma de aceite incoloro.

MS (ESI) m/z: 191,2 [M+H]⁺.

Paso 2: ácido (S,Z)-4-((1-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-hidroxipropan-2-il)amino)-4-oxobut-2-enoico (**1-4d**)

A una solución de **1-4b** (934 mg, 4,91 mmol) en DCM (15 ml) se agregó por goteo **1-4c** (481,43 mg, 4,91 mmol) en DCM (20 ml) a t.a. La mezcla se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se disolvió en ACN y se purificó por HPLC preparativa (FA 0,1%). La fracción se concentró al vacío para proporcionar **1-4d** (1010 mg, 71,4% de rendimiento) en forma de aceite incoloro.

MS (ESI) m/z: 311,3 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,98 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 6,36 (s, 2H), 5,22 (t, J = 6,3 Hz, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,81 (dd, J = 12,2, 2,8 Hz, 1H), 3,64 (dd, J = 12,2, 3,2 Hz, 1H), 3,45 – 3,24 (m, 3H), 1,45 (s, 9H).

Paso 3: (S)-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3-hidroxipropil)carbamato de ter-butilo (**1-4e**)

A una solución de **1-4d** (1010,0 mg, 3,50 mmol) en Tol (40 ml) se agregaron tamices moleculares 4Å (300 mg) y TEA (1063,5 mg, 10,51 mmol). La suspensión se purgó con un balón de N₂ tres veces y se calentó hasta 120 °C hasta el día siguiente. La mezcla se filtró y se lavó con EtOAc (50 ml), se lavó con 1N KHSO₄ (30 ml* 2), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se purificó por FCC usando (éter de petróleo/EtOAc = 0%~65%) como fase móvil y la fracción se concentró al vacío para proporcionar **1-4e** (470 mg, 49% de rendimiento) en forma de sólido blanquecino.

MS (ESI) m/z: 293,2 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, cdcl₃) δ 6,71 (s, 2H), 4,93 (m, 1H), 4,28 (td, J = 9,6, 4,8 Hz, 1H), 3,90 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 3,66 (dt, J = 14,8, 7,6 Hz, 1H), 3,46 – 3,39 (m, 1H), 1,40 (s, 9H).

Paso 4: ácido (S)-7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2,2-dimetil-4,10-dioxo-3,9,14,17,20,23-hexaoxa-5,11-diazaheptacosan-26-oico (**1-4g**)

A una solución de **1-4e** (110 mg, 0,41 mmol) en DMF (3 ml) se le agregó DSC (114,7 mg, 0,45 mmol) y DIPEA (57,9 mg, 0,45 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 2 hr y la mezcla se tornó una mezcla marrón. Se agregó **1-4f** (140,4 mg, 0,53 mmol) y se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (FA), y la fracción se liofilizó para proporcionar **1-4g** (64 mg, 28% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

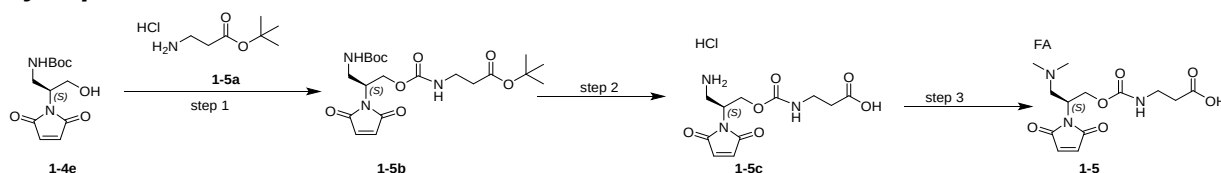
MS (ESI) m/z: 584,5 [M+Na]⁺.

Paso 5: ácido (S)-1-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-oxo-4,9,12,15,18-pentaoxa-6-azahenicosan-21-oico (sal de TFA) (**1-4**)

Una solución de **1-4g** (32 mg, 0,057 mmol) en TFA/DCM (1:1, 1 ml) se agitó a t.a. durante 10 min. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en agua/ACN (2 ml), y se liofilizó para proporcionar **1-4** (25,2 mg) en forma de aceite amarillo pálido.

MS (ESI) m/z: 462,4 [M+H]⁺.

Ejemplo 1-5



Paso 1: (S)-7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2,2-dimetil-4,10-dioxo-3,9-dioxa-5,11-diazatetradecan-14-oato de ter-butilo (**1-5b**)

A una solución de **1-4e** (107 mg, 0,40 mmol) en DMF (3 ml) se le agregó DSC (121,7 mg, 0,48 mmol) y DIPEA (76,8 mg, 0,59 mmol). La mezcla se agitó a T.A. durante 2 hr y se tornó una mezcla marrón. Se agregó **1-5a** (93,5 mg, 0,52 mmol) y se agitó a t.a. durante 30 min. Se purificó por HPLC preparativa (FA 0,1%), y la fracción se liofilizó para proporcionar **1-5b** (69 mg, 40% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 464,4 [M+Na]⁺.

Paso 2: ácido (S)-3-(((3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)carbonil)amino)propanoico sal de HCl (**1-5c**)

Una solución de **1-5b** (69 mg, 0,16 mmol) en 4M HCl/EtOAc (3 ml) se agitó en un baño de hielo durante 1 hr. La mezcla se concentró al vacío para proporcionar **1-5c** (55 mg, en bruto) en forma de sólido blanquecino.

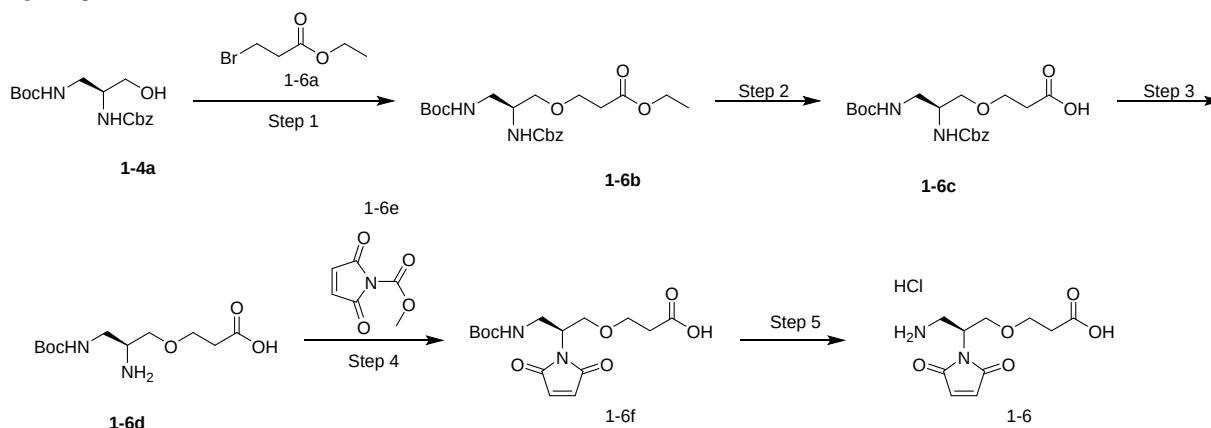
MS (ESI) m/z: 286,2 [M+H]⁺.

Paso 3: ácido (S)-3-(((3-(dimetilamino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)carbonil)amino)propanoico (**1-5**)

A una suspensión de **1-5c** (55 mg, 0,19 mmol) en DCM se agregó 30% formaldehído en agua (5,8 g, 200 eq.). La mezcla se agitó a t.a. durante 10 min, luego se agregó $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (102,1 mg, 0,48 mmol) y se agitó a t.a. durante 1 hr. Se usó burbujeo de N_2 para eliminar el DCM y el resto se purificó por HPLC preparativa (FA) para proporcionar **1-5** (13,4 mg, 22% de rendimiento) en forma de aceite amarillo pálido.

MS (ESI) m/z : 314,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 1-6



Paso 1: (S)-3-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)-3-((ter-butoxicarbonil)amino)propoxi)propanoato de etilo (**1-6b**)

A una mezcla de **1-4a** (9,3 g, 28,7), TBAB (924,2 mg, 2,87 mmol) y **1-6a** (26,0 g, 143,4 mmol) en DCM (100 ml) se agregó por goteo 50% NaOH húmedo acuoso (40 ml) en un baño de hielo. La mezcla se dejó calentar hasta t.a. y se agitó a t.a. hasta el día siguiente. La mezcla se acidificó con 1N KHSO_4 en un baño de hielo hasta pH =3, y se extrajo con DCM (100 ml * 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml * 2), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar **1-6b** (12 g, en bruto) en forma de aceite amarillo.

MS (ESI) m/z : 447,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Paso 2: ácido (S)-3-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)-3-((ter-butoxicarbonil)amino)propoxi)propanoico (**1-6c**)

A una solución de **1-6b** (12 g, en bruto) en MeOH (50 ml) se agregó 2N LiOH (10 ml). La mezcla se agitó a t.a. durante 4 hr. La mezcla se acidificó con 1N KHSO_4 en un baño de hielo hasta pH =3, y se extrajo con EA (100 ml *3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , y se filtraron, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC (EA/PE=40%~100%) como fase móvil para proporcionar **1-6c** (2,7 g en bruto) en forma de aceite transparente incoloro.

MS (ESI) m/z : 419,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Paso 3: ácido (S)-3-(3-((ter-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)propanoico (**1-6d**)

A una solución de **1-6c** (2 g, en bruto) en MeOH (30 ml) se agregó Pd/C húmedo (200 mg), luego la mezcla se agitó a t.a. durante 30 min. La suspensión negra se filtró a través de una cabeza de jeringa, se lavó con H_2O , luego se concentró al vacío para proporcionar un residuo, luego se disolvió en agua (30 ml), y se extrajo con EA (50 ml *3). La fase acuosa se concentró al vacío para proporcionar **1-6d** (930 mg) en forma de aceite transparente incoloro.

MS (ESI) m/z : 263,4 $[M+H]^+$.

Paso 4: ácido (S)-3-(3-((ter-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)propanoico (**1-6f**)

A una mezcla de **1-6d** (930 mg, en bruto) en NaHCO_3 sat. (10 ml) se agregó **1-6e** (827,3 mg, 5,9 mmol) en un baño de hielo y se agitó durante 20 min, luego se dejó calentar hasta t.a. durante 1 hr. La mezcla se acidificó con 1N KHSO_4 hasta pH = 3 en un baño de hielo, y se extrajo con EA (20 ml *3), y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por HPLC preparativa (FA) para proporcionar **1-6f** (189 mg) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 365,3 $[M+H]^+$.

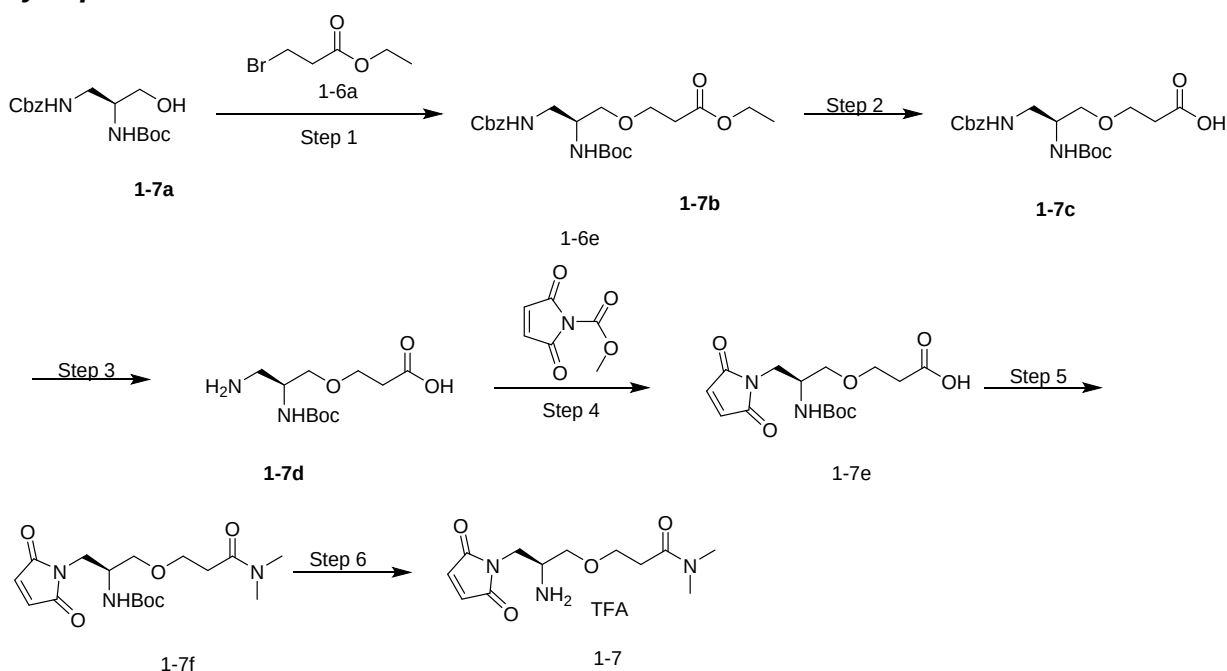
Paso 5: ácido (S)-3-(3-((ter-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)propanoico sal de HCl (**1-6**)

Una solución de **1-6f** (26 mg, 0,08 mmol) en 4N HCl/EtOAc (1 ml) se agitó a t.a. durante 1 hr. La suspensión se filtró y se lavó con EtOAc para proporcionar **1-6** (12,1 mg) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 243,2 $[M+H]^+$.

^1H RMN (400 MHz, dmsO) δ 12,25 (s, 1H), 8,16 (s, 3H), 7,12 (s, 1H), 4,47 – 4,37 (m, 1H), 3,69 (d, J = 10,8 Hz, 2H), 3,66 – 3,57 (m, 2H), 3,34 (m, 1H), 3,15 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 2,45 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Ejemplo 1-7



Paso 1: (S)-3-(3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)propoxi)propanoato de etilo (**1-7b**)

A una mezcla de **1-7a** (5,0 g, 15,41 mmol) (adquirido de WUXI), TBAB (496,9 mg, 1,54 mmol), y **1-6a** (14,0 g, 77,07 mmol) en DCM (50 ml) se agregó por goteo 50% NaOH húmedo acuoso (7,2 g, 77,07 mmol). La mezcla se agitó a t.a. hasta el día siguiente. La mezcla se diluyó con DCM (100 ml), y se extrajo con DCM (50 ml * 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml * 2), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se concentraron al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EA=0%~30%), y la fracción se concentró al vacío para

proporcionar **1-7b** (3,06 g, ~46,8% de pureza) en forma de aceite transparente incoloro.

MS (ESI) m/z: 447,4 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,32 (m, 5H), 5,35 (s, 1H), 5,18–5,04 (m, 2H), 4,19–4,09 (dq, J = 6,8, 1,6 Hz 2H), 3,82 (m, 1H), 3,69 (m, 2H), 3,56 (dd, J = 9,2, 3,6 Hz, 1H), 3,47 (dd, J = 9,6, 5,2 Hz, 1H), 3,45–3,37 (m, 1H), 3,36–3,25 (m, 1H), 2,55 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,24 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Paso 2: ácido (S)-3-(3-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((ter-butoxicarbonil)amino)propoxi)propanoico (**1-7c**)

A una solución de **1-7b** (3,06 g, 7,21 mmol) en MeOH (30 ml) se agregó 4N NaOH (2,7 ml, 10,8 mmol) y luego se agitó a t.a. durante 12 hr. La mezcla se diluyó con agua (30 ml) y se acidificó con 1N KHSO₄ hasta pH = 3 en un baño de hielo, y se extrajo con EtOAc (50 ml * 4). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml * 3), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar **1-7c** (2,8 g, 98% de rendimiento) en forma de aceite transparente incoloro.

MS (ESI) m/z: 419,3 [M+Na]⁺.

Paso 3: ácido (S)-3-(3-amino-2-((ter-butoxicarbonil)amino)propoxi)propanoico (**1-7d**)

A una solución de **1-7c** (2,8 g, 7,1 mmol) en MeOH (30 ml) se agregó Pd/C húmedo (250 mg) y luego se agitó a t.a. durante 30 min. La suspensión negra se filtró a través de una cabeza de jeringa, se lavó con H₂O y luego se concentró al vacío para proporcionar **1-7d** (1,85 g) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 263,2 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, d₂O) δ 4,1–3,9 (m, 1H), 3,73 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,64 (dd, J = 10,4, 4,4 Hz, 1H), 3,57 (dd, J = 10,4, 5,2 Hz, 1H), 3,22 (dd, J = 13,2, 4,4 Hz, 1H), 3,08 (dd, J = 13,2, 8,0 Hz, 1H), 2,45 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

Paso 4: ácido (S)-3-(2-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)propanoico (**1-7e**)

A una solución de **1-7d** (500 mg, 1,91 mmol) en 1N NaHCO₃ (10 ml) se agregó **1-6e** (397,7 mg, 2,86 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y luego se calentó lentamente hasta t.a. durante 2 hr. La mezcla se acidificó con 1N KHSO₄ hasta pH = 3 en un baño de hielo, y se extrajo con EtOAc (20 ml * 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar **1-7e** (560 g, 85,8% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 365,3 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, cdcl₃) δ 6,69 (s, 2H), 5,06 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 4,08–3,97 (m, 1H), 3,82–3,68 (m, 3H), 3,59 (dd, J = 14,0, 3,6 Hz, 2H), 3,51 (dd, J = 9,6, 4,4 Hz, 1H), 2,64 (t, J = 6,2 Hz, 1H), 1,38 (s, 9H).

Paso 5: (S)-(1-(3-(dimetilamino)-3-oxopropoxi)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propan-2-il)carbamato de ter-butilo (**1-7f**)

A una solución de **1-7e** (50 mg, 0,15 mmol) en DMF (2 ml) se agregó HATU (55,5 mg, 0,15 mmol), DIPEA (56,6 mg, 0,44 mmol), y clorhidrato de dimetilamina (11,9 mg, 0,15 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con salmuera (15 ml * 3), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC (MeOH/DCM=0~5%) como fase móvil para proporcionar **1-7f** (35 mg, 64,9% de rendimiento) en forma de aceite amarillo.

MS (ESI) m/z: 392,4 [M+Na]⁺.

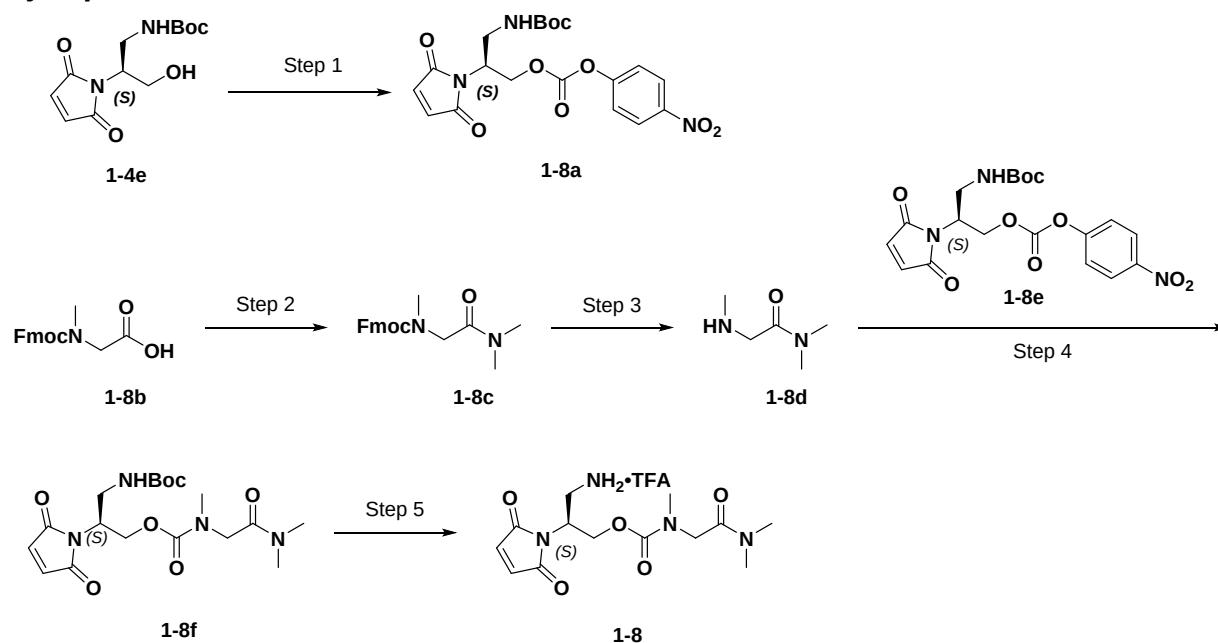
Paso 6: (S)-3-(2-amino-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)-N,N-dimetilpropanamida sal de TFA (**1-7**)

Una solución de **1-7f** (35 mg, 0,095 mmol) en DCM/TFA (1:1, 2 ml) se agitó a t.a. durante 10 min. La mezcla se concentró al vacío para proporcionar un residuo, luego se disolvió en agua (20 ml), y se extrajo con EtOAc (20 ml * 3). La fase acuosa se liofilizó para proporcionar **1-7** (38,5 mg) en forma de aceite marrón.

MS (ESI) m/z: 392,4 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, dmso) δ 8,05 (s, 3H), 7,09 (s, 2H), 3,73 – 3,55 (m, 6H), 3,53 – 3,42 (m, 1H), 2,97 (s, 3H), 2,83 (s, 3H), 2,58 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Ejemplo 1-8



Paso 1: (S)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)propil)carbamato de *ter*-butilo (**1-8a**)

A una solución de **1-4e** (81 mg, 0,3 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (100,2 mg, 0,33 mmol) en DMF (2,3 ml) se agregó DIPEA (81,6 ml, 0,45 mmol) a t.a. Tras la adición, la mezcla se agitó a t.a. hasta el día siguiente. La mezcla se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se lavó con NH₄Cl ac. sat., H₂O, y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. El producto en bruto se trituró con MTBE y se filtró para proporcionar el producto objetivo **1-8a** (91 mg, 70% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 458,4 [M+Na]⁺.

Paso 2: carbamato de (9H-fluoren-9-il)metil 2-(dimetilamino)-2-oxoetil(metilo) (**1-8c**)

A una solución de **1-8b** (1,0 g, 3,2 mmol) en DMF (15 ml) se agregó HATU (1,34 g, 3,53 mmol), DIPEA (1,24 g, 9,63 mmol), y clorhidrato de dimetilamina (314 mg, 3,85 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con salmuera (15 ml x 3), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC (MeOH/DCM=0~5%) como fase móvil para proporcionar **1-8c** (1,75 g, >100% de rendimiento) en forma de aceite amarillo (que contiene 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt)).

MS (ESI) m/z: 339,3 [M+H]⁺.

Paso 3: N, N-Dimetil-2-(metilamino)acetamida (**1-8d**)

A una solución de **1-8c** (100,0 mg, 0,30 mmol) en DMF (3 ml) se agregó Et₂NH (252 mg, 3,0 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 20 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se coevaporó con tolueno dos veces para proporcionar **1-8d** en forma de sólido marrón, el cual se usó en el siguiente paso directamente.

Paso 4: carbamato de (S)-3-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propil (2-(dimetilamino)-2-oxoetil)(metilo) (**1-8f**)

A una solución de **1-8e** (50,0 mg, 0,115 mmol) en DMF (1 ml) se agregó **1-8d** en bruto sólido y DIPEA (44,5 mg 0,345 mmol) a t.a. La mezcla se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con DMF y se acidificó con 0,1 *N* HCl. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (FA), y la fracción se liofilizó para proporcionar **1-8f** (17,2 mg, 36,3% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

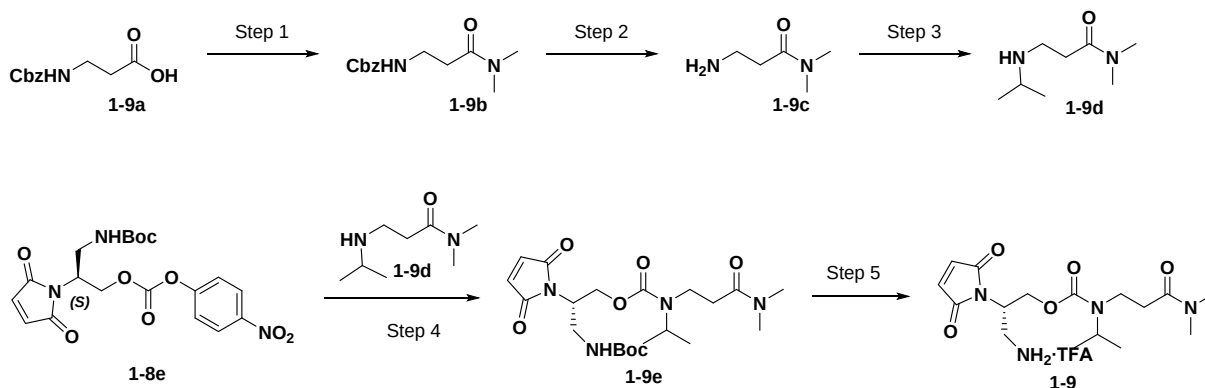
MS (ESI) *m/z*: 435,4 [M+Na]⁺.

Paso 5: carbamato de (S)-3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propil (2-(dimetilamino)-2-oxoetil)(metilo) (**1-8**)

Una solución de **1-8f** (7,7 mg, 0,021 mmol) en TFA/DCM (1:1, 0,6 ml) se agitó a t.a. durante 60 min. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en agua/ACN (1:1, 2 ml), y se liofilizó para proporcionar **1-8** (7,8 mg, ~100% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) *m/z*: 313,3 [M+H]⁺.

Ejemplo 1-9



Paso 1: (3-(dimetilamino)-3-oxopropil)carbamato de bencilo (**1-9b**)

A una solución de **1-9a** (1,116 g, 5 mmol) en DMF (25 ml) se agregó HATU (2,09 g, 5,5 mmol), DIPEA (1,94 g, 15 mmol), y clorhidrato de dimetilamina (489 mg, 6 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con salmuera (15 ml x 3), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC (MeOH/DCM=0~5%) como fase móvil para proporcionar **1-9b** (0,987 g, 79% de rendimiento) en forma de aceite amarillo.

MS (ESI) *m/z*: 251,2 [M+H]⁺.

Paso 2: 3-Amino-*N,N*-dimetilpropanamida (**1-9c**)

A una suspensión de **1-9b** (500 mg, 2,0 mmol) en MeOH (5 ml) se agregó Pd/C (50 mg, 10% p/p) a t.a. La atmósfera se reemplazó con H₂ y la mezcla se agitó a t.a. durante 2 h. La mezcla se filtró a través de un taco de Celite, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar el producto en bruto **1-9c** (233 mg, ~100% de rendimiento) en forma de aceite incoloro, el cual se usó para el siguiente paso directamente.

MS (ESI) *m/z*: 117,0 [M+H]⁺.

Paso 3: 3-(Isopropilamino)-*N,N*-dimetilpropanamida (**1-9d**)

A una solución de **1-9c** (233 mg, 2,0 mmol) y acetona (232,3 mg, 4,0 mmol) en MeOH (9

ml) se agregó NaBH_3CN (510,8 mg, 8,0 mmol) a t.a. La reacción se agitó a t.a. durante 18 h. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se redisolvió en DCM (20 ml) y se lavó con NaHCO_3 sat. (10 ml), H_2O (10 ml), salmuera (10 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar el producto objetivo en bruto **1-9d** (164 mg, 52% de rendimiento) en forma de aceite verde pálido.

MS (ESI) m/z : 159,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Paso 4: carbamato de (S)-3-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propil (3-(dimetilamino)-3-oxopropil)(isopropilo) (**1-9e**)

A una solución de **1-8e** (30,0 mg, 0,115 mmol) en DMF (1 ml) se agregó el aceite en bruto **1-9d** (33 mg, 0,21 mmol) y DIPEA (27 mg, 0,21 mmol) a t.a. La reacción se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con DMF y se acidificó con 0,1 *N* HCl. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (FA), y la fracción se liofilizó para proporcionar **1-9e** (22,5 mg, 58,8% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

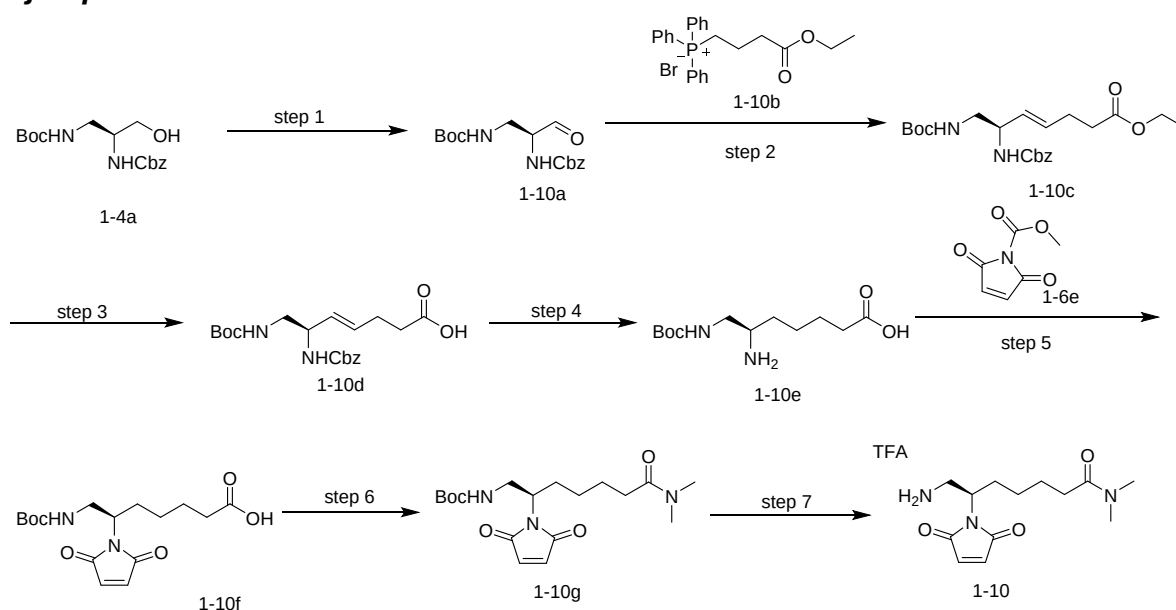
MS (ESI) m/z : 477,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Paso 5: carbamato de (S)-3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propil (3-(dimetilamino)-3-oxopropil)(isopropilo) trifluoroacetato (**1-9**)

Una solución de **1-9e** (22,5 mg, 0,0495 mmol) en TFA/DCM (1:1, 1,2 ml) se agitó a t.a. durante 60 min. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en agua/ACN (1:1, 2 ml), y se liofilizó para proporcionar **1-9** (23,2 mg, ~100% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 355,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 1-10



Paso 1: (3-oxopropan-1,2-diil)(S)-dicarbamato de bencil *ter*-butilo (**1-10a**)

Una solución de $(\text{COCl})_2$ (3,9 g, 30,83 mmol) en DCM (50 ml) se enfrió hasta $-70\text{ }^\circ\text{C}$, DMSO (3,6 g, 46,24 mmol) se agregó por goteo, luego se agitó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. **1-4a** (5,0 g, 15,41 mmol) se disolvió en DMSO (10 ml) y se agregó a través de una jeringa, y luego se agitó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Se agregó TEA (7,8 g, 77,1 mmol) por goteo y luego se calentó lentamente hasta t.a. La mezcla se vertió en agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (50 ml * 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml*2), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC (EA/PE=1%-50%) como fase móvil, y la fracción se

concentró al vacío para proporcionar **1-10a** (4,86 g, 97,8% de rendimiento) en forma de aceite amarillo.

^1H RMN (400 MHz, cdCl_3) δ 9,64 (s, 1H), 7,39 – 7,30 (m, 5H), 5,93 (s, 1H), 4,86 (s, 1H), 4,35–4,22(m, 1H), 3,77 – 3,64 (m, 1H), 3,56 (dt, $J = 14,8, 4,8$ Hz, 1H), 1,40 (s, 9H).

Paso 2: (R)-6-(((benciloxi)carbonil)amino)-7-((ter-butoxicarbonil)amino)hept-4-enoato de etilo (**1-10c**)

A una suspensión de **1-10b** (6,5 g, 14,3 mmol) en Tol (30 ml) se agregó por goteo t-BuOK (solución 1M en THF, 14,5 ml, 14,5 mmol) a 0 °C. La mezcla se tornó de un color profundo durante 30 min. Se agregó **1-10a** (2,0 g, 6,2 mmol) en Tol (20 ml) por goteo a -70 °C, luego se calentó lentamente hasta t.a. La mezcla se extinguió mediante la adición de NH_4Cl sat. (50 ml). Después de la separación, la fase de Tol se lavó con salmuera (30 ml * 2), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. La purificación por FCC (EA/PE=0%~30%~50%) proporcionó **1-10c** (808 mg, 30,8% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 443,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

^1H RMN (400 MHz, cdCl_3) δ 7,40 – 7,27 (m, 5H), 5,72~5,60 (m, 0,2 H), 5,60 – 5,46 (m, 0,8H), 5,40 (dd, $J = 16,0$ Hz, 6,4 Hz, 0,2H), 5,34~5,20 (m, 1,8 H), 4,95~4,70 (m, 1 H), 5,16~5,01 (m, 2H), 4,60~4,40 (m, 1 H), 4,12 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,39 – 3,08 (m, 2H), 2,6~2,2 (m, 4H), 1,42 (s, 9H), 1,24 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H).

Paso 3: ácido (R)-6-(((benciloxi)carbonil)amino)-7-((ter-butoxicarbonil)amino)hept-4-enoico (**1-10d**)

A una solución de **1-10c** (808,0 mg, 1,92 mmol) en MeOH (10 ml) se agregó 4N NaOH (1,92 ml, 7,69 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 3,5 hr. La mezcla se diluyó con agua (20 ml), se acidificó con KHSO_4 sat. hasta pH = 3, y se extrajo con EtOAc (30 ml * 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar **1-10d** (781 mg) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 415,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Paso 4: ácido (R)-6-amino-7-((ter-butoxicarbonil)amino)heptanoico (**1-10e**)

A una solución de **1-10d** (781,0 mg, 1,99 mmol) en MeOH (8 ml) se agregó Pd/C húmedo (67 mg) luego se agitó a t.a. durante 24 hr. La suspensión negra se filtró a través de una cabeza de jeringa, se lavó con MeOH/ H_2O (5:1, 30 ml) y luego se concentró al vacío para proporcionar **1-10e** (510 mg, 98,5% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 261,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Paso 5: ácido (R)-7-((ter-butoxicarbonil)amino)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)heptanoico (**1-10f**)

A una mezcla de **1-10e** (510 mg, 1,96 mmol) en 1N NaHCO_3 (10 ml) se agregó **1-6e** (455,8 mg, 2,94 mmol) a 0 °C, luego se agitó a 0 °C durante 30 min y se dejó calentar hasta t.a. durante 3 hr. La reacción se acidificó con KHSO_4 sat. hasta pH = 3, y se extrajo con EtOAc (30 ml * 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y el filtrado se concentró para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC MeOH/DCM=0%~5%). La fracción se concentró al vacío para proporcionar **1-10f** (590 mg, 85% de rendimiento) en forma de aceite amarillo pálido.

MS (ESI) m/z : 363,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Paso 6: (R)-(7-(dimetilamino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-7-

oxoheptil)carbamato de ter-butilo (**1-10g**)

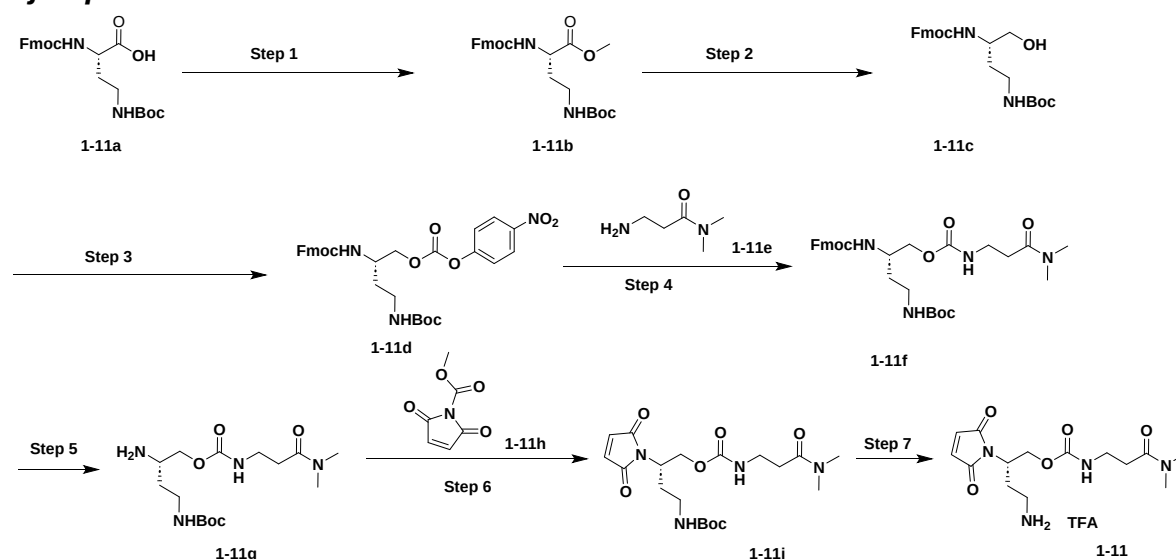
A una solución de **1-10f** (53 mg, 0,16 mmol) en DMF (2 ml) se agregó HATU (71,6 mg, 0,19 mmol), DIPEA (44,3 mg, 0,34 mmol), y clorhidrato de dimetilamina (14,0 mg, 0,17 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con salmuera (15 ml * 3), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC (MeOH/DCM=0~5%) como fase móvil para proporcionar **1-10g** (53 mg, 92,1% de rendimiento) en forma de aceite amarillo. MS (ESI) m/z: 390,4 [M+Na]⁺.

Paso 7: (R)-7-amino-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N,N-dimetilheptanamida sal de TFA (**1-10**)

Una solución de **1-10g** (30 mg, 0,08 mmol) en DCM/TFA (1:1, 2 ml) se agitó a t.a. durante 10 min. La mezcla se concentró al vacío para proporcionar un residuo y luego se disolvió en agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (20 ml * 3). La fase acuosa se liofilizó para proporcionar **1-10** (33 mg) en forma de aceite marrón.

MS (ESI) m/z: 268,3 [M+H]⁺.

Ejemplo 1-11



Paso 1: (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-4-((ter-butoxicarbonil)amino)butanoato de metilo (**1-11b**)

1-11a (4,00 g, 9,08 mmol) y K₂CO₃ (1,38 g, 9,99 mmol) se agregó a DMF (10 ml) seguido por la adición por goteo de CH₃I (2,58 g, 18,16 mmol) a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 20 min y se dejó calentar hasta 25 °C y se agitó adicionalmente a 25 °C durante 30 min. Luego de completada la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con EA (50 ml) y se lavó con salmuera (25 ml*3) y H₂O (25 ml*2). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró bajo presión reducida para proporcionar **1-11b** (4,08 g, cuant.) en forma de sólido amarillo claro.

MS (ESI) m/z: 477,4 [M+Na]⁺.

Paso 2: (4-hidroxibutan-1,3-diil)(S)-dicarbamato de (9H-fluoren-9-il)metil ter-butilo (**1-11c**)

1-11b (1,00 g, 2,20 mmol) se disolvió en THF (55 ml) y EtOH (55 ml) seguido por la adición de NaBH₄ (499 mg, 13,20 mmol) y LiCl (616 mg, 14,52 mmol) sucesivamente a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 1,5 h. Luego de completada la reacción, se agregó NH₄Cl saturado acuoso (10 ml) para extinguir la reacción. La mezcla de reacción se

diluyó con H₂O (50 ml) y se extrajo con EA (35 ml*3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml*2) y agua (30 ml*2), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar **1-11c** en forma de sólido blanco (938 mg, cuant.). El producto se usó directamente en el siguiente paso sin purificación.

MS (ESI) m/z: 449,4 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, d₆-DMSO) δ 7,86 (d, J=7,2 Hz, 2H), 7,70–7,67 (m, 2H), 7,39 (t, J=7,2 Hz, 2H), 7,32–7,29 (m, 2H), 7,07–7,05 (m, 1H), 6,67 (t, J=5,2 Hz, 1H), 6,51 (s, 1H), 4,62 (br s, 1H), 4,29–4,17 (m, 3H), 3,41–3,38 (m, 1H), 3,25–3,24 (m, 1H), 2,98–2,95 (m, 1H), 2,86–2,83 (m, 1H), 1,33 (s, 9H).

Paso 3: (4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)butan-1,3-diil)(S)-dicarbamato de (9H-fluoren-9-il)metil ter-butilo (**1-11d**)

1-11c (850 mg, 1,87 mmol) y carbonato de bis (4-nitrofenilo) (1,14 g, 3,74 mmol) se disolvieron en DMF (5 ml), seguido por la adición de DIPEA (363 mg, 2,81 mmol). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 1,5 h. Luego de completada la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con EA (100 ml) y se lavó con salmuera (35 ml*2) y agua (35 ml*2). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró bajo presión reducida para proporcionar **1-11d** en forma de sólido blanco (890 mg, 80,4% de rendimiento).

MS (ESI) m/z: 614,4 [M+Na]⁺.

Paso 4: (4-(((3-(dimetilamino)-3-oxopropil)carbamoil)oxi)butan-1,3-diil)(S)-dicarbamato de (9H-fluoren-9-il)metil ter-butilo (**1-11f**)

1-11d (360 mg, 0,61 mmol) y **1-11e** (141 mg, 1,22 mmol) se disolvió en DMF (5 ml), seguido por la adición de DIPEA (157 mg, 1,22 mmol). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2,5 h. Luego de completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna instantánea (DCM/MeOH) para proporcionar **1-11f** en forma de sólido amarillo pálido (260 mg, 75,1% de rendimiento).

MS (ESI) m/z: 592,5 [M+Na]⁺.

Paso 5: (S)-(3-amino-4-(((3-(dimetilamino)-3-oxopropil)carbamoil)oxi)butil)carbamato de ter-butilo (**1-11g**)

1-11f (260 mg, 0,46 mmol) se disolvió en DMF (3 ml), seguido por la adición de Et₂NH (334 mg, 4,57 mmol). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 15 min. Luego de completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para proporcionar **1-11g** en forma de jarabe marrón claro (158 mg, cuant.), el cual se usó directamente en el siguiente paso.

MS (ESI) m/z: 347,4 [M+H]⁺.

Paso 6: (3-(dimetilamino)-3-oxopropil)carbamato de (S)-4-((ter-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butilo (**1-11i**)

1-11g (64 mg, 0,18 mmol) y **1-11h** (43 mg, 0,28 mmol) se disolvieron en una solución mezclada de ACN (2 ml) y NaHCO₃ acuoso (1M, 4 ml). La mezcla primero se agitó a 0 °C durante 30 min y luego se agitó a 25 °C durante 40 min. Luego de completada la reacción, la mezcla de reacción se ajustó hasta pH~4 con KHSO₄ acuoso (2 M), se diluyó con EA (60 ml) y se lavó con salmuera (30 ml) y H₂O (30 ml*2). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se concentró para proporcionar un aceite amarillo como el producto en bruto, el cual se purificó por cromatografía en columna instantánea (DCM/MeOH) para proporcionar **1-11i** (60 mg, 76,2% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 449,5 $[M+Na]^+$.

1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 6,79 (s, 2H), 6,56–6,54 (m, 1H), 4,34–4,31 (m, 2H), 4,23–4,16 (m, 1H), 3,31–3,30 (m, 2H), 3,01–2,99 (m, 5H), 2,92 (s, 3H), 2,55–2,52 (m, 2H), 2,17–2,08 (m, 1H), 1,86–1,77 (m, 1H), 1,41 (s, 9H).

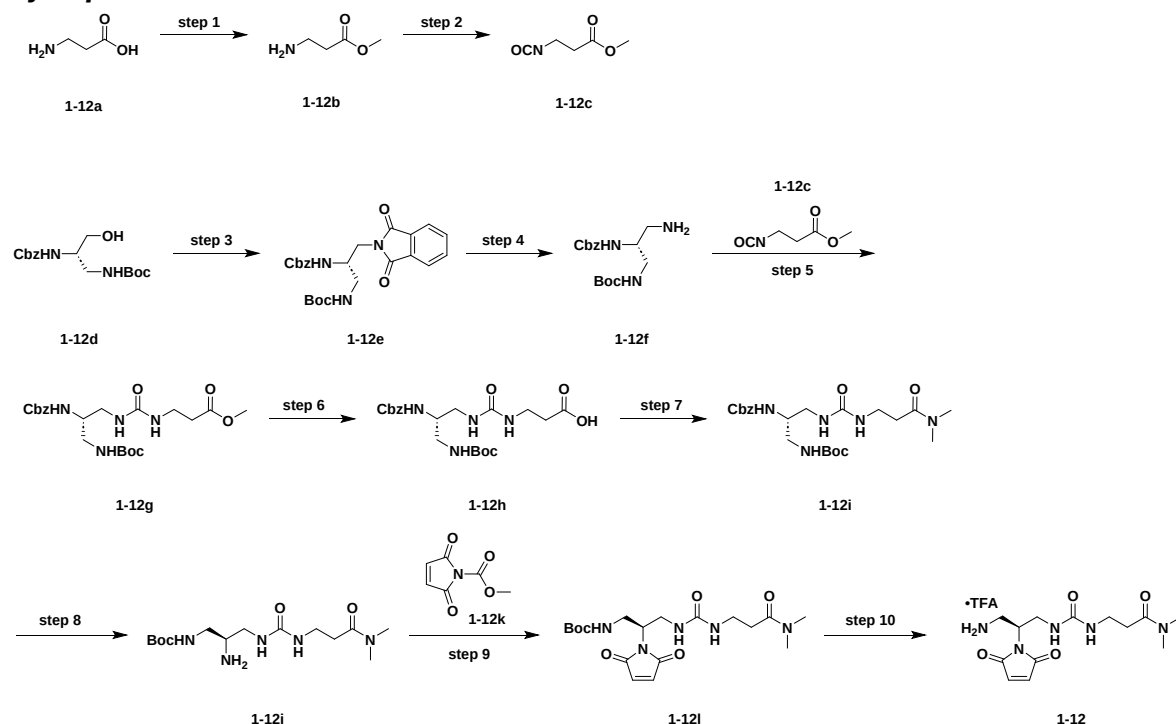
Paso 7: carbamato de (S)-4-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butil (3-(dimetilamino)-3-oxopropilo) (**1-11**)

1-11i (55 mg, 0,13 mmol) se disolvió en DCM (3 ml), seguido por la adición de TFA (1 ml). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 20 min. Luego de completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para proporcionar **1-11** en forma de aceite transparente (sal de TFA, 54 mg, cuant.).

MS (ESI) m/z : 327,3 $[M+H]^+$.

1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 7,78 (s, 3H), 7,05 (s, 2H), 4,28–4,13 (m, 3H), 3,12 (dd, $J_1=12,8$ Hz, $J_2=6,8$ Hz, 2H), 2,91 (s, 3H), 2,79–2,73 (m, 5H), 2,39 (t, $J=7,2$ Hz, 2H), 2,12–2,07 (m, 1H), 1,96–1,90 (m, 1H).

Ejemplo 1-12



Paso 1: 3-aminopropanoato de metilo (**1-12b**)

$SOCl_2$ (13,4 g, 112,2 mmol) se agregó por goteo a una suspensión del compuesto **1-12a** (5 g, 56,1 mmol) en MeOH (100 ml). La mezcla se agitó a 70 °C durante 16 h. La mezcla se concentró para proporcionar el compuesto en bruto. El compuesto en bruto se purificó adicionalmente por cromatografía en columna instantánea (eluída con DCM/MeOH = 0 – 20%). El compuesto **1-12b** (3,2 g, 55,3%) se obtuvo en forma de sólido blanquecino.

MS (ESI) m/z : 130,1 $[M+Na]^+$.

Paso 2: 3-isocianatopropanoato de metilo (**1-12c**)

El compuesto **1-12b** (500 mg, 4,85 mmol) en CH_2Cl_2 (5 ml) y solución saturada de $NaHCO_3$ (ac.) (5 ml) se desgasificó, y el matraz se enfrió en un baño de agua helada. Se agregó trifosgeno (1,44 g, 4,85 mmol) en una porción bajo atmósfera inerte a 0 °C. La reacción se agitó de 0 °C a t.a. durante 2,5 h. La reacción se diluyó con agua (100 ml) y se vertió en un embudo separador. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 . Los

extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se concentraron bajo presión reducida para obtener el compuesto en bruto **1-12c** (426 mg, 68,1% de rendimiento) en forma de líquido amarillo, el cual se usó directamente para la siguiente reacción sin purificación.

Paso 3: (3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)propan-1,2-diil)(S)-dicarbamato de bencil ter-butilo (**1-12e**)

Se agregó trifenilfosfina (2,91 g, 11,1 mmol) y ftalimida (1,63 g, 11,1 mmol) a un matraz que contenía THF seco (30 ml). Se agregó el compuesto **1-12d** (3 g, 9,25 mmol) y el matraz se enfrió hasta 0 °C. Se agregó azodicarboxilato de diisopropilo DIAD (2,24 mg, 11,1 mmol) por goteo y la reacción se agitó durante 30 minutos a 0 °C y hasta el día siguiente a temperatura ambiente. La mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna instantánea (eluída con PE/EA=0-70%) para proporcionar el compuesto **1-12e** (3,6 g, 85,9%) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 476,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Paso 4: (3-aminopropan-1,2-diil)(R)-dicarbamato de bencil ter-butilo (**1-12f**)

El compuesto **1-12e** (1,3 g, 2,87 mmol) se disolvió en metanol (30 ml) y se agregó hidrazina monohidrato (359 mg, 5,73 mmol). La mezcla de reacción luego se sometió a reflujo durante 2 h y se enfrió hasta temperatura ambiente. El precipitado que se formó se filtró y se usó metanol para lavar el filtrado. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el sólido restante se purificó por cromatografía en columna instantánea (eluída con DCM/MeOH=0-20%) para proporcionar el compuesto **1-12f** (640 mg, 69,0% de rendimiento) en forma de aceite incoloro.

MS (ESI) m/z: 324,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Paso 5: (R)-7-(((benciloxi)carbonil)amino)-2,2-dimetil-4,10-dioxo-3-oxa-5,9,11-triazatetradecan-14-oato de metilo (**1-12g**)

A una solución del compuesto **1-12f** (500 mg, 1,55 mmol) en THF (10 ml) se agregó **1-12c** (399 mg, 3,09 mmol) y Et_3N (312,9 mg, 3,09 mmol) a 0 °C y la mezcla se mantuvo a t.a. durante 4 h. La mezcla se diluyó con EA (100 ml) y se lavó con salmuera (50 ml * 2). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna instantánea (eluída con PE/EA=0%-40%) para proporcionar el compuesto **1-12g** (335 mg, 47,9% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 453,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Paso 6: ácido (R)-7-(((benciloxi)carbonil)amino)-2,2-dimetil-4,10-dioxo-3-oxa-5,9,11-triazatetradecan-14-oico (**1-12h**)

A una solución del compuesto **1-12g** (335 mg, 0,74 mmol) en $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (6 ml, v:v=3:1) se agregó LiOH (35,5 mg, 1,48 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 16 h. La mezcla se concentró para eliminar MeOH y se diluyó con H_2O (5 ml). El pH de la mezcla se ajustó a 5 con HOAc y se extrajo con EA (50 ml*3). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron para proporcionar el compuesto **1-12h** (289 mg, 88,9% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 439,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Paso 7: (3-(3-(3-(dimetilamino)-3-oxopropil)ureido)propan-1,2-diil)(R)-dicarbamato de bencil ter-butilo (**1-12i**)

A una solución del compuesto **1-12h** (180 mg, 0,41 mmol) en DCM (6 ml) se agregó $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{HCl}$ (67,0 mg, 0,82 mmol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)urea (EDCI) (102,3 mg,

0,534 mmol) y HOBt (72,1 mg, 0,534 mmol) y Et₃N (83,08 mg, 0,82 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 16 h. La mezcla se diluyó con EA (100 ml), se lavó con 1 N HCl (50 ml*3), NaHCO₃ sat. (50 ml*3) y salmuera (50 ml*3). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar el producto en bruto **1-12i** (131 mg, 68,6% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 466,5 [M+H]⁺.

Paso 8: (R)-(2-amino-3-(3-(3-(dimetilamino)-3-oxopropil)ureido)propil)carbamato de ter-butilo (**1-12j**)

A una solución del compuesto **1-12i** (131 mg, 0,28 mmol) en MeOH (4 ml) se agregó Pd/C (10%, 26 mg). La mezcla se agitó a t.a. bajo H₂ durante 4 h. La mezcla se filtró y se concentró para proporcionar el producto en bruto **1-12j** (93 mg, en bruto) en forma de aceite incoloro.

MS (ESI) m/z: 332,4 [M+H]⁺.

Paso 9: (R)-(3-(3-(3-(dimetilamino)-3-oxopropil)ureido)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propil)carbamato de ter-butilo (**1-12l**)

A una solución del compuesto **1-12j** (93 mg, 0,281 mmol) en NaHCO₃ (1N, 5 ml) y THF (5 ml) se agregó **1-12k** (132 mg, 0,842 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min, luego se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (Método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 um 19*250 mm; Fase móvil: A-agua (0,1% TFA): B-acetonitrilo; Velocidad de flujo: 20 ml/min). El compuesto **1-12l** (32 mg, 27,7% de rendimiento) se obtuvo en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 412,4 [M+H]⁺.

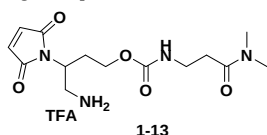
Paso 10: acetato de (S)-3-(3-(3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propil)ureido)-N,N-dimetilpropanamida (**1-12**)

A una solución del compuesto **1-12l** (30 mg, 0,073 mmol) en DCM (10 ml) se agregó TFA (1 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1h. La mezcla se concentró para proporcionar el compuesto en bruto **1-12** (19 mg, 83,7% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 312,4 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, DMSO): δ 7,90 (br s, 3H), 7,04 (s, 2H), 6,32–6,29 (m, 1H), 5,89 (br s, 1H), 4,20–4,17 (m, 1H), 3,37–3,23 (m, 4 H), 3,15–3,12 (m, 3H), 3,09 (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,36–2,33 (m, 2H).

Ejemplo 1-13



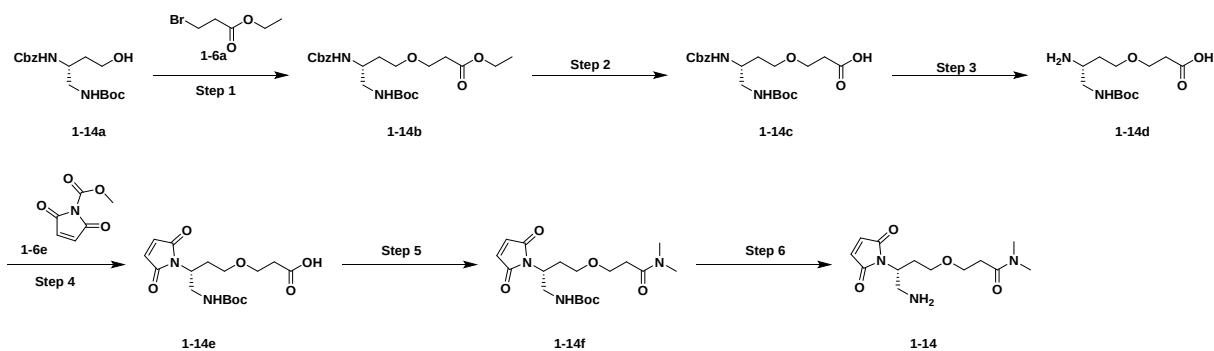
(3-(dimetilamino)-3-oxopropil)carbamato de 4-amino-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butilo (**1-13**)

1-13 (sal de TFA, 178 mg, cuant.) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de síntesis del Ejemplo 1-11.

MS (ESI) m/z: 327,4 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, d₆-DMSO): δ 8,01 (br s, 3H), 7,04 (s, 2H), 6,83 (t, J=6,0 Hz, 1H), 4,28–4,23 (m, 1H), 3,87 (t, J=6,0 Hz, 2H), 3,34–3,29 (m, 1H), 3,17–3,12 (m, 3H), 2,94 (s, 3H), 2,81 (s, 3H), 2,43 (t, J=7,2 Hz, 2H), 2,13–2,06 (m, 1H), 1,98–1,93 (m, 1H).

Ejemplo 1-14



Ácido (R)-3-(4-((ter-butoxicarbonil)amino)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butoxi)propanoico **1-14e**

1-13e (110 mg) en forma de sólido blanco se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de síntesis del Ejemplo 1-7.

MS (ESI) m/z: 379,3 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, cdcl₃) δ 6,68 (s, 2H), 4,87 (s, 1H), 4,42–4,26 (m, 1H), 3,70–3,56 (m, 3H), 3,50 3,52–3,47 (m, 1H), 3,43–3,36 (m, 1H), 3,31 (dt, J=14,0, 4,4 Hz, 1H), 2,56 (t, J=6,0 Hz, 1H), 3,32–2,12 (m, 1H), 1,97–1,92 (m, 1H), 1,40 (s, 9H).

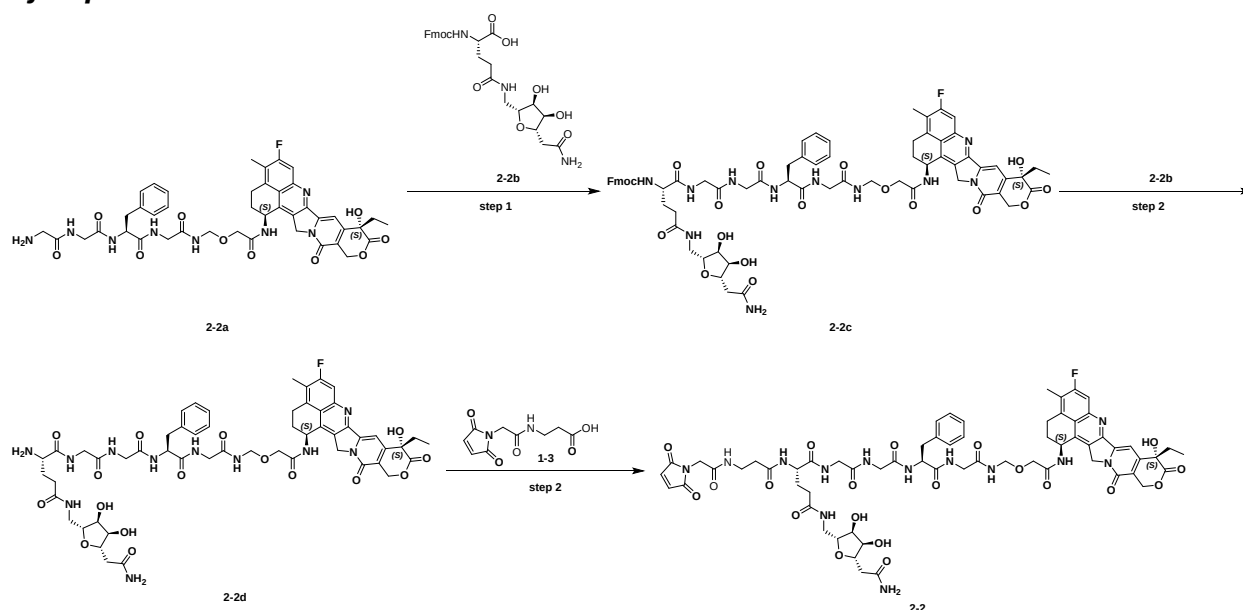
(R)-3-(4-amino-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butoxi)-N,N-dimetilpropanamide (sal de TFA) (**1-14**)

1-14 (9,6 mg) en forma de aceite marrón se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de síntesis del Ejemplo 1-7.

MS (ESI) m/z: 384,4 [M+H]⁺.

Los compuestos de referencia **2-1** y **2-3** se sintetizaron de acuerdo con los métodos reportados en la Patente Nro. US 10.973.924B2 y la Publicación de Solicitud de Patente Nro. US 2020/345863A1.

Ejemplo 2-2



Paso 1: (9H-fluoren-9-il)metil ((6S,15S)-1-((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)-15-bencil-24-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-3,7,10,13,16,19,24-heptaooxo-22-oxa-2,8,11,14,17,20-hexaazatetracosan-6-il)carbamato (**2-2c**)

El compuesto **2-2c** (20 mg, 36,8% de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el Paso 3 del Ejemplo 1-2.

MS (ESI) m/z : 1386,9 $[M+Na]^+$.

Paso 2: (S)-2-amino-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-N1-((S)-10-bencil-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-il)pentanodiamida (**2-2d**)

El compuesto **2-2c** (20 mg, 36,8% de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el Paso 5 del Ejemplo 1-11 (17 mg, cuant.).

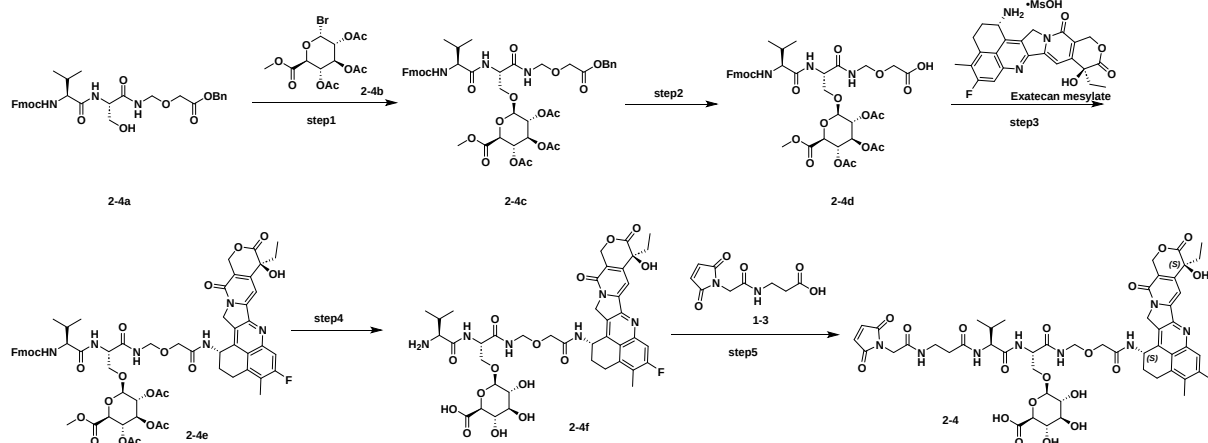
MS (ESI) m/z : 1142,8 $[M+H]^+$.

Paso 3: (S)-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-N1-((S)-10-bencil-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-il)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)pentanodiamida (**2-2**)

A una mezcla de **1-3** (5 mg, 0,021 mmol) y HATU (8 mg, 0,021 mmol) en DMF (1 ml) se agregó DIPEA (5 mg, 0,035 mmol). La mezcla se hizo reaccionar a t.a. durante 10 min. Se agregó **2-2d** (20 mg, 0,018 mmol) y la mezcla se agitó adicionalmente a esta temperatura durante otros 15 min. La mezcla se filtró, y el filtrado se purificó usando HPLC preparativa (Método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5um 19*250 mm; Fase móvil: A-agua (0,1% ácido fórmico): B-acetonitrilo; Velocidad de flujo: 20 ml/min) para proporcionar **2-2** (4 mg, 16,9% de rendimiento).

MS (ESI) m/z : 1372,8 $[M+Na]^+$.

Ejemplo 2-4



Paso 1: triacetato de (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(benciloxi)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo (**2-4c**)

Una mezcla de **2-4a** (150 mg, 0,25 mmol, adquirida de MedChemExpress), **2-4b** (148 mg, 0,37 mmol, comercialmente disponible) y 4Å MS (800 mg) en DCE seco (5 ml) se agitó a t.a. durante 30 min. Se agregó AgOTf (83 mg, 0,32 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno y se agitó a t.a. durante 14 h. La solución de reacción se diluyó con EtOAc (10 ml), se filtró a través de Celite, y se lavó con EtOAc (5 ml * 3). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ sat. (20 ml), se concentró y se purificó por cromatografía en columna instantánea (eluyente: éter

de petróleo/EtOAc= 70/30 a 0/100 luego DCM/MeOH= 100/0 a 95/5) para proporcionar **2-4c** (28 mg, 12,2% de rendimiento) en forma de sólido amarillo claro.

MS (ESI) m/z : 942,5 $[M+Na]^+$.

Paso 2: ácido (5S,8S)-1-(9H-fluoren-9-il)-5-isopropil-3,6,9-trioxo-8-(((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)metil)-2,12-dioxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**2-4d**)

A la mezcla de **2-4c** (114 mg, 0,12 mmol) y 10% Pd/C (26 mg, 0,012 mmol) se agregó MeOH (3 ml) bajo atmósfera de nitrógeno. La solución de reacción se agitó a t.a. bajo atmósfera de H₂ durante 1 h. La solución se filtró y se concentró al vacío para proporcionar **2-4d** (103 mg, 12,4% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 852,5 $[M+Na]^+$.

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

A una solución de **2-4d** (103 mg, 0,12 mmol), exatecan mesilato (64 mg, 0,12 mmol) y HATU (47 mg, 0,12 mmol) en DMF seca (2 ml) se agregó DIPEA (61 μ L, 0,36 mmol). La solución se agitó a t.a. durante 1 h y se agregó a H₂O (20 ml) y se extrajo con DCM/MeOH (10:1, 11 ml * 3). La fase orgánica se concentró y se purificó por cromatografía en columna instantánea (eluyente: DCM/MeOH= 100/0 a 95/5) para proporcionar **2-4e** (97 mg, 64,0% de rendimiento) en forma de sólido marrón claro.

MS (ESI) m/z : 1269,5 $[M+Na]^+$.

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

A una solución de **2-4e** (30 mg, 0,024 mmol) en MeOH/H₂O (0,5/0,5 ml) se agregó TEA (167 μ L, 1,2 mmol). La solución se agitó a t.a. durante 9 h. Luego de completada la reacción, la mezcla se purificó por HPLC preparativa (FA) (Método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; Fase móvil: A-agua (0,1% ácido fórmico); B-acetonitrilo; Velocidad de flujo: 20 ml/min). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-4f** (15 mg, 70,6% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

MS (ESI) m/z : 885,5 $[M+H]^+$.

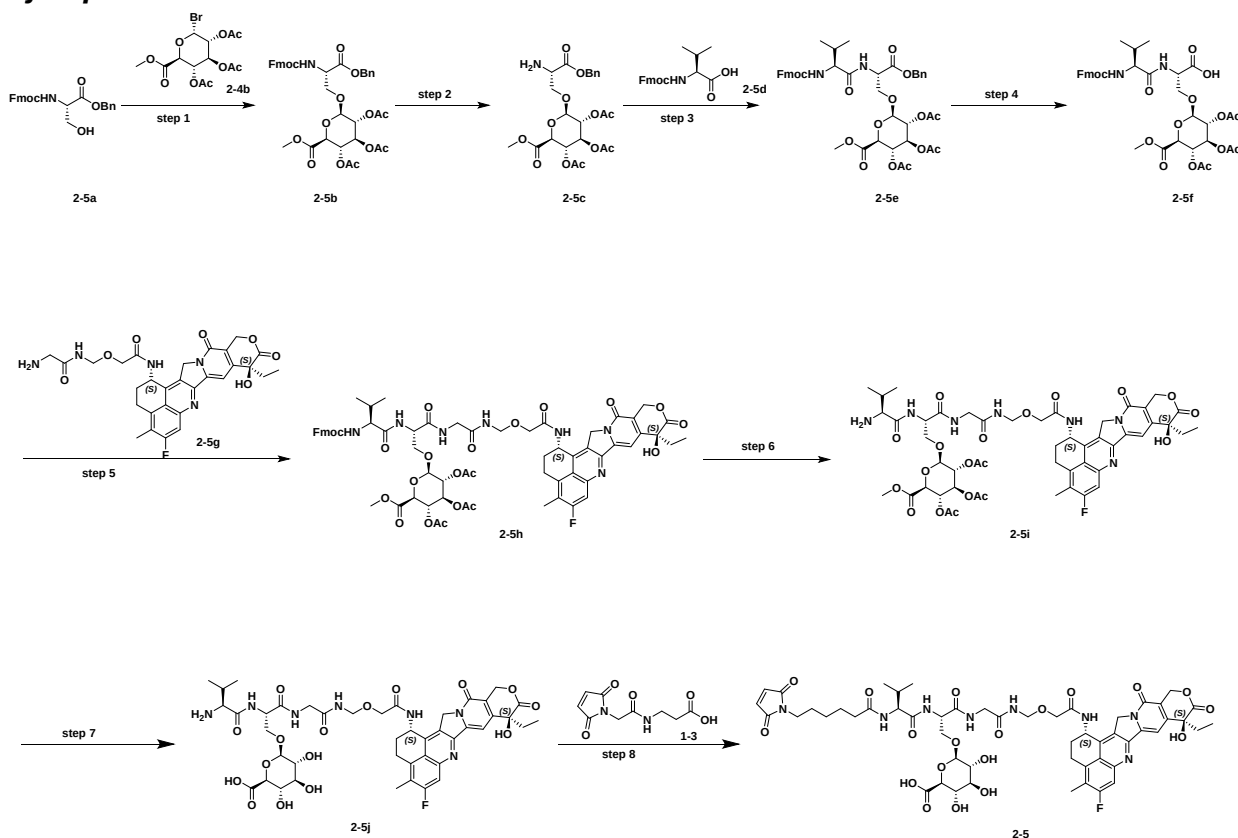
Paso 5: ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)-3-metilbutanamido)-3-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-pira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

A una solución de **1-3** (8,3 mg, 0,038 mmol) y HATU (11 mg, 0,029 mmol) en DMF seca (0,3 ml) se agregó DIPEA (5 μ L, 0,029 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 15 min y se agregó por goteo a la solución de **2-4f** (17 mg, 0,019 mmol) en DMF seca (0,7 ml). La mezcla resultante se agitó adicionalmente a t.a. durante 15 min. Se agregó HOAc para ajustar el pH a 5. La solución se purificó por HPLC preparativa (FA) (Método: columna:

XBridge Prep C18 OBD 5um 19*250 mm; Fase móvil: A-agua (0,1% ácido fórmico): B-acetonitrilo; Velocidad de flujo: 20 ml/min). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-4** (13 mg, 63,5% de rendimiento) en forma de sólido beige.

MS (ESI) m/z : 1093,5 $[M+H]^+$.

Ejemplo 2-5



Paso 1: triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-*il*)metoxi)carbonil)amino)-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**2-5b**)

A una mezcla de **2-5a** (834 mg, 2 mmol), **2-4b** (950 mg, 2,4 mmol) y 4Å MS (3000 mg) se agregó DCM seca (30 ml), se agitó a t.a. durante 30 min. Se agregó AgOTf (617 mg, 2,4 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno, se agitó a t.a. durante 16 h. La solución de reacción se diluyó con EtOAc (30 ml), se filtró a través de Celite, se lavó con EtOAc (20 ml * 3). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ sat. (20 ml), se concentró y se purificó por cromatografía en columna instantánea (eluyente: éter de petróleo/EtOAc= 70/30 a 0/100) para proporcionar **2-5b** (470 mg, 32,1% de rendimiento) en forma de sólido amarillo claro.

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

Paso 2: triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**2-5c**)

A una solución de **2-5b** (470 mg, 0,64 mmol) en DMF (5 ml) se agregó Et₂N (1420 µL, 1011 mg, 12,8 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 0,5 h. Una vez completada la reacción, la mezcla se concentró al vacío para proporcionar **2-5c** (327 mg, en bruto) en forma de sólido amarillo.

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

Paso 3: triacetato de (2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-*il*)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(benciloxi)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (**2-5e**)

A una solución de **2-5d** (327 mg) en DMF (5 ml) se agregó HATU (291 mg, 0,76 mmol) y DIPEA (223 μ L, 165 mg, 1,27 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a t.a. durante 5 min y luego se agregó **2-5c** (239 mg, 0,70 mmol). La mezcla se agitó adicionalmente a t.a. durante 60 min. Tras completarse la reacción, el solvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna instantánea (eluyente: éter de petróleo/EtOAc= 70/30 a 0/100) y HPLC preparativa (FA) (Método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*250 mm; Fase móvil: A-agua (0,1% ácido fórmico): B-acetonitrilo; Velocidad de flujo: 20 ml/min). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-5e** (300 mg, 56,2% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 833,4 [M+H]⁺.

Paso 4: N-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-valil)-O-((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2H-piran-2-il)-L-serins (**2-5f**)

A una solución de **2-5e** (300 mg, 0,36 mmol) en MeOH (10 ml) y THF (8 ml) se agregó Pd/C húmedo (30 mg), luego se purgó con un balón de H₂ 3 veces y se agitó a t.a. durante 2 h. Una vez completada la reacción, la mezcla se filtró a través de una cabeza de filtro de jeringa y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar **2-5f** (265 mg, en bruto) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 765,3 [M+Na]⁺.

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

A una solución de **2-5f** (265 mg) en DMF (5 ml) se agregó HATU (120 mg, 0,42 mmol) y DIPEA (124 μ L, 92 mg, 0,71 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a t.a. durante 5 min y luego se agregó **2-5g** (227 mg, 0,39 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 60 min. Tras completarse la reacción, el solvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna instantánea (eluyente: DCM/MeOH= 95/5 a 90/10) para proporcionar **2-5h** (280 mg, 59,6% de rendimiento) en forma de sólido marrón.

MS (ESI) m/z: 1326,4 [M+Na]⁺.

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

A una solución de **2-5h** (280 mg, 0,21 mmol) en DMF (5 ml) se agregó Et₂N (478 μ L, 340 mg, 4,29 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 0,5 h. Tras completarse la reacción, la mezcla se concentró al vacío para proporcionar **2-5i** (220 mg, en bruto) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 1082,4 [M+H]⁺.

Paso 7: ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-3-(((2-(((2-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-

piran-2-carboxílico (2-5j)

A la solución de **2-5i** (220 mg) en MeOH/H₂O (5/5 ml) se agregó Na₂CO₃ (151 mg, 1,42 mmol), y la mezcla se agitó a t.a. durante 9 h. La solución se purificó por HPLC preparativa (FA) (Método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5µm 19*250 mm; Fase móvil: A- agua (0,1% ácido fórmico): B-acetonitrilo; Velocidad de flujo: 20 ml/min). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-5j** (45 mg, 23,8% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

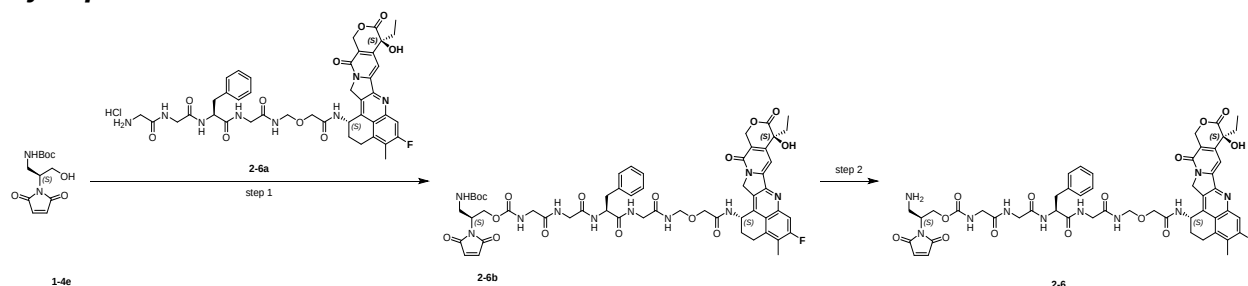
MS (ESI) m/z: 942,3 [M+H]⁺.

Paso 8: ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)propanamido)-3-metilbutanamido)-3-((2-(((2-(((1R,9R)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetoxi)metil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**2-5**)

A la solución de **1-3** (5,76 mg, 0,026 mmol) y HATU (9,576 mg, 0,025 mmol) en DMF seca (1 ml) se agregó DIPEA (7,3 µL, 5,4 mg, 0,042 mmol), y la mezcla se agitó a t.a. durante 15 min. La solución se agregó por goteo a la solución de **2-5j** (20 mg, 0,021 mmol) en DMF seca (1 ml), y se agitó a t.a. durante 15 min. La solución se purificó por HPLC preparativa (FA) (Método: columna: XBridge Prep C18 OBD 5µm 19*250 mm; Fase móvil: A-agua (0,1% ácido fórmico): B-acetonitrilo; Velocidad de flujo: 20 ml/min). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-5** (7,4 mg, 31,0% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 1172,4 [M+Na]⁺.

Ejemplo 2-6



Paso 1: ((10S,21S)-10-bencil-21-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15,18-hexaoxo-3,19-dioxa-5,8,11,14,17-pentaazadocosan-22-il)carbamato de ter-butilo (**2-6b**)

A una mezcla de **1-4e** (205,7 mg, 0,76 mmol) en DMF (3 ml) se agregó DSC (195,0 mg, 0,76 mmol) y DIPEA (118,1 mg, 0,91 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 2 hr. Se agregó **2-6a** (500,7 mg, 0,57 mmol, adquirido de MedChemExpress) y luego se agitó a t.a. durante 10 min. La mezcla se filtró, y el filtrado se purificó por HPLC preparativa (FA) para proporcionar **2-6** (230 mg) en forma de sólido amarillo oscuro.

MS (ESI) m/z: 1160,8 [M+Na]⁺.

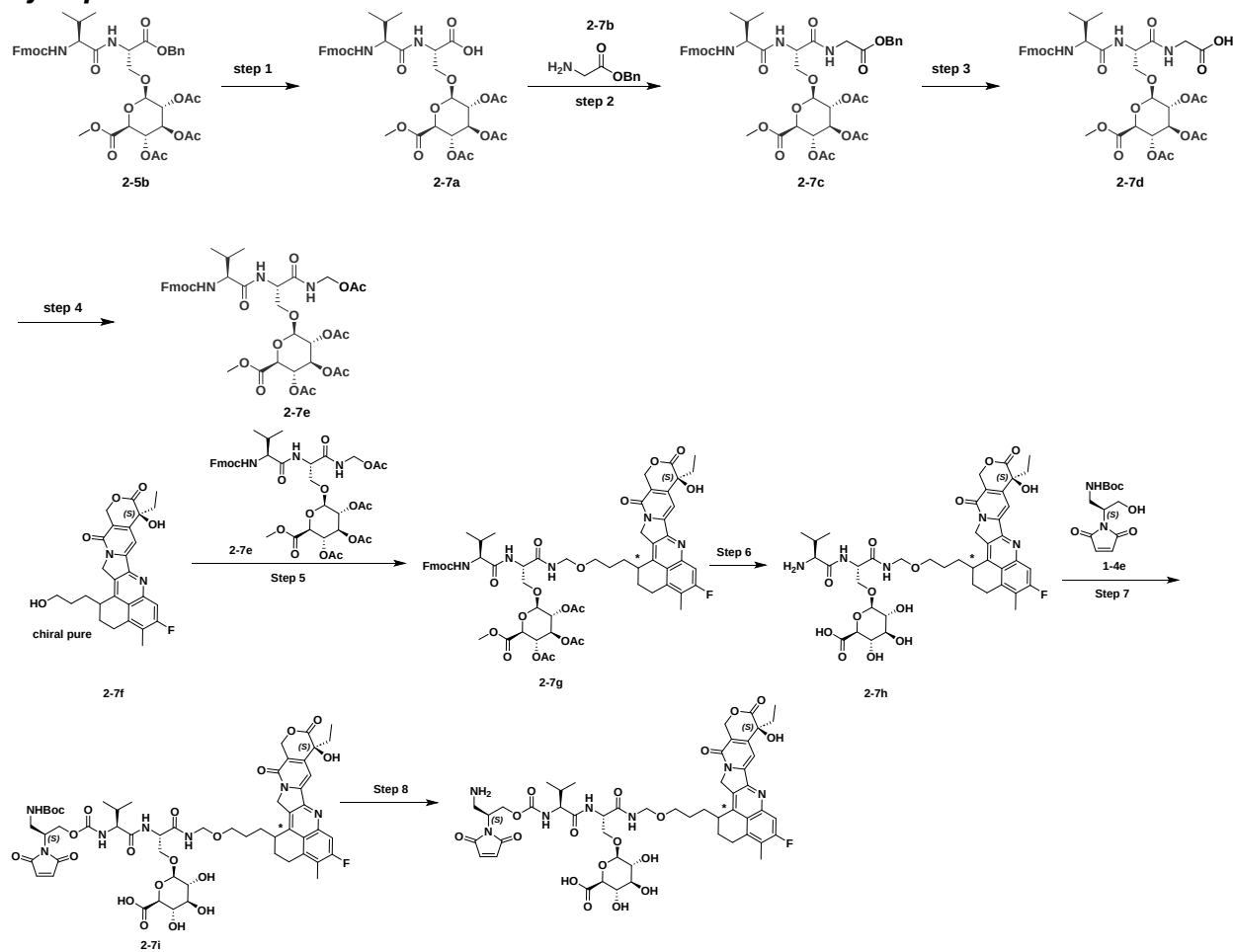
Paso 2: carbamato de (S)-3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propil ((S)-10-bencil-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-ilo) (**2-6**)

A una mezcla de **2-6b** (30,0 mg, 0,026 mmol) en DCM (2 ml) se agregó ZnBr₂ (237,7 mg, 1,06 mmol), y la mezcla se calentó hasta 45 °C durante 16 hr. La mezcla se concentró al vacío para eliminar el DCM, luego se disolvió en DMSO/H₂O y se purificó por HPLC preparativa (FA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-6** (12,6 mg, 45% de

rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 1037,8 $[M+H]^+$.

Ejemplo 2-7



Paso 1: N-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-valil)-O-((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-L-serina (**2-7a**)

A una mezcla de **2-5b** (4,1 g, 4,92 mmol) en MeOH (50 ml), THF (100 ml) y DCM (20 ml) se agregó Pd/C húmedo (400 mg, 10% de pureza). La suspensión negra se purgó con un balón de H₂ tres veces y luego se agitó a t.a. durante 1 hr. La suspensión negra se filtró a través de un taco de Celite y se lavó con MeOH (200 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío para proporcionar **2-7a** (3650 mg, 99,8% de rendimiento) en forma de sólido blanquecino.

MS (ESI) m/z : 743,6 $[M+H]^+$.

Paso 2: triacetato de (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-((2-(benciloxi)-2-oxoetil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**2-7c**)

A una solución de **2-7a** (3,65 g, 4,92 mmol) y **2-7c** (1,66 g, 4,92 mmol) en DMF (50 ml) se agregó HATU (1,87 g, 4,92 mmol) y DIPEA (1,59 g, 12,29 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 30 min. Luego de completada la reacción, la mezcla se purificó por FCC (MeOH/DCM=0~10%), la fracción se concentró al vacío para proporcionar **2-7c** (3,8 g, 86,9% de rendimiento) en forma de sólido espumoso blanquecino.

MS (ESI) m/z : 890,7 $[M+H]^+$.

Paso 3: N-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-valil)-O-((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-

triacetoxi-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2H-piran-2-il)-L-serilglicina (**2-7d**)

A una mezcla de **2-7c** (3,8 g, 4,27 mmol) en MeOH (150 ml) y DCM (50 ml) se agregó Pd/C húmedo (400 mg, 10% de pureza). La suspensión negra se purgó con un balón de H₂ tres veces y luego se agitó a t.a. durante 40 min. La suspensión negra se filtró a través de un taco de Celite y se lavó con MeOH (150 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío para proporcionar **2-7d** (3,3 g, 96,6% de rendimiento) en forma de sólido blanquecino.

MS (ESI) m/z: 800,7 [M+H]⁺.

Paso 4: triacetato de (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-((acetoximetil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo (**2-7e**)

A una solución de **2-7d** (3,3 g, 4,13 mmol) en DMF (30 ml) se agregó Pb(OAc)₄ (2,74 g, 6,19 mmol), Cu(OAc)₂ (74,9 mg, 0,41 mmol) y HOAc (247,8 mg, 4,13 mmol). La mezcla de color oscuro resultante se purgó con un balón de N₂ tres veces y luego se agitó a 65 °C durante 40 min; la mezcla se tornó azul oscura. La mezcla se diluyó con EtOAc (300 ml), se lavó con salmuera (100 ml * 3), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC (MeOH/DCM=0~10%), y la fracción se concentró al vacío para proporcionar **2-7e** (2,8 g, 83,4% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

MS (ESI) m/z: 836,6 [M+Na]⁺.

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

Una mezcla en suspensión blanca de **2-7e** (301 mg, 0,37 mmol), **2-7f** (177 mg, 0,37 mmol) y tamices moleculares 4Å (500 mg) en THF anhidro (10 ml) se agitó a t.a. durante 10 min. Se agregó Sc(OTf)₃ (218 mg, 0,44 mmol) y la suspensión amarilla resultante se agitó a t.a. durante 4 hr. La mezcla en suspensión amarilla se filtró a través de un taco de Celite y se lavó con EA. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ sat. (30 ml) y salmuera (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por columna de gel de sílice (MeOH/DCM=0%~5%). La fracción se concentró al vacío para proporcionar **2-7g** (353 mg, 77,5% de rendimiento) en forma de espuma blanca.

MS (ESI) m/z: 1254,8 [M+Na]⁺.

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

2-7h (65 mg, 54,3% de rendimiento) en forma de sólido blanco se sintetizó de acuerdo con el Paso 6 del Ejemplo **2-5**.

MS (ESI) m/z: 870,7 [M+H]⁺.

Paso 7: ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-(((7S,12S,15S)-7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-15-(((3-((9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)propoxi)metil)carbamoil)-12-isopropil-2,2-dimetil-4,10,13-trioxo-3,9-dioxa-5,11,14-

triazahexadecan-16-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**2-7i**)

2-7i (18 mg, 40,1% de rendimiento) en forma de sólido blanco se sintetizó de acuerdo con el Paso 1 del Ejemplo 2-6.

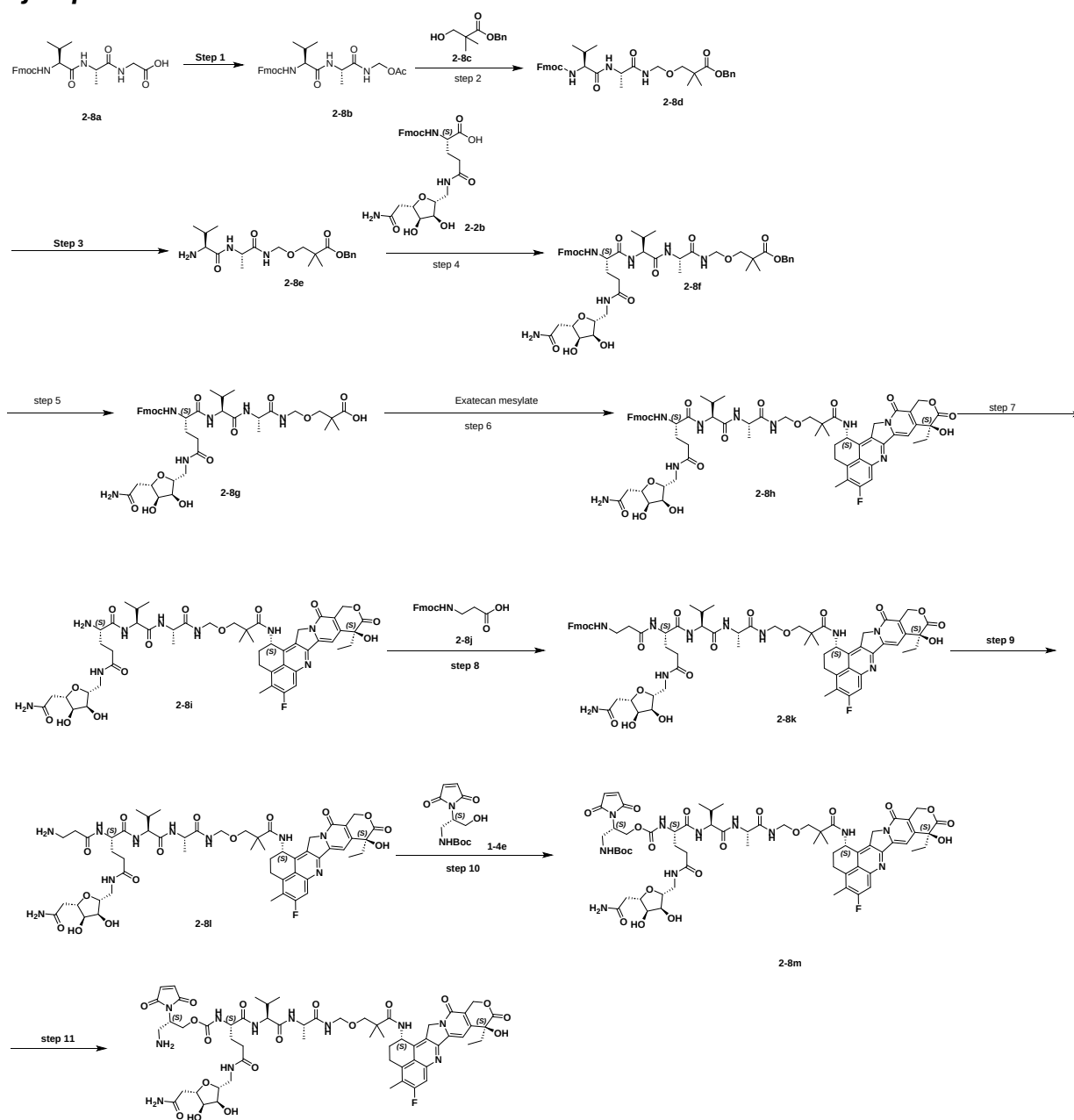
MS (ESI) m/z : 1166,9 $[M+H]^+$.

Paso 8: ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-(((2S)-2-((S)-2-(((S)-3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(((3-((9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)propoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**2-7**)

2-7 (4,7 mg, 50,1% de rendimiento) en forma de jarabe transparente se sintetizó de acuerdo con el Paso 2 del Ejemplo 2-6.

MS (ESI) m/z : 1066,8 $[M+H]^+$.

Ejemplo 2-8



2-8

Paso 1: acetato de (5S,8S)-1-(9H-fluoren-9-il)-5-isopropil-8-metil-3,6,9-trioxo-2-oxa-

4,7,10-triazaundecan-11-ilo (**2-8b**)

A una mezcla de **2-8a** (5,0 g, 10,70 mmol) en DMF (100 ml) se agregó Cu(OAc)₂ (738,2 mg, 4,06 mmol), Pb(OAc)₄ (5,41 g, 12,2 mmol) y ácido acético glacial (1,4 ml, 1,5 g, 24,3 mmol). La mezcla azul oscura resultante se purgó con un balón de N₂ tres veces, luego se calentó hasta 70 °C durante 1 hr, y se tornó una mezcla verde. La mezcla se diluyó con EtOAc (1000 ml), se lavó con salmuera (300 ml * 3), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar el producto en bruto. Este se trituró con MTBE/PE (10/1, 500 ml) y se filtró, seguido de secado a alto vacío de la torta de filtrado para proporcionar **2-8b** (4,4 g, 85,4% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido. MS (ESI) m/z: 504,5 [M+Na]⁺.

¹H RMN (400 MHz, dmsO) δ 8,89 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,75 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 7,43 (dd, J = 14,4, 7,6 Hz, 3H), 7,35–1,30(m, 2H), 5,13–5,05 (m, 2H), 4,35 – 4,19 (m, 4H), 3,88 (dd, J = 8,8, 7,2 Hz, 1H), 1,98 (s, 2H), 1,26 – 1,17 (m, 4H), 0,86 (dd, J = 9,8, 6,8 Hz, 6H).

Paso 2: (5S,8S)-1-(9H-fluoren-9-il)-5-isopropil-8,14,14-trimetil-3,6,9-trioxo-2,12-dioxa-4,7,10-triazapentadecan-15-oate=O de bencilo (**2-8d**)

Una mezcla en suspensión blanca de **2-8b** (300 mg, 0,623 mmol), **2-8c** (259,6 mg, 1,246 mmol) y tamices moleculares 4Ås en THF anhidro (10 ml) se agitó a t.a. durante 10 min. Se agregó Sc(OTf)₃ (368,0 mg, 0,748 mmol) y la suspensión amarilla resultante se agitó a t.a. durante 4 hr. La mezcla en suspensión amarilla se filtró a través de un taco de Celite y se lavó con EtOAc (30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ sat. (30 ml) y salmuera (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por columna de gel de sílice (MeOH/DCM=0%~5%). La fracción se concentró al vacío para proporcionar **2-8d** (274 mg, 69,8% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 652,6 [M+Na]⁺.

Paso 3: 3-(((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)metoxi)-2,2-dimetilpropanoato de bencilo (**2-8e**)

A una solución de **2-8d** (274,0 mg, 0,44 mmol) en DMF (5 ml) se agregó Et₂N (477,3 mg, 5,53 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 20 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se coevaporó con Tol dos veces para proporcionar **2-8e** (275,3 mg, en bruto) en forma de aceite marrón.

MS (ESI) m/z: 430,4 [M+Na]⁺.

Paso 4: (5S,8S,11S)-5-(3-((((2S,3R,4S,5R)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)-1-(9H-fluoren-9-il)-8-isopropil-11,17,17-trimetil-3,6,9,12-tetraoxo-2,15-dioxa-4,7,10,13-tetraazaoctadecan-18-oato de bencilo (**2-8f**)

A una solución de **2-8e** (275,3 mg, en bruto) y **2-2b** (282,3 mg, 0,52 mmol) en DMF (5 ml) se agregó HATU (198,2 mg, 0,52 mmol) y DIPEA (168,4 mg, 1,30 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 10 min. La mezcla se purificó por fase inversa (C18, 60 g, 30%~70%), y la fracción se liofilizó para proporcionar **2-8f** (370 mg, 91,5% de rendimiento) en forma de sólido marrón.

MS (ESI) m/z: 953,8 [M+Na]⁺.

Paso 5: ácido (5S,8S,11S)-5-(3-((((2S,3R,4S,5R)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)-1-(9H-fluoren-9-il)-8-isopropil-

11,17,17-trimetil-3,6,9,12-tetraoxo-2,15-dioxa-4,7,10,13-tetraazaoctadecan-18-oico
(**2-8g**)

A una mezcla de **2-8f** (370 mg, 0,388 mmol) en DMF/MeOH (1:1, 15 ml) se agregó Pd/C (35 mg). La suspensión negra se purgó con un balón de H₂ tres veces, luego se agitó a t.a. durante 6 hr bajo un balón de H₂. La mezcla de reacción se filtró a través de un taco de Celite y se lavó con DMF (15 ml) y MeOH (50 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío y se coevaporaron con Tol tres veces para proporcionar **2-8g** (350 mg, en bruto) en forma de sólido marrón claro.

MS (ESI) m/z: 863,7 [M+Na]⁺.

Paso 6: ((6S,9S,12S)-1-((2S,3R,4S,5R)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)-19-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-9-isopropil-12,18,18-trimetil-3,7,10,13,19-pentaoxo-16-oxa-2,8,11,14-tetraazonadecan-6-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**2-8h**)

2-8h (276,1 mg, 65% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido se sintetizó de acuerdo con el Paso 3 del Ejemplo 2-4.

MS (ESI) m/z: 1282,1 [M+Na]⁺.

Paso 7: (S)-2-amino-N5-(((2S,3R,4S,5R)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-N1-((S)-1-(((S)-1-(((3-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)pentanodiamida (**2-8i**)

A una solución de **2-8h** (276,1 mg, 0,22 mmol) en DMF (5 ml) se agregó Et₂N (240,6 mg, 3,29 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 20 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se coevaporó con Tol dos veces para proporcionar **2-8i** (278,3 mg, en bruto) en forma de sólido marrón.

MS (ESI) m/z: 1036,9 [M+H]⁺.

Paso 8: ((8S,11S,14S)-14-(3-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-11-isopropil-2,2,8-trimetil-1,7,10,13,16-pentaoxo-4-oxa-6,9,12,15-tetraazaoctadecan-18-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**2-8k**)

A una solución de **2-8i** (49,9 mg, 0,048 mmol) y **2-8j** (15,0 mg, 0,048 mmol) en DMF (3 ml) se agregó HATU (18,3 mg, 0,048 mmol) y DIPEA (18,7 mg, 0,145 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 10 min. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (FA 0,1%), y la fracción se liofilizó para proporcionar **2-8k** (42 mg, 65,6% de pureza) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 1352,0 [M+Na]⁺.

Paso 9: (S)-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-2-(3-aminopropanamido)-N1-((S)-1-(((S)-1-(((3-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-

il)pentanodiamida (**2-8l**)

A una solución de **2-8k** (42 mg, 0,032 mmol) en DMF (5 ml) se agregó Et₂N (34,7 mg, 0,474 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 20 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se coevaporó con Tol dos veces para proporcionar **2-8l** (43 mg, en bruto) en forma de sólido marrón.

MS (ESI) m/z: 1107,9 [M+H]⁺.

Paso 10: ((2S,7S,10S,13S)-7-(3-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-20-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-10-isopropil-13,19,19-trimetil-5,8,11,14,20-pentaoxo-4,17-dioxa-6,9,12,15-tetraazaicosil)carbamato de ter-butilo (**2-8m**)

A una solución de **1-4e** (120 mg, 0,444 mmol) en DMF (3 ml) se agregó carbonato de bis (4-nitrofenilo) (148,7 mg, 0,489 mmol) y DIPEA (94,7 mg, 0,733 mmol). La mezcla amarilla clara resultante se agitó a t.a. durante 2 hr. Se purificó por HPLC preparativa (FA), y la fracción se concentró al vacío para proporcionar carbonato activo (81,6 mg, 42,2% de rendimiento) en forma de sólido blanco. Al carbonato activo (13,8 mg, 0,032 mmol) y **2-8l** (42,5 mg, en bruto) en DMF (3 ml) se agregó DIPEA (8,2 mg, 0,063 mmol). La mezcla amarilla clara resultante se agitó a t.a. durante 1 hr. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa (FA 0,1%), y la fracción se liofilizó para proporcionar **2-8m** (28,1 mg, 0,02 mmol) en forma de sólido amarillo pálido.

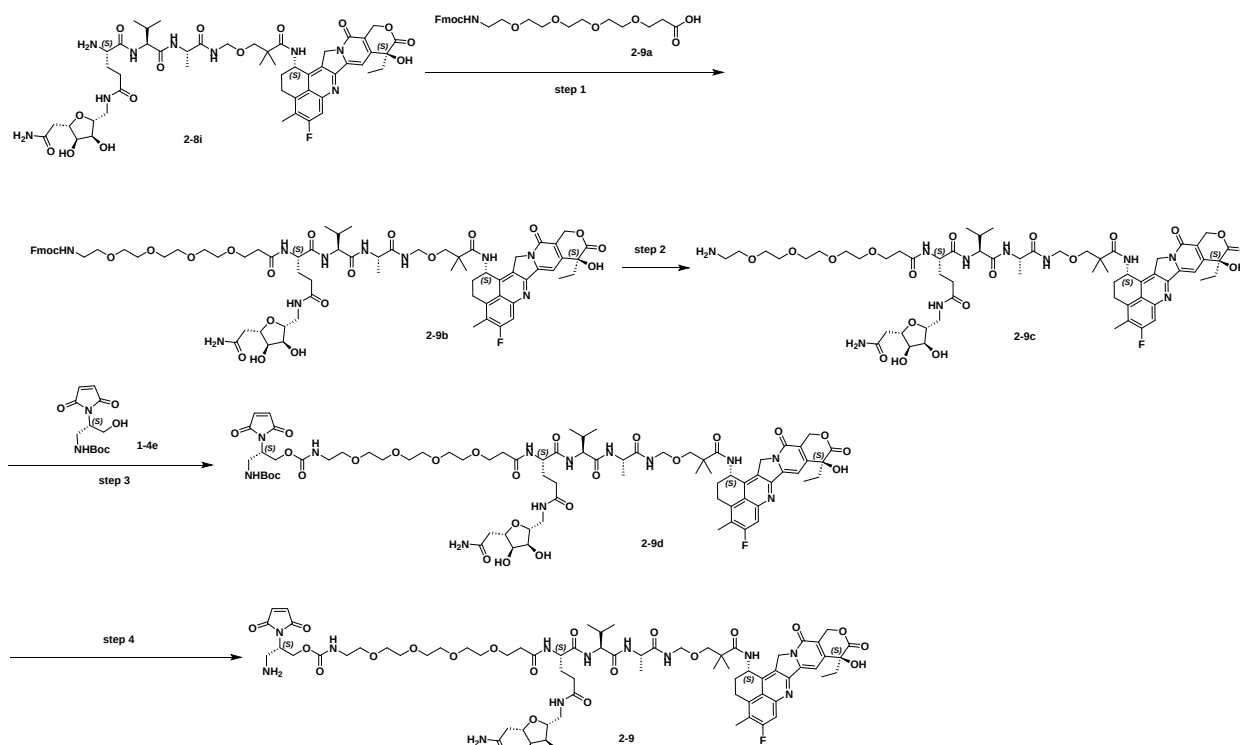
MS (ESI) m/z: 1427,1 [M+Na]⁺.

Paso 11: ((6S,9S,12S)-1-((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)-19-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-9-isopropil-12,18,18-trimetil-3,7,10,13,19-pentaoxo-16-oxa-2,8,11,14-tetraazonadecan-6-il)carbamato de (S)-3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propilo (**2-8**)

A una suspensión de **2-8m** (28,1 mg, 0,02 mmol) en DCM (3 ml) se agregó ZnBr₂ (179,7 mg, 0,798 mmol) y luego se agitó a 45 °C durante 4 hr. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en DMSO y luego se purificó por HPLC preparativa (0,1% FA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-8** (15,7 mg, 60,4% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

MS (ESI) m/z: 1304,1 [M+H]⁺.

Ejemplo 2-9

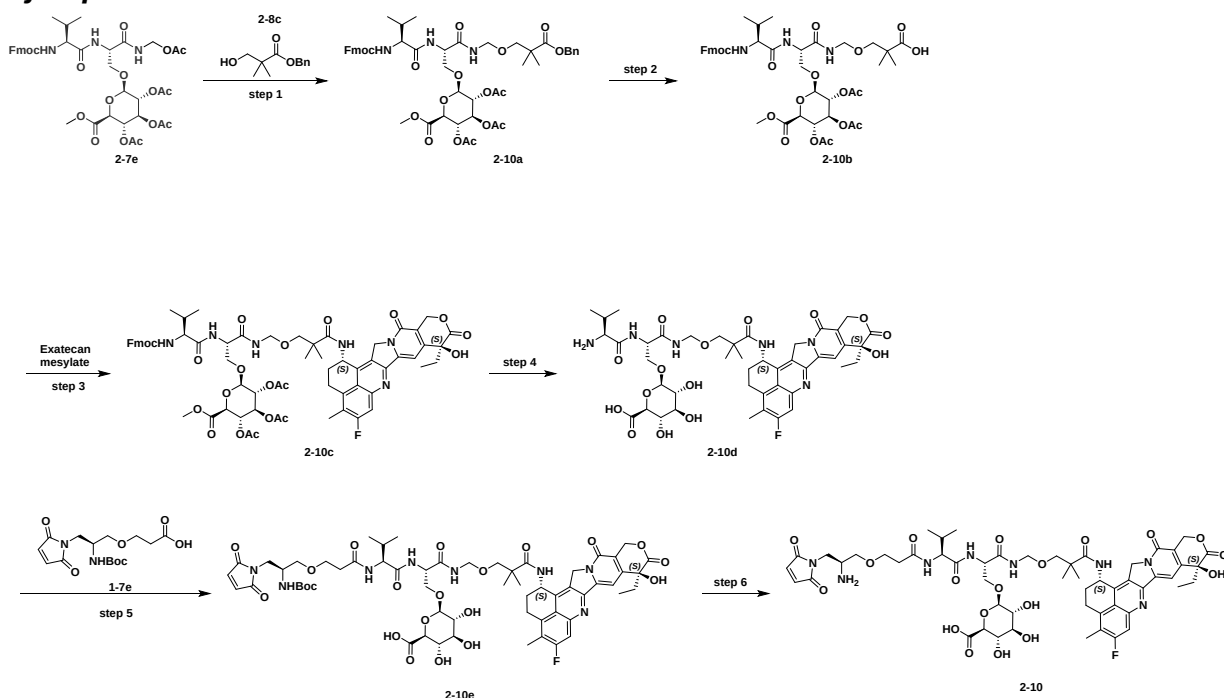


((17S,20S,23S)-17-(3-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)-30-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-20-isopropil-23,29,29-trimetil-15,18,21,24,30-pentaoxo-3,6,9,12,27-pentaoxa-16,19,22,25-tetraazatriacontil)carbamato de (S)-3-((ter-butoxicarbonil)amino)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propilo (**2-9**)

2-9 (14,4 mg, 61,5% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de síntesis del Ejemplo **2-8**.

MS (ESI) m/z : 1480,2 $[M+H]^+$.

Ejemplo 2-10



Paso 1: triacetato de (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-3-(((3-(benciloxi)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**2-10a**)

Una mezcla en suspensión blanca de **2-7e** (300 mg, 0,37 mmol), **2-8c** (154 mg, 0,74 mmol) y tamices moleculares 4Ås (500 mg) en THF anhidro (10 ml) se agitó a t.a. durante 10 min. Se agregó Sc(OTf)₃ (217,9 mg, 0,44 mmol) y la suspensión amarilla resultante se agitó a t.a. durante 4 hr. La mezcla en suspensión amarilla se filtró a través de un taco de Celite y se lavó con EA. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ sat. (30 ml) y salmuera (30 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por columna de gel de sílice (MeOH/DCM=0%~5%). La fracción se concentró al vacío para proporcionar **2-10a** (275 mg, 77,5% de rendimiento) en forma de sólido espumoso blanco.

MS (ESI) m/z: 984,8 [M+Na]⁺.

Paso 2: ácido (5S,8S)-1-(9H-fluoren-9-il)-5-isopropil-14,14-dimetil-3,6,9-trioxo-8-(((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)metil)-2,12-dioxa-4,7,10-triazapentadecan-15-oico (**2-10b**)

A una solución de **2-10a** (275 mg, 0,29 mmol) en MeOH (10 ml) se agregó Pd/C húmedo (55 mg, 10% de pureza). La suspensión negra se purgó con un balón de H₂ tres veces y luego se agitó a t.a. durante 2 hr. La mezcla se filtró a través de una cabeza de jeringa y se lavó con MeOH (15 ml), y se concentró al vacío para proporcionar **2-10b** (230 mg, en bruto) en forma de sólido espumoso blanco.

MS (ESI) m/z: 894,6 [M+Na]⁺.

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

A una mezcla de **2-10b** (230 mg, en bruto), exatecan mesilato (139,9 mg, 0,26 mmol) y HATU (100,3 mg, 0,26 mol) en DMF (5 ml) se agregó DIPEA (102,3 mg, 0,79 mmol). La mezcla marrón resultante se agitó a t.a. durante 1 hr. La mezcla se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con salmuera (20 ml * 3), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar un residuo. Este se purificó por FCC (MeOH/DCM = 0%~3%), y se concentró al vacío para proporcionar **2-10c** (325 mg, 95,6% de rendimiento) en forma de sólido espumoso blanquecino.

MS (ESI) m/z: 1289,9 [M+H]⁺.

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

A una solución de **2-10c** (325 mg, 0,25 mmol) en DMF (5 ml) se agregó Et₃N (523,2 mg, 5,06 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 20 min. Después de que LCMS mostrara que la reacción estaba completa, la mezcla se concentró al vacío para proporcionar a producto

en bruto. Este se disolvió en MeOH (6 ml), y se agregó K₂CO₃ (174,7 mg, 1,26 mmol) y se agitó a t.a. durante 10 min. Luego se agregó H₂O (2 ml) a la mezcla y se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se acidificó con KHSO₄ sat. a 0 °C hasta pH=3, se filtró y se purificó por HPLC preparativa (0,1% FA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-10d** (140 mg, 59,7% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

MS (ESI) m/z: 927,4 [M+H]⁺.

¹H RMN (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9,56 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,07 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,54 (dd, J = 13,2, 7,2 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,18 (dd, J = 41,6, 18,8 Hz, 2H), 5,09–5,02 (m, 1H), 4,96 (s, 1H), 4,62 (dd, J = 10,0, 6,8 Hz, 1H), 4,56–4,44 (m, 2H), 4,19 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 3,82 (dd, J = 10,8, 6,8 Hz, 1H), 3,61 (dd, J = 11,6, 6,4 Hz, 2H), 3,17–3,05 (m, 4H), 2,94 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,11 (dt, J = 21,3, 7,6 Hz, 2H), 2,03–1,93 (m, 2H), 1,92–1,78 (m, 3H), 1,12 (d, J = 8,0 Hz, 6H), 0,87 (dd, J = 13,0, 6,6 Hz, 9H).

Paso 5: ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-(((6S,13S,16S)-6-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-16-(((3-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)carbamoil)-13-isopropil-2,2-dimetil-4,11,14-trioxo-3,8-dioxa-5,12,15-triazaheptadecan-17-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**2-10e**)

A una solución de **1-7e** (6,7 mg, 0,02 mmol) en DMF (2 ml) se agregó HATU (8,6 mg, 0,02 mmol) y DIPEA (5,2 mg, 0,04 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 10 min. Se agregó **2-10d** (15 mg, 0,02 mmol) y se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (FA) para proporcionar **2-10e** (9,1 mg, 44,4% de rendimiento) en forma de sólido blanquecino.

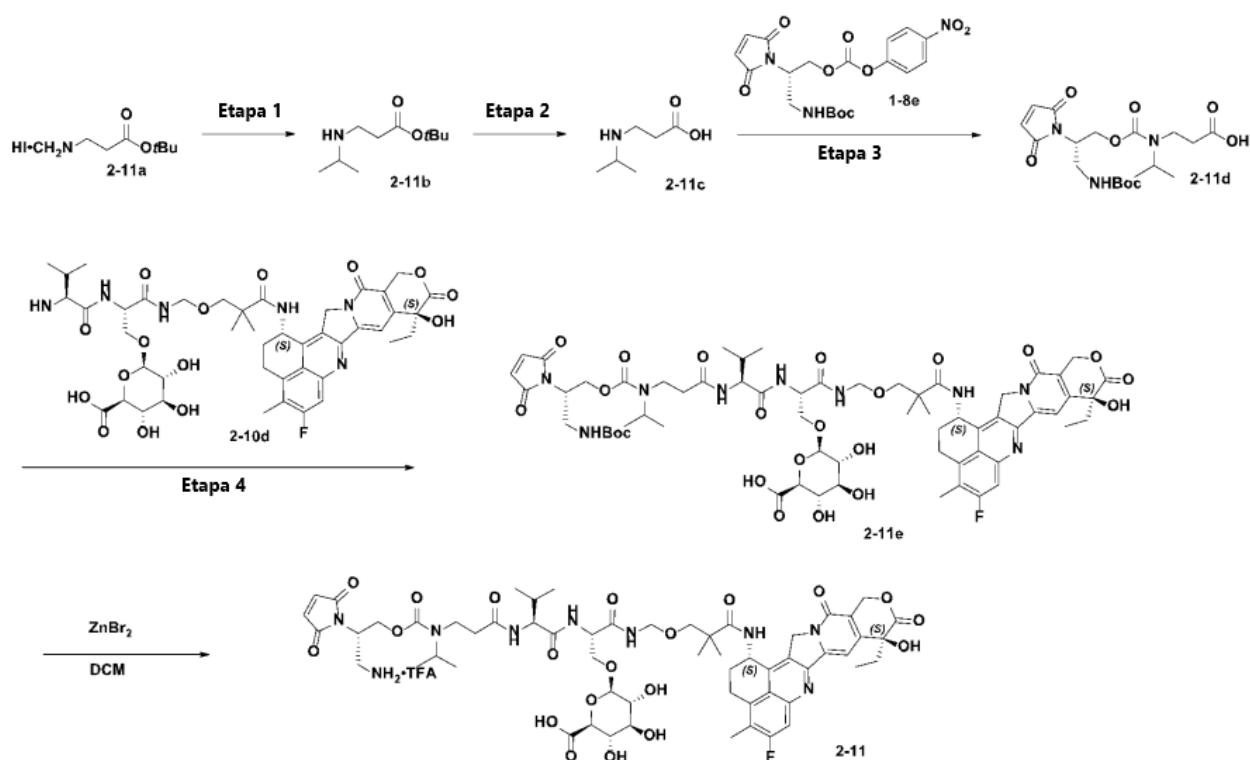
MS (ESI) m/z: 1252,1 [M+H]⁺.

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

A una suspensión de **2-10e** (9,1 mg, 0,007 mmol) en DCM (1,5 ml) se agregó ZnBr₂ (32,4 mg, 0,14 mmol), luego se agitó a 45 °C durante 8 hr. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en DMSO, luego se purificó por HPLC preparativa (0,1% FA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-10** (7,1 mg, 85,7% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 1151,9 [M+H]⁺.

Ejemplo 2-11



Paso 1: 3-(isopropilamino)propanoato de *ter*-butilo (**2-11b**)

A una solución de **2-11a** (908 mg, 5,0 mmol) y acetona (580 mg, 10,0 mmol) en MeOH-H₂O (1:1, 20 ml) se agregó NaBH₃CN (1,28 g, 20,0 mmol) a t.a. La reacción se agitó a t.a. durante 18 h. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se redisolvió en DCM (20 ml) y se lavó con NaHCO₃ sat. (10 ml), H₂O (10 ml), salmuera (10 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar el producto objetivo en bruto **1-11b** (1,21 g) en forma de aceite incoloro, el cual se usó para el siguiente paso directamente. MS (ESI) m/z: 188,2 [M+H]⁺.

Paso 2: ácido 3-(isopropilamino)propanoico (**2-11c**)

Una solución de **2-11b** (600 mg, 2,5 mmol) en TFA/DCM (5:2, 7 ml) se agitó a t.a. hasta el día siguiente. La mezcla se concentró al vacío, y el residuo se redisolvió en agua. La capa acuosa se lavó con EtOAc y se liofilizó para proporcionar **2-11c** (444,4 mg, 77,9% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z: 132,1 [M+H]⁺.

Paso 3: ácido (S)-7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-11-isopropil-2,2-dimetil-4,10-dioxo-3,9-dioxa-5,11-diazatetradecan-14-oico (**2-11d**)

A una solución de **2-11c** (12,3 mg, 0,094 mmol) y **1-8e** (20 mg, 0,046 mmol) en DMF (1 ml) se agregó DIPEA (30 mg, 0,23 mmol) y HOBt (2 mg, 0,014 mmol) a t.a. La reacción se agitó a t.a. durante 16 min. La mezcla de reacción se diluyó con DMF y se acidificó con 0,1 N HCl. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (FA), la fracción se liofilizó para proporcionar **2-11d** (6,8 mg, 34,6% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

MS (ESI) m/z: 450,48 [M+Na]⁺.

Paso 4: ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(((7*S*,16*S*,19*S*)-7-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-19-(((3-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)carbamoil)-11,16-diisopropil-2,2-dimetil-4,10,14,17-tetraoxo-3,9-dioxa-5,11,15,18-tetraazaicosan-20-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2*H*-

piran-2-carboxílico (**2-11e**)

A una solución de **2-11d** (6,8 mg, 0,0159 mmol) en DMF (0,5 ml) se agregó HATU (6,0 mg, 0,0159 mmol), DIPEA (4,7 mg, 0,0363 mmol) y **2-10d** (13,4 mg, 0,0145 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se diluyó con DMF (1,5 ml) y se acidificó con AcOH. Este se purificó por HPLC preparativa (FA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-11e** (5,1 mg, 26,4% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

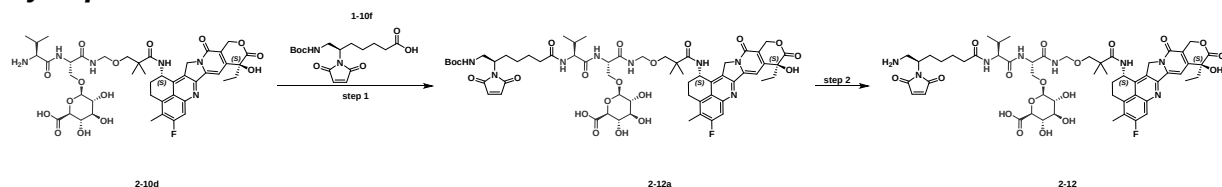
MS (ESI) m/z : 1358,9 $[M+Na]^+$.

Paso 5: ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-(((2S,5S,14S)-15-Amino-14-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-(((3-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)carbamoil)-5,10-diisopropil-4,7,11-trioxa-12-oxa-3,6,10-triazapentadecil)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**2-11**)

A una suspensión de **2-11e** (5,1 mg, 0,007 mmol) en DCM (1,5 ml) se agregó $ZnBr_2$ (32,4 mg, 0,14 mmol), luego se agitó a 45 °C durante 21 h. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en 0,1%/ACN (80:20, 1 ml) y luego se purificó por HPLC preparativa (0,1% TFA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-11** (2,2 mg, 46,6% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) m/z : 1236,8 $[M+H]^+$.

Ejemplo 2-12

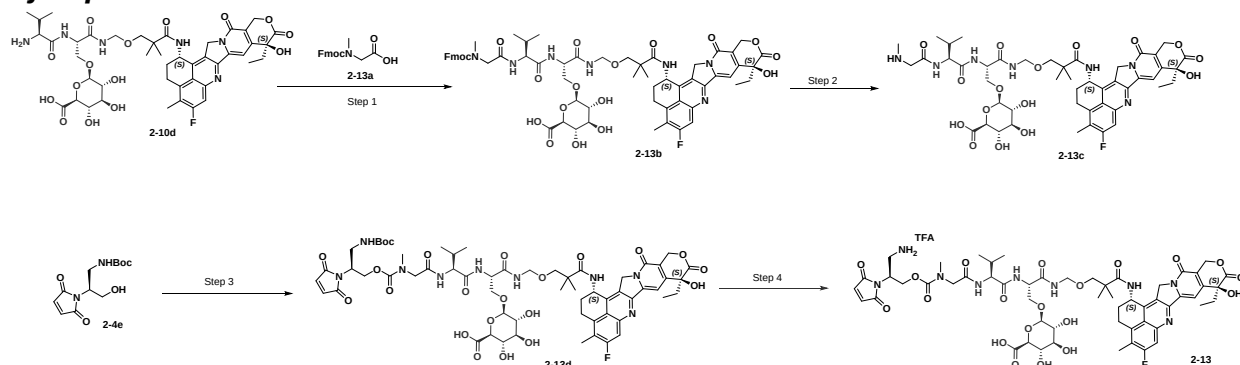


Ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-((S)-2-((S)-2-((R)-7-amino-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)heptanamido)-3-metilbutanamido)-3-(((3-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H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

2-12 (5,8 mg, 45% de rendimiento) en forma de sólido blanco se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de síntesis del Ejemplo 2-10.

MS (ESI) m/z : 1149,9 $[M+H]^+$.

Ejemplo 2-13



Paso 1: ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-(((8S,11S)-11-(((3-(((1S,9S)-9-Etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-

oxopropoxi)metil)carbamoil)-1-(9*H*-fluoren-9-il)-8-isopropil-4-metil-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazadodecan-12-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2*H*-piran-2-carboxílico (**2-13b**)

A una solución de **2-13a** (11,1 mg, 0,0356 mmol) en DMF (1 ml) se agregó HATU (13,5 mg, 0,0356 mmol), DIPEA (10,5 mg, 0,081 mmol) y **2-10d** (30 mg, 0,0323 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 30 min. La mezcla se diluyó con DMF (1,5 ml) y se acidificó con AcOH. Esto se purificó por HPLC preparativa (FA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-13b** (14,6 mg, 36,9% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

MS (ESI) *m/z*: 1221,0 [M+H]⁺.

Paso 2: ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-((*S*)-3-(((3-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)amino)-2-((*S*)-3-metil-2-(2-(metilamino)acetamido)butanamido)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2*H*-piran-2-carboxílico (**2-13c**)

A una solución de **2-13b** (14,6 mg, 0,012 mmol) en DMF (0,3 ml) se agregó Et₂NH (8,8 mg, 0,12 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 20 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se coevaporó con tolueno dos veces para proporcionar **2-13c** en forma de sólido marrón, el cual se usó en el siguiente paso directamente.

Paso 3: ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(((7*S*,15*S*,18*S*)-7-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-18-(((3-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)carbamoil)-15-isopropil-2,2,11-trimetil-4,10,13,16-tetraoxo-3,9-dioxa-5,11,14,17-tetraazanonadecan-19-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2*H*-piran-2-carboxílico (**2-13d**)

A una mezcla de **2-4e** (3,6 mg, 0,0132 mmol) en DMF (0,2 ml) se agregó DSC (3,5 mg, 0,0136 mmol) y DIPEA (2,3 mg, 0,018 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 3 h. Luego se agregó el sólido en bruto **2-13c** y se agitó a t.a. durante otros 30 min. La mezcla se diluyó con DMF (1,5 ml) y se acidificó con AcOH. Esto se purificó por HPLC preparativa (FA) para proporcionar **2-13d** (5,4 mg, 34,8% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

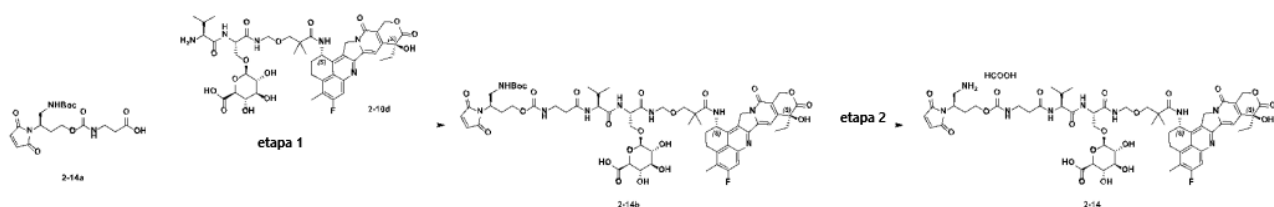
MS (ESI) *m/z*: 1294,9 [M+H]⁺.

Paso 4: ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(((2*S*,5*S*,13*S*)-14-amino-13-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-2-(((3-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)carbamoil)-5-isopropil-9-metil-4,7,10-trioxo-11-oxa-3,6,9-triazatetradecil)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2*H*-piran-2-carboxílico (**2-13**)

A una suspensión de **2-13d** (5,4 mg, 0,0042 mmol) en DCM (0,5 ml) se agregó ZnBr₂ (24 mg, 0,11 mmol), luego se agitó a 45 °C durante 24 h. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en 0,1%/ACN (80 : 20, 1 ml) luego se purificó por HPLC preparativa (0,1% TFA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-13** (1,3 mg, 26% de rendimiento) en forma de sólido blanco.

MS (ESI) *m/z*: 1194,9 [M+H]⁺.

Ejemplo 2-14



Ácido (R)-3-(((4-amino-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butoxi)carbonil)amino)propanoico (**2-14a**)

2-14a (280 mg, 89,6% de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de síntesis del Ejemplo 1-13.

MS (ESI) m/z : 422,3 $[M+Na]^+$.

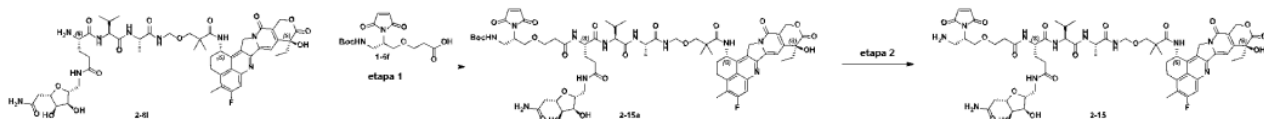
1H RMN (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 12,48 (br s, 1H), 7,03–6,99 (m, 2H), 6,94 (s, 2H), 4,08–4,03 (m, 3H), 3,86–3,83 (m, 2H), 3,17–3,11 (m, 2H), 2,35 (t, $J=7,2$ Hz, 2H), 2,14–2,09 (m, 1H), 1,91–1,84 (m, 1H), 1,32 (s, 9H).

Ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-(((2S,5S,15R)-16-amino-15-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-(((3-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)carbamoil)-5-isopropil-4,7,11-trioxo-12-oxa-3,6,10-triazahexadecil)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico—ácido fórmico (**2-14**)

2-14 (13 mg, 64,0% de rendimiento) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de síntesis del Ejemplo 2-12.

MS (ESI) m/z : 1208,9 $[M+H]^+$.

Ejemplo 2-15



Paso 1: ((8S,11S,14S,21S)-14-(3-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)-21-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-1-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-11-isopropil-2,2,8-trimetil-1,7,10,13,16-pentaoxo-4,19-dioxa-6,9,12,15-tetraazadocosan-22-il)carbamoato de ter-butilo (**2-15a**)

A una solución de **1-6f** (45 mg, 0,13 mmol) en DMF (3 ml) se agregó HATU (55,0 mg, 0,15 mmol) y DIPEA (34,1 mg, 0,26 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 10 min. Se agregó **2-8i** (147 mg, en bruto) a la mezcla y se agitó a t.a. durante 5 min. La mezcla se purificó por HPLC preparativa (FA 0,1%) para proporcionar **2-8r** (93 mg, 52% de rendimiento) en forma de sólido amarillo pálido.

MS (ESI) m/z : 1384,1 $[M+Na]^+$.

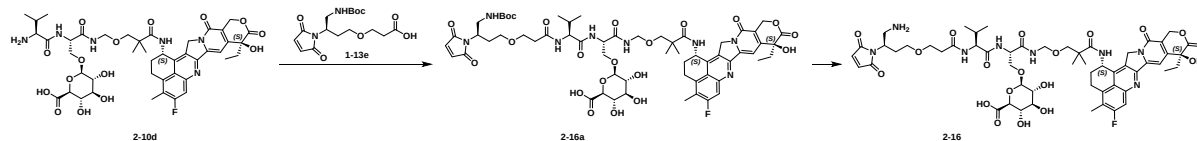
Paso 2: (S)-2-(3-((S)-3-amino-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi)propanamido)-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-amino-2-oxoetil)-3,4-dihidroxitetrahidrofuran-2-il)metil)-N1-((S)-1-(((S)-1-(((3-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-

il)pentanodiamida (**2-15**)

A una suspensión de **2-8r** (52 mg, 0,038 mmol) en DCM (4 ml) se agregó ZnBr_2 (258,2 mg, 1,147 mmol) y luego se agitó a 45 °C durante 8 hr. La mezcla se concentró al vacío y se disolvió en DMSO y luego se purificó por HPLC preparativa (0,1% FA). La fracción se liofilizó para proporcionar **2-15** (29,2 mg) en forma de sólido amarillo pálido.

MS (ESI) m/z : 1261,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 2-16



Ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-((S)-2-((S)-2-(3-((R)-4-amino-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)butoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-3-(((3-(((1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-2,2-dimetil-3-oxopropoxi)metil)amino)-3-oxopropoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**2-16**)

2-16 (13,4 mg, 79,1% de rendimiento) en forma de sólido blanco se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de síntesis del Ejemplo **2-10**.

MS (ESI) m/z : 1165,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Los compuestos de los Ejemplos 1-2 y 1-4 a 1-14 y los compuestos de referencia 1-1 y 1-3 se muestran a continuación en la Tabla 1. Los compuestos de los Ejemplos 2-2 y 2-4 a 2-16 y los compuestos de referencia 2-1 y 2-3 se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 1: Conjugadores

Compuesto Nro.	Estructura del conjugador
1-1	
1-2	
1-3	
1-4	
1-5	
1-6	

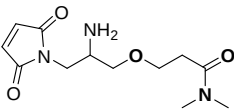
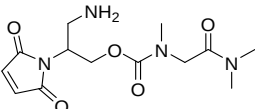
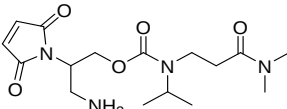
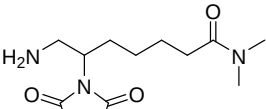
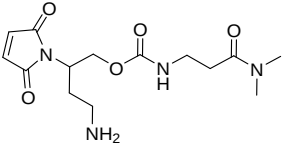
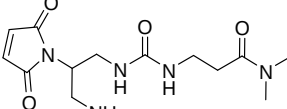
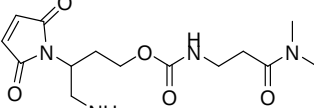
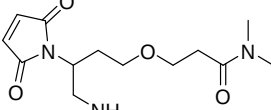
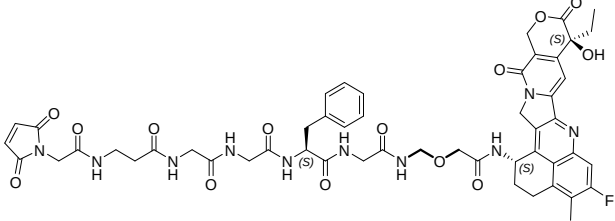
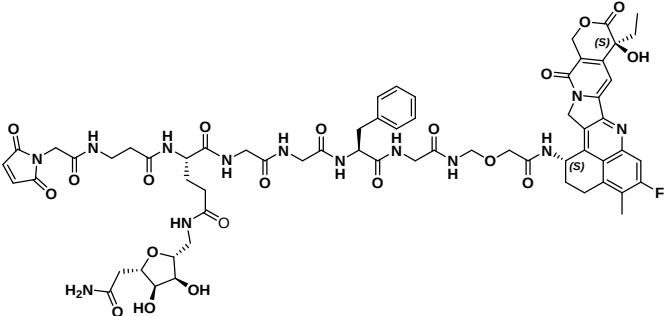
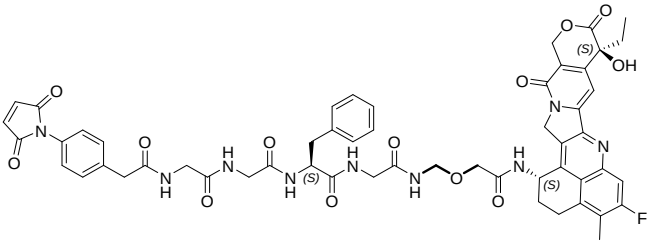
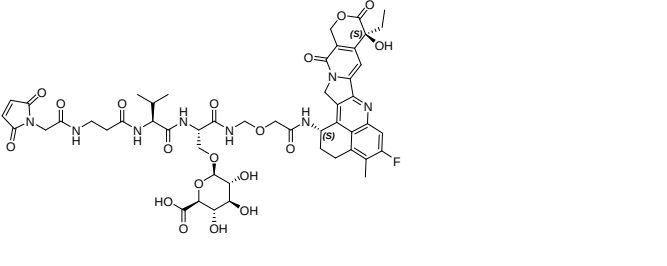
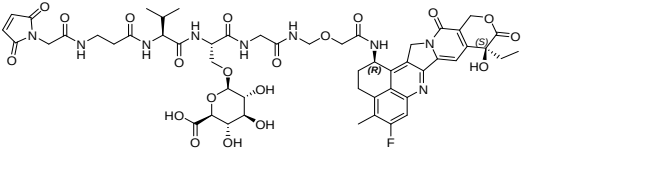
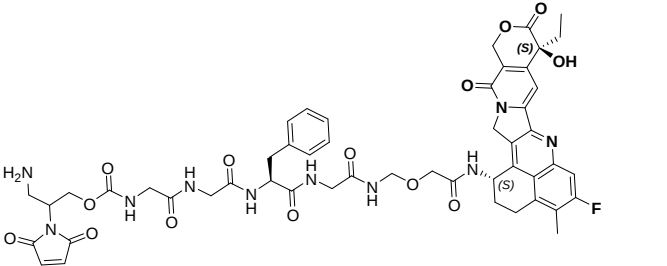
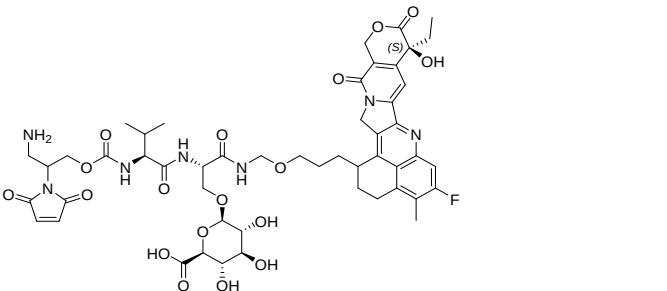
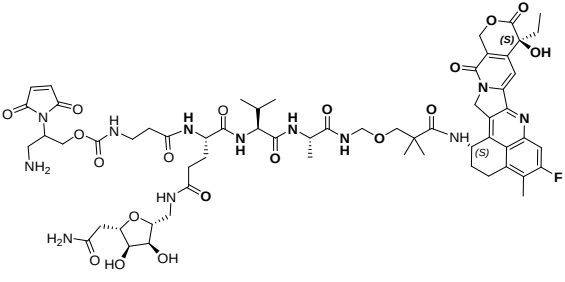
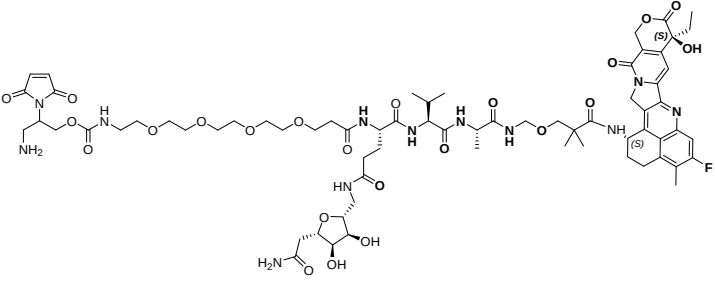
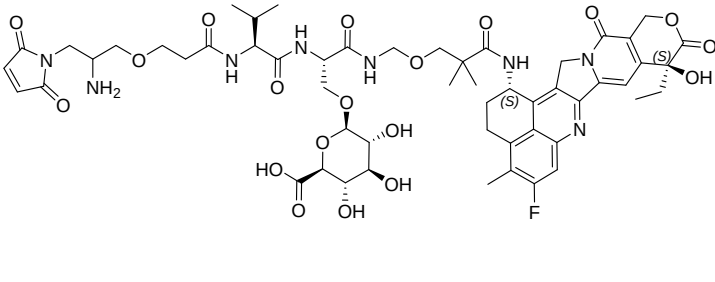
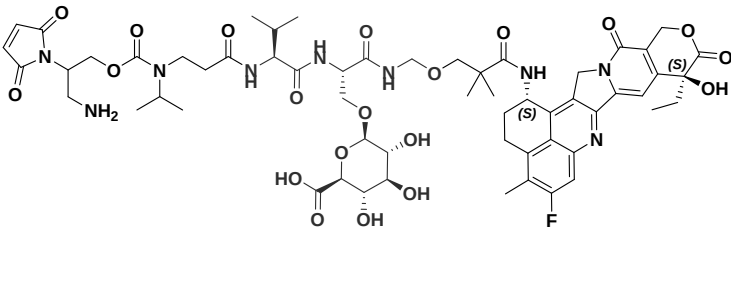
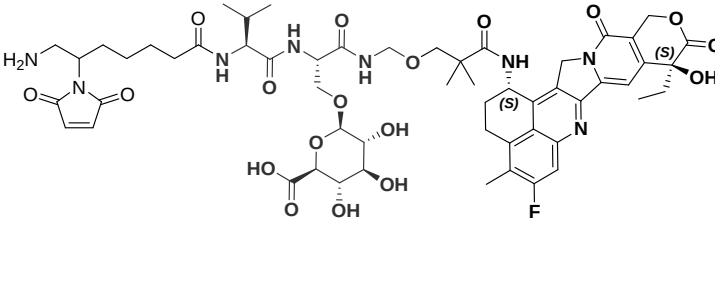
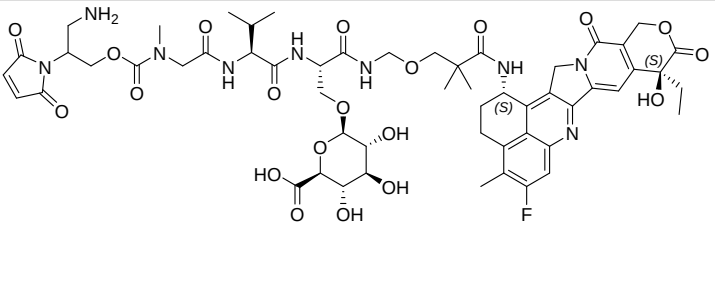
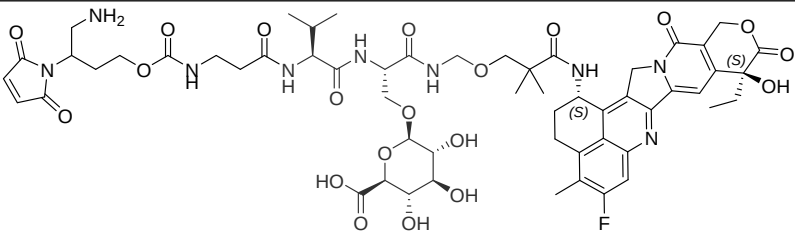
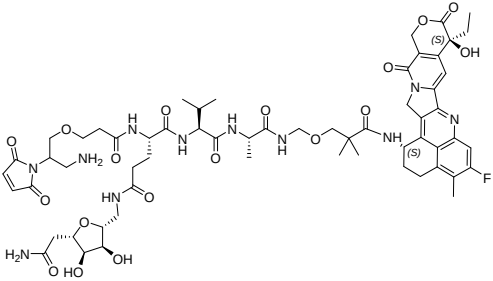
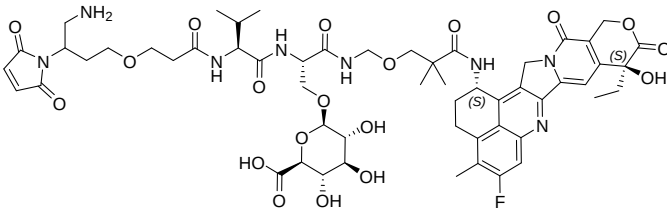
Compuesto Nro.	Estructura del conjugador
1-7	
1-8	
1-9	
1-10	
1-11	
1-12	
1-13	
1-14	

Tabla 2: Conjugador-enlazador-carga útil

Compuesto Nro.	Estructuras del conjugador-enlazador-carga útil
2-1	

Compuesto Nro.	Estructuras del conjugador-enlazador-carga útil
2-2	
2-3	
2-4	
2-5	
2-6	
2-7	

Compuesto Nro.	Estructuras del conjugador-enlazador-carga útil
2-8	
2-9	
2-10	
2-11	
2-12	
2-13	

Compuesto Nro.	Estructuras del conjugador–enlazador–carga útil
2–14	
2–15	
2–16	

Conjugado conjugador–anticuerpo y preparación y caracterización de conjugados de anticuerpo–fármaco

Preparación de conjugado anticuerpo DAR8–fármaco/conjugado conjugador–anticuerpo. Se incubó anticuerpo en tampón de conjugación (a una concentración de 0,5–25 mg/ml, tampón PBS pH 6,0–8,5) a temperatura de reducción (0–40 °C) durante 10 min. Se agregó 8–15 eq. de solución TECP (stock 5 mM en tampón PBS) a la mezcla de reacción y la reacción de reducción se dejó durante 1–8 horas a temperatura de reducción. Se agregó solvente orgánico (por ejemplo, DMSO, DMF, DMA, PG, acetonitrilo, 0–25% v/v) y stock de conjugador–enlazador–carga útil (ver Tabla 2) o conjugador (ver Tabla 1) (10–25 eq., 10 mM stock en solvente orgánico) en varios pasos después de que la mezcla de reducción se enfrió hasta 0–25 °C. La solución de conjugación se dejó durante 1–3 h a 0–25 °C, y la reacción se extinguió con N–acetil cisteína (stock 1 mM). La solución se sometió a intercambio de tampón (columna de desalación por centrifugación, ultrafiltración y diálisis) en tampón de almacenamiento (por ejemplo, tampón de acetato de histidina pH 5,5–6,5, con aditivos opcionales como sacarosa, trehalosa, tween 20, 60, 80).

Después del paso de conjugación, el ADC (o conjugado de conjugador–anticuerpo) se sometió a intercambio de tampón en tampón de apertura de anillo (pH 6,5–9,0, tampón PBS, borato o tris) y la solución se dejó a 22 o 37 °C durante 1–48 h. El proceso de apertura del anillo de maleimida se monitoreó por LCMS reducida. Una vez que se completó la hidrólisis de maleimida conjugada, los ADC resultantes se sometieron a intercambio de tampón en tampón básico tris pH 8,0–8,5 o tampón de histidina–acetato ácido pH 5,0–6,5 por diálisis.

Los conjugados de conjugador–anticuerpo y los ADC preparados de acuerdo con el método

anterior se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. El tiempo de apertura de anillo se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Método de LCMS para monitorear y determinar la hidrólisis de maleimida. El análisis de LC–MS se llevó a cabo en las siguientes condiciones de medición:

Sistema LC–MS: Espectrómetro de masas Vanquish Flex UHPLC y Orbitrap Exploris 240

Columna: MAbPac™ RP, 2,1*50mm, 4µm, 1,500 Å, Thermo Scientific™

Temperatura de la columna: 80 °C

Fase móvil A: solución acuosa de 0,1% ácido fórmico (FA)

Fase móvil B: Solución de acetonitrilo que contiene 0,1% ácido fórmico (FA)

Programa de gradiente 1: 25% B–25% B (0 min–2 min), 25% B–50% B (2 min–18 min), 50% B–90% B (18 min–18,1 min), 90% B–90% B (18,1 min–20 min), 90% B–25% B (20 min–20,1 min), 25% B–25% B (20,1 min–25 min)

Programa de gradiente 2

Cantidad de muestra inyectada: 2 µg

Parámetros de MS: Los datos de MS intactos y desnaturalizantes se adquirieron en modo HMR en configuración de R=15k y se desconvolucionaron usando el algoritmo ReSpect™ e integración Sliding Window en software BioPharma Finder™ 4.0 de Thermo Scientific™.

Caracterización de ADC. Los ADC se caracterizaron usando los siguientes métodos analíticos. Las relaciones fármaco a anticuerpo (DAR) de los ADC se determinaron por el método de LCMS o el método de HIC. La pureza SEC de los ADC preparados fueron todas > 95% de pureza.

Método de LCMS: El análisis de LC–MS se realizó en las siguientes condiciones de medición:

Sistema LC–MS: Espectrómetro de masas Vanquish Flex UHPLC y Orbitrap Exploris 240

Columna: MAbPac™ RP, 2,1*50mm, 4µm, 1,500 Å, Thermo Scientific™

Temperatura de la columna: 80 °C

Fase móvil A: Solución acuosa de 0,1% ácido fórmico (FA)

Fase móvil B: Solución de acetonitrilo que contiene 0,1% ácido fórmico (FA)

Programa de gradiente: 25% B–25% B (0 min–2 min), 25% B–50% B (2 min–18 min), 50% B–90% B (18 min–18,1 min), 90% B–90% B (18,1 min–20 min), 90% B–25% B (20 min–20,1 min), 25% B–25% B (20,1 min–25 min)

Cantidad de muestra inyectada: 1 µg

Parámetros de MS: Los datos de MS intactos y desnaturalizantes se adquirieron en modo HMR en configuración de R=15k y se desconvolucionaron usando el algoritmo ReSpect™ e integración Sliding Window en software BioPharma Finder™ 4.0 de Thermo Scientific™.

Método de HIC: El análisis de HPLC se realizó en las siguientes condiciones de medición:

Método 1

Sistema de HPLC: Sistema de HPLC Waters ACQUITY ARC

Detector: Longitud de onda de medición: 280 nm

Columna: Columna Tosoh Bioscience 4,6 µm ID×3,5 cm, 2,5 µm butilo–resina no porosa

Temperatura de columna: 25 °C

Fase móvil A: 1,5 M sulfato de amonio, 50 mM tampón de fosfato, pH 7,0

Fase móvil B: 50 mM tampón de fosfato, 25% (V/V) isopropanol, pH 7,0

Programa de gradiente: 0% B–0% B (0 min–2 min), 0% B–100% B (2 min–15 min), 100% B–100% B (15 min–16 min), 100% B–0% B (16 min–17 min), 0% B–0% B (17 min–20 min)

Cantidad de muestra inyectada: 20 µg

Método 2

Sistema HPLC: Sistema HPLC Waters ACQUITY ARC

Detector: Longitud de onda de medición: 280 nm

Columna: MABPac HIC–10, 5 µm, 4,6×10 mm (Thermo)

Temperatura de columna: 25 °C

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

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

Programa de gradiente: 20% B–20% B (0 min–1 min), 0% B–0% B (1 min–35 min), 20% B–20% B (35 min–40 min)

Velocidad de flujo: 0,5 ml/min

Preparación de muestra: La muestra se diluyó con fase móvil inicial hasta 0,5 mg/ml.

Método de SEC para determinar la pureza del ADC: El análisis de HPLC se realizó en las siguientes condiciones de medición:

Sistema HPLC: Sistema UPLC Waters H–Class

Detector: Longitud de onda de medición: 280 nm

Columna: ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1,7 µm 4,6 x 150 mm, Waters

Temperatura de columna: Temperatura ambiente

Fase móvil A: 200 mM tampón de fosfato, 250 mM cloruro de potasio, 15% alcohol isopropílico, pH 7,0

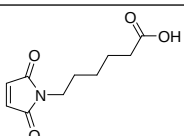
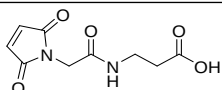
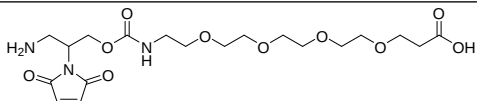
Programa de gradiente: bajo eluciones isocráticas de 10 minutos con la velocidad de flujo de 0,3 ml/min

Cantidad de muestra inyectada: 20 µg

Evaluación de hidrofobicidad del ADC: Un ADC con una mayor propiedad hidrofóbica aparecería en un tiempo de retención posterior en la cromatografía HIC (columna de interacción de hidrofobicidad). Los resultados se presentan en la Tabla 4 usando el pico de DAR8 como referencia.

Los resultados para los tiempos de apertura de anillo medidos por el método de LCMS descrito antes para el monitoreo de la hidrólisis anular se presentan en la Tabla 3 como RO T_{1/2} (h) (es decir, el tiempo, en horas, para que el 50% de los anillos de maleimida se abran).

Tabla 3: Conjugados de conjugador–anticuerpo

conjugado de conjugador–anticuerpo Nro.	Anticuerpo	Estructura del conjugador	MS DAR	RO T _{1/2} (h)
3–1	Herceptin		8,02	NA
3–3	Herceptin		8,12	36,0
3–4	Herceptin		7,98	1,6

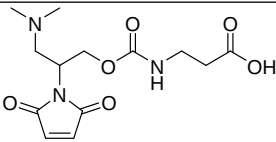
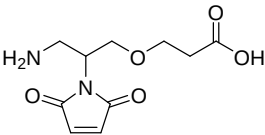
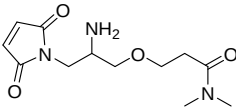
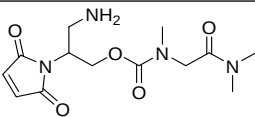
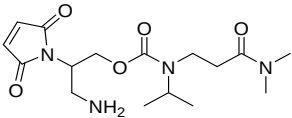
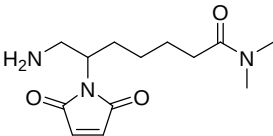
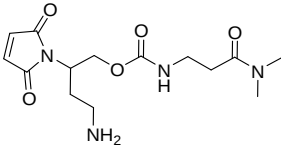
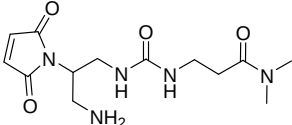
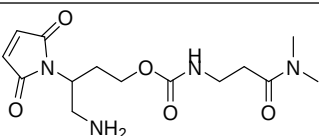
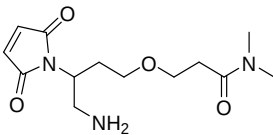
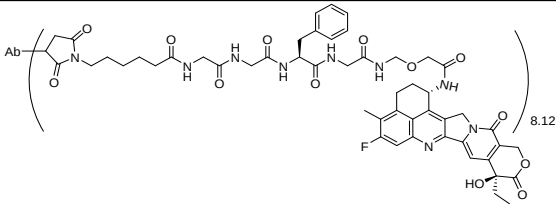
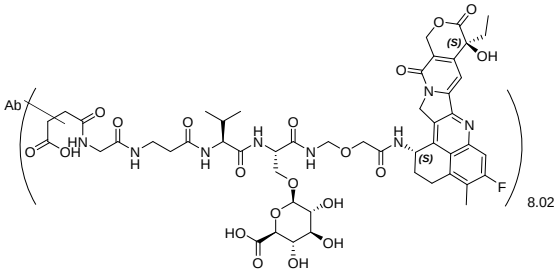
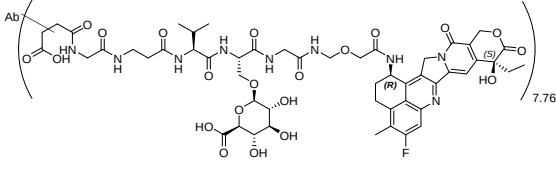
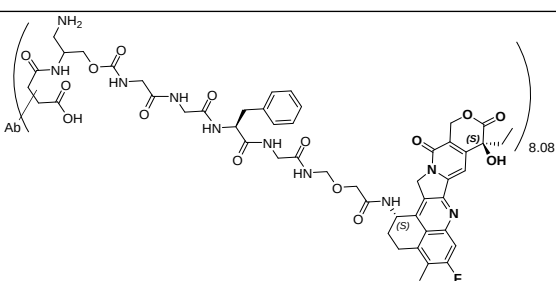
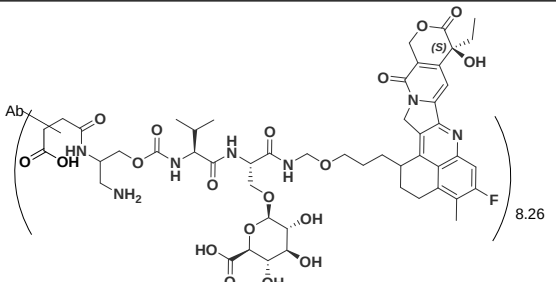
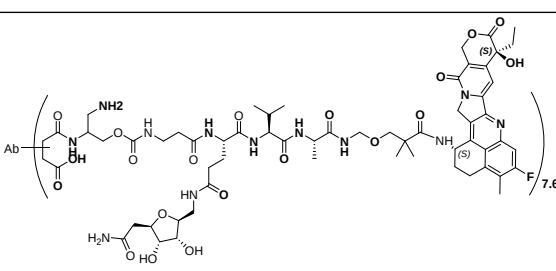
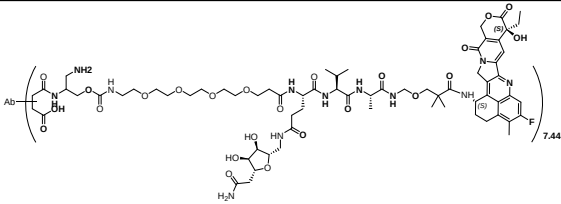
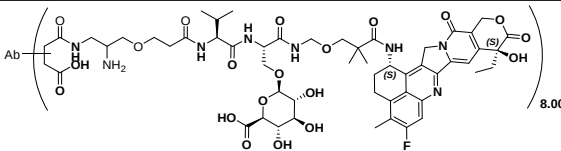
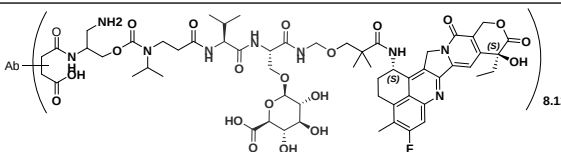
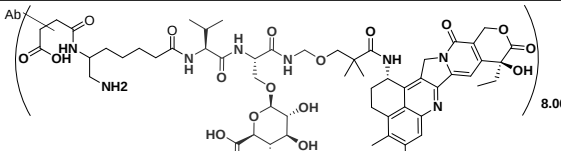
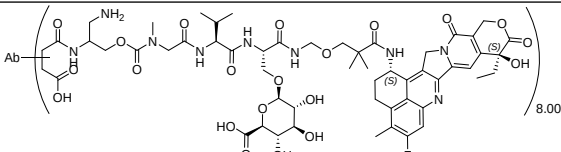
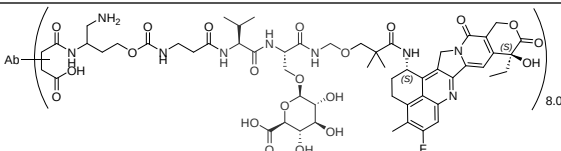
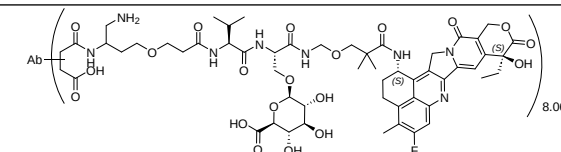
3-5	Herceptin		NA	NA
3-6	Herceptin		8,00	1,9
3-7	Herceptin		8,00	1,7
3-8	Herceptin		7,80	1,6
3-9	Herceptin		7,96	0,8
3-10	Herceptin		8,00	2,0
3-11	Herceptin		8,00	14,0
3-12	Herceptin		8,00	1,6
3-13	Herceptin		8,00	1,7
3-14	Herceptin		8,00	2,0

Tabla 4: ADC

ADC Nro.	Anticuerpo	Estructura del ADC	Tiempo de retención (min) de especies DAR8 por HIC (Método 1)
ADC4-B	Ifinatamab		10,860
ADC4-4o	Ifinatamab		9,676
ADC4-5o	Ifinatamab		9,764
ADC4-6o	Herceptin		NA
ADC4-7o	Ifinatamab		9,637
ADC4-8o	Ifinatamab		10,444

ADC Nro.	Anticuerpo	Estructura del ADC	Tiempo de retención (min) de especies DAR8 por HIC (Método 1)
ADC4-90	Ifinamab		10,883
ADC4-100	Ifinamab		9,898
ADC4-110	Ifinamab		9,948
ADC4-120	Ifinamab		9,801
ADC4-130	Ifinamab		9,877
ADC4-140	Ifinamab		9,977
ADC4-160	Ifinamab		9,795

Información de los anticuerpos

Ifinamab MABX-9001a (anticuerpo anti-B7H3)

Secuencia de cadena liviana

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHYQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTNYYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDD
VKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 2)

Cinética de hidrólisis de conjugado conjugador–anticuerpo

La cinética de hidrólisis del conjugado conjugador–anticuerpo maleimida (apertura de anillo) se presenta en las Figuras 1A–1L, Tabla 3 (para condiciones de reacción a pH 7,0, $T_{1/2}$ de hidrólisis), y la Tabla 5. Los datos de la Tabla 5 se generaron por el método de LCMS descrito antes e incluyen el tiempo, en horas, para que el anillo de maleimida se abra en más del 95% de los conjugadores, después de la conjugación del anticuerpo (“Tiempo RO Completado (>95%) (h)”). Los resultados para el conjugado conjugador–anticuerpo 3–1 indican que luego de 24 horas, aproximadamente el 0% de los anillos de maleimida estaban abiertos; los resultados para el conjugado conjugador–anticuerpo 3–3 indican que luego de 24 horas, aproximadamente el 28% de los anillos de maleimida estaban abiertos.

Tabla 5: Cinética temporal del conjugado conjugador–anticuerpo

Conjugado conjugador–anticuerpo Nro.	pH	Punto temporal (h)	MS DAR	RO (%)			Tiempo RO Completado (>95%) (h)
				LC	HC	Total	
3–1	7	1	8,02	0	0	0	24h ~0%
		3	8,02	0	0,17	0,13	
		5	8,02	0	0,2	0,15	
		7	8,02	0	0	0	
		24	8	0	0,27	0,21	
3–3	7	1	8,04	0	0	0	24h ~28%
		3	8,04	0,89	0,8	0,82	
		5	8,08	2,52	3,82	3,5	
		7	8,08	3,8	6,1	5,53	
		24	8,12	13,49	32,76	27,94	
3–4	7	1	7,96	23,19	51,56	44,47	7
		3	7,98	75,33	88,19	84,98	
		5	7,98	87,91	90,01	89,49	
		7	7,98	95,37	99,07	98,15	
		24	7,98	99,66	99,08	99,23	
3–6	7	1	8	15,27	39,88	33,73	24
		3	8	53,78	81,63	74,67	
		5	8	73,23	93,34	88,31	

		7	8	79,56	96,47	92,24	
		24	8	93,88	99,41	98,03	
3–7	7	1	8,52	28,33	40,83	37,71	> 24
		3	8	60,08	79,61	74,73	
		5	8	77,85	88,54	85,87	
		7	8	86,34	87,98	87,57	
		24	8	92,99	90,8	91,35	
3–8	7	1	7,74	44,94	/	/	5
		3	7,88	80,15	96,11	92,12	
		5	7,78	92,96	99,49	97,85	
		7	7,8	94,42	99,47	98,21	
		24	7,8	95,48	99,55	98,53	
3–9	7	1	7,94	40,06	66,09	59,58	5
		3	7,94	79,93	99,84	94,86	
		5	7,96	89,36	99,07	96,64	
		7	7,96	93,56	100	98,39	
		24	7,96	99,17	100	99,79	
3–10	7	1	8	21,63	42,51	37,29	7
		3	8	49,46	76,09	69,43	
		5	8	64,05	91,86	84,91	
		7	8	83,47	98,26	94,56	
		24	8	100	99,52	99,64	
3–11	7	1	8	1,97	3,41	3,05	96
		3	8	6,37	12,32	10,83	
		5	8	10,15	31,72	26,33	
		7	8	14,6	33,03	28,42	
		24	8	68,64	84,46	80,51	
		96	8	89,26	96,94	95,02	
3–12	7	1	8	27,31	45,46	40,92	7
		3	8	74,84	89,82	86,08	
		5	8	78,30	95,33	91,07	
		7	8	88,53	99,07	96,44	
		24	8	95,87	99,64	98,70	
3–13	7	1	8	21,50	43,63	38,10	7
		3	8	64,20	92,96	85,77	
		5	8	74,30	100,00	93,58	
		7	8	93,68	99,68	98,18	
		24	8	94,99	100,00	98,75	
3–14	7	1	8	17,39	46,79	39,44	24
		3	8	32,97	67,87	59,15	
		5	8	77,46	85,71	83,65	
		7	8	72,00	95,45	89,59	
		24	8	95,83	99,69	98,73	

Los datos demuestran que los conjugados conjugador–anticuerpo actualmente divulgados (por ejemplo, 3–4 a 3–14) experimentan fácilmente hidrólisis de maleimida en condiciones

suaves (por ejemplo, pH 7,0). Los conjugadores actualmente divulgados no solo se conjugan con un anticuerpo en condiciones convencionales (por ejemplo, pH 6,5–7,0), sino que también puede producirse hidrólisis de maleimida en condiciones de conjugación. No es necesario el intercambio de tampón por un tampón básico durante la hidrólisis, lo que puede ayudar a reducir los costos de fabricación del ADC. Agregar un reactivo de extinción puede ser suficiente para detener la reacción de conjugación. Los conjugados actualmente divulgados pueden someterse a intercambio de tampón por tampón de formulación después de completarse la hidrólisis de maleimida mediante el monitoreo a través de LCMS reducida.

Estabilidades de los conjugados conjugador–anticuerpo auto–hidrolizantes

Después de los pasos de conjugación e hidrólisis descritos antes (véase “**Preparación de conjugado anticuerpo DAR8–fármaco/conjugado conjugador–anticuerpo**”), los conjugados conjugador–anticuerpo se incubaron en tampón de formulación (pH 5,5 20 mM tampón de histidina) o tampón de glutatona (GSH) (pH 7,4 u 8,0), y las soluciones se dejaron a 22 o 37 °C durante 1–168 h. El estado de hidrólisis se monitoreó por LCMS reducida. Los resultados se presentan en la Tabla 6, Tabla 7, y Figuras 2A–23B.

Estabilidad con GSH				
C _{ADC} (mM)	GSH (mM)	pH	Tiempo (h)	Temp. (°C)
0,001–0,03	10	7,4/8,0	≥18	22/37

Tabla 6: Estabilidad de conjugador–anticuerpo en tampón a pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH

Conjugado conjugador– anticuerpo Nro.	Tiempo de incubación (h)	pH	Temp, (°C)	MS DAR
3–3	20	7,4	22	8,06
			37	7,98
		8,0	22	8,02
3–4	20	7,4	22	8,00
			37	8,00
		8,0	22	8,00
3–5	21	7,4	22	8,00
			37	8,00
		8,0	22	8,00
3–6	20	7,4	22	8,00
			37	8,00
		8,0	22	8,00
3–7	20	7,4	22	8,00
			37	8,00
		8,0	22	8,00
3–8	20	7,4	22	7,92
			37	7,92
		8,0	22	7,88
3–9	20	7,4	22	8,00
			37	8,00
		8,0	22	8,00
3–10	20	7,4	22	8,00

Conjugado conjugador– anticuerpo Nro.	Tiempo de incubación (h)	pH	Temp, (°C)	MS DAR
			37	8,00
		8,0	22	8,00
3–11	20	7,4	22	8,00
			37	8,00
		8,0	22	8,00
3–12	24	7,4	22	8,00
			37	8,00
		8,0	22	8,00
3–13	24	7,4	22	7,90
			37	7,90
		8,0	22	7,90
3–14	24	7,4	22	7,98
			37	8,00
		8,0	22	8,00

Los resultados demuestran que DAR permaneció a aproximadamente 8,0 para todos los conjugados conjugador–anticuerpo cuando se incubaron en tampón ya sea con o sin GSH durante 18 horas.

Tabla 7: Estabilidad de conjugador–anticuerpo en tampón de formulación (pH 5,5 20 mM tampón de histidina)

Conjugado conjugador– anticuerpo Nro.	Tiempo de incubación (h)	pH	Temp. (°C)	MS DAR–T=0 h	MS DAR– T=168 h	Relación de apertura de anillo de maleimida (%) a T=168 h
3–3	168	5,5	22	7,92	7,92	96,40
3–4	168	5,5	22	8,00	8,00	98,86
3–6	168	5,5	22	8,00	8,00	97,04
3–7	168	5,5	22	8,00	8,00	97,99
3–8	168	5,5	22	7,76	7,80	95,50
3–9	240	5,5	22	8,00	8,00	98,51
3–10	168	5,5	22	8,00	8,00	98,38
3–11	168	5,5	22	8,02	8,00	96,99
3–12	168	5,5	22	8,02	8,02	97,83
3–13	168	5,5	22	7,84	7,88	98,33
3–14	168	5,5	22	8,00	8,00	97,15

Los resultados presentados en la Tabla 7 demuestran que los conjugados conjugador–anticuerpo divulgados mantienen su forma hidrolizada a > 96% después de 168 horas en tampón de formulación ácido.

ADC: Hidrólisis de maleimida después de la conjugación

Después de la hidrólisis de maleimida, los ADC 4–4 y 4–5 (ver Tabla 4) se adhirieron fácilmente a los kits de diálisis Slide–A–Lyzer™ o a las membranas de ultrafiltración Amicon® durante el proceso de intercambio de tampón al tampón de formulación, lo que condujo a bajas tasas de recuperación (< 40%). Sin limitarse a ningún mecanismo o modo

de acción, se sospechó que la hidrólisis de maleimida creó 8 cargas negativas adicionales y pudo haber causado cambios en las propiedades físicas de los ADC, de modo que se volvieron pegajosos en las columnas de purificación y membranas de ultrafiltración Amicon®. Los ADC 4–7–4–16 tuvieron > 80% de recuperación durante la purificación y no se observó comportamiento de adhesión en los kits de diálisis Slide-A-Lyzer™ o en las membranas de ultrafiltración Amicon®.

Los resultados de las evaluaciones de estabilidad de los ADC en solución de GSH o tampón de formulación se presentan en la Tabla 8 y Tabla 9, respectivamente, y en las Figuras 24A–37B.

Tabla 8: Estabilidad de ADC en tampón a pH 7,4 y 8,0 con y sin GSH

ADC	C _{GSH} (mM)	Tiempo (h)	pH	Temp. (°C)	MS DAR
ADC 4–6	10	18	7,4	22	8,06
				37	8,08
			8,0	22	8,06
ADC 4–10	10	18	7,4	22	8,04
				37	8,02
			8,0	22	8,04
ADC 4–11	10	18	7,4	22	8,34
				37	8,48
			8,0	22	8,34
ADC 4–12	10	18	7,4	22	8,18
				37	8,32
			8,0	22	8,20
ADC 4–13	10	72	7,4	22	7,94
				37	7,96
			8,0	22	7,94
ADC 4–14	10	72	7,4	22	8,14
				37	8,16
			8,0	22	8,12
ADC 4–16	10	96	7,4	22	8,14
				37	8,20
			8,0	22	8,14

Los resultados demuestran que no se observaron eventos de desconjugación para los ADC 4–6, 4–10 a 4–14, y 4–16 después de la incubación en soluciones de GSH (pH 7,4 u 8,0 durante 18 horas).

Tabla 9: Estabilidad de ADC en tampón de formulación (20 mM tampón de histidina)

ADC	Tiempo (h)	pH	Temp. (°C)	MS DAR–T=0 h	MS DAR–T=168 h	Relación de apertura de anillo de maleimida (%) a T=168 h
ADC 4–6	93	5,5	22	8,02	8,14	98,88
ADC 4–10	168	5,5	22	8,02	8,08	95,21
ADC 4–11	168	5,5	22	8,12	8,18	99,93
ADC 4–12	168	5,5	22	8,06	8,10	99,81
ADC 4–13	168	5,5	22	8,00	8,02	99,94

ADC 4–14	168	5,5	22	8,06	8,08	99,96
ADC 4–16	168	5,5	22	8,06	8,04	99,92

Los resultados demostraron que no se observaron eventos de desconjugación para los ADC 4–6, 4–10 a 4–14, y 4–16 después del almacenamiento en tampón de formulación durante una semana.

Líneas celulares

NCI–H1650 (ATCC, CRL–5883). NCI–H1650 es una línea celular que exhibe morfología epitelial que fue aislada en 1987 del tejido pulmonar de un hombre fumador de 27 años con carcinoma broncoalveolar en estadio 3, y NCI–H1650 fue adquirido de ATCC. El medio base para NCI–H1650 es Medio RPMI–1640 formulado por la ATCC, ATCC 30–2001. Para preparar el medio de crecimiento completo, se agregó suero fetal bovino hasta una concentración final del 10% (Gibco, 10099–141C) al medio base. La línea celular se cultivó en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C y se analizó periódicamente para detectar la presencia de micoplasma con el kit de detección de micoplasma MycoAlert™ PLUS (Lonza, LT07–710).

Capan–1 (ATCC, HTB–79). Capan–1 es una línea celular con morfología epitelial que fue aislada del páncreas de un hombre blanco de 40 años con adenocarcinoma de páncreas, y Capan–1 fue adquirida de ATCC. El medio base para Capan–1 es Medio de Dulbecco modificado por Iscove, formulado por la ATCC, Nro. de catálogo 30–2005. Para preparar el medio de crecimiento completo, se agregó suero fetal bovino hasta una concentración final del 20% (Gibco, 10099–141C) al medio base. La línea celular se cultivó en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C y se analizó periódicamente para detectar la presencia de micoplasma con el kit de detección de micoplasma MycoAlert™ PLUS (Lonza, LT07–710).

MDA–MB–453 (SIBS). MDA–MB–453 se derivó de un derrame de una paciente de 48 años con carcinoma metastásico de mama, que afectaba los ganglios, el cerebro y ambas cavidades pleural y pericárdica, y MDA–MB–453 se adquirió de SIBS. El medio base para MDA–MB–453 es medio RPMI 1640, HEPES (Gibco, 22400105). Para preparar el medio de crecimiento completo, se agregó suero fetal bovino hasta una concentración final del 10% (Gibco, 10099–141C) al medio base. La línea celular se cultivó en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C y se analizó periódicamente para detectar la presencia de micoplasma con el kit de detección de micoplasma MycoAlert™ PLUS (Lonza, LT07–710).

Tabla 10: Nivel de expresión de B7H3

Línea celular	Nro. molecular (kit QSC)
NCI–H1650	505998
Capan–1	63062
MDA–MB–453	0

Destrucción directa de ADC en líneas celulares de cáncer NCI–H1650, Capan–1, y MDA–MB–453

Se evaluó la destrucción directa de ADC en las líneas cancerosas NCI–1650, Capan–1 y MDA–MB–453. Se sembraron células (NCI–1650 o MDA–MB–453 (2E3/pocillo) o Capan–1 (4E3/pocillo)) en placas 3D de 96 pocillos (Corning: 4520), 80 µl/pocillo, y se incubaron a 37 °C, 5% CO₂, hasta el día siguiente. Se agregó medio de crecimiento nuevo que contenía

concentraciones variables de ADC, 40 µl/pocillo, y se incubó a 37 °C, 5% CO₂, durante 6 días. La viabilidad celular se detectó mediante reactivo 3D (Promega, G9683), 100 µl/pocillo. Las placas 3D se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos para estabilizar la señal luminiscente. Las placas se analizaron con un lector de microplacas.

Los datos se resumen en las Tablas 11–12 y las Figuras 38–43.

Tabla 11: Potencia de destrucción directa de ADC en líneas celulares de alta y baja expresión de B7H3

ADC	NCI–H1650 (alta), 3D		Capan–1 (baja), 3D	
	Emáx (%)	EC50 (nM)	Emáx (%)	EC50 (nM)
ADC4–B	75,3	3,9	84,9	0,5
ADC4–8	79,5	2,9	66,6	1,0
ADC4–9	81,4	2,8	78,8	0,8
ADC4–10	80,0	1,7	68,4	0,6

Tabla 12: Potencia de destrucción directa de ADC en líneas celulares de alta y baja expresión de B7H3

ADC	NCI–H1650 (alta), 3D		Capan–1 (baja), 3D	
	Emáx (%)	EC50 (nM)	Emáx (%)	EC50 (nM)
ADC4–B	66,5	4,5	74,3	1,1
ADC4–11	85,6	2,1	62,4	1,0
ADC4–12	83,2	2,3	61,9	0,7
ADC4–13	79,3	1,6	58,5	0,5
ADC4–14	81,6	1,3	61,3	0,4
ADC4–16	76,4	1,5	62,2	0,6

Estudio de eficacia de ADC *in vivo*

Se implantaron por vía subcutánea ratones hembra BALB/c desnudos con 3 x 10⁶ células H1650 por 200 µl de PBS/matrigel en el flanco derecho. Después de la inoculación, los volúmenes de los tumores se determinaron dos veces por semana en dos dimensiones usando un calibrador y se expresaron en mm³ usando la fórmula $V = 0,5 (a \times b^2)$, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 200 mm³ de tamaño, los ratones fueron asignados aleatoriamente en 6 grupos con 8 animales en cada grupo, y fueron tratados por vía intravenosa con vehículo, ADC4–B, ADC4–10, ADC4–12, ADC4–14, o ADC4–16 a 1 o 3 mg/kg QW*2. La regresión parcial (PR) se definió como un volumen tumoral menor al 50% del volumen tumoral inicial en el primer día de la dosificación en tres mediciones consecutivas y la regresión completa (CR) se definió como un volumen tumoral menor a 14 mm³ en tres mediciones consecutivas. Los datos se presentan como volumen tumoral medio ± error estándar de la media (SEM). La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ growth inhibition} = 100 \times \left(1 - \frac{((treated\ t) - (treated\ t_0))}{((placebo\ t) - (placebo\ t_0))} \right)$$

treated t = volumen tumoral tratado en el tiempo t

treated t₀ = volumen tumoral tratado en el tiempo 0

placebo t = volumen tumoral con placebo en el tiempo *t*

placebo t₀ = volumen tumoral con placebo en el tiempo 0

Los resultados se presentan en las Figuras 44 y 45. Los ADC evaluados con conjugadores de apertura de anillo (RO) (es decir, ADC4–10, ADC 4–12, ADC 4–14, y ADC 4–16) exhibieron potentes actividades antitumorales en un modelo de cáncer de pulmón humano, y las actividades son superiores a un ADC conjugador no RO (es decir, ACD4–B) (Figura 44). Los ADC conjugadores RO exhibieron actividad antitumoral de manera dependiente de la dosis (Figura 45).

Estabilidad de ADC en plasma

Incubación de ADC con plasma: Los ADC se diluyeron en plasma de ratón o humano para proporcionar una solución final de 100 µg/ml de ADC en plasma. Las muestras se incubaron a 37 °C. Se tomaron alícuotas (100 µL) en cinco puntos temporales (0, 4, 24, 72, o 168 h). Las muestras se congelaron a – 80 °C hasta el análisis.

Las concentraciones plasmáticas de carga útil se realizaron en las siguientes condiciones de almacenamiento:

Instrumento: LC–MS/MS (Triple Quad 6500 plus)

Monitor: MRM

Columna: Advanced Materials Technology, HALO AQ–C18 2,7µm 90Å, 50*2,1 mm

Temperatura de columna: 40 °C

Fase móvil A: H₂O–0,1% FA

Fase móvil B: ACN–0,1% FA

Programa de gradiente para análogos de DXd y Topo1i: 2% B–2% B (0 min–0,2 min), 2% B–98% B (0,2 min–1,2 min), 98% B–98% B (1,2 min–2,0 min), 98% B–2% B (2,0 min–2,01 min), 2% B–2% B (2,01 min–4,0 min)

Cantidad de muestra inyectada: 10 µL (análogos de DXd o Topo1i)

Los resultados se presentan en las Figuras 46 y 47. Los ADC con un conjugador RO hidrolizado con maleimida mostraron una baja velocidad de liberación de carga útil en plasma de ratón (Figura 46) y en plasma humano (Figura 47).

Estudio de PK en ratones

Después de una dosis de ADC administrada por vía intravenosa a ratones portadores de tumor H1650 o ratones no portadores de tumor, se recogieron muestras de sangre 0,0833, 2, 24, 72, 120, y 168 h después, seguido de centrifugación (4 °C, 3000 ×g, 7 min) para separar el plasma. Las concentraciones de ADC se midieron mediante métodos de unión de ligandos de Meso Scale Discovery (MSD) desarrollados internamente. Brevemente, se utilizó una proteína de fusión del dominio extracelular B7H3 marcada con His como reactivo de captura, y se utilizó Ab anticarga útil marcado con biotina como reactivo de detección para los ADC. La concentración plasmática de la carga útil se midió utilizando el mismo método descrito anteriormente.

Los resultados se presentan en la Figura 48. Los ADC con un conjugador de RO hidrolizado con maleimida mostraron una buena PK de ADC y una baja exposición a la carga útil en un modelo de eficacia H1650.

Aunque la divulgación anterior se ha presentado con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, es evidente para los expertos en la técnica que se practicarán ciertos cambios y modificaciones menores. Por lo tanto, la descripción y

los ejemplos no deben entenderse como limitativos.

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

Las divulgaciones de todas las publicaciones que no son patentes, patentes, solicitudes de patente y solicitudes de patente publicadas a las que se hace referencia en el presente documento se incorporan aquí por referencia en su totalidad.