

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 983 950**

(51) Int. Cl.:

**A61K 47/54** (2007.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2019 PCT/US2019/029393**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2019 WO19210200**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2019 E 19794009 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 3784269**

(54) Título: **Ligandos dirigidos a integrinas y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

**27.04.2018 US 201862663763 P  
09.01.2019 US 201962790372 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**28.10.2024**

(73) Titular/es:

**ARROWHEAD PHARMACEUTICALS, INC.  
(100.0%)  
177 E. Colorado Boulevard, Suite 700  
Pasadena, CA 91105, US**

(72) Inventor/es:

**LI, ZHEN;  
CARLSON, JEFFREY;  
NICHOLAS, ANTHONY;  
LI, XIAOKAI;  
SHU, DONGXU y  
FOWLER-WATTERS, MATTHEW**

(74) Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 983 950 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

5

**DESCRIPCIÓN**

Ligandos dirigidos a integrinas y usos de los mismos

10 **Campo de la invención**

En la presente memoria se describen compuestos que tienen afinidad por las integrinas, métodos de síntesis de dichos compuestos y el uso de dichos compuestos como ligandos para administrar moléculas de carga *in vivo*.

15 **Antecedentes**

Las integrinas son glicoproteínas transmembrana que median las interacciones célula-célula y célula-matriz. Las integrinas alfa-v beta-3 ( $\alpha v\beta 3$ ) y alfa-v beta-5 ( $\alpha v\beta 5$ ) son miembros de la superfamilia de moléculas de adhesión de las integrinas y son conocidas por ser receptoras de la proteína vitronectina de la matriz extracelular (MEC). (Horton, MA, 29(5) Int. J. Biochem. Cell Biol. 721-725 (1997)). Se cree que la expresión alterada de determinadas integrinas, incluidas la integrina  $\alpha v\beta 3$  y la integrina  $\alpha v\beta 5$ , contribuye al avance, la invasividad y las metástasis de los tumores.

De hecho, se ha descrito la sobreexpresión de integrinas, incluidas las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha v\beta 5$ , en muchas células tumorales. (Desgrosellier, JS et al., Nat Rev Cancer, 10(1):9-22 (2010)). Se ha considerado el uso de antagonistas de la  $\alpha v\beta 3$  (y, en menor medida, de la  $\alpha v\beta 5$ ) en una variedad de enfermedades asociadas con la alteración de la función de las integrinas. Por ejemplo, se ha intentado desarrollar inhibidores de la  $\alpha v\beta 3$  como posibles tratamientos contra el cáncer, ya que se ha demostrado que la inhibición del receptor de la  $\alpha v\beta 3$  inhibe la angiogénesis, impidiendo así la formación de nuevos vasos sanguíneos que se cree son necesarios para el crecimiento de los tumores. (Véase, por ejemplo, Brooks et al., 79 Cell 1157-1164 (1994); Mas-Moruno et al., Anticancer Agents Med Chem, 10(10):753-768).

30 Sin embargo, un ejemplo destacado de un inhibidor de la  $\alpha v\beta 3$ , el antagonista cilengitida, demostró ser ineficaz en los ensayos clínicos destinados a limitar la angiogénesis y la progresión de tumores en pacientes con glioblastoma. (Véase, por ejemplo, Ley et al., Integrin-based Therapeutics: Biological Basis, Clinical Use and New Drugs, 15(3) Nat. Rev. Drug Discov. 173-183 (2016)).

35 En general, el suministro de moléculas de carga *in vivo*, incluidos compuestos farmacéuticos terapéuticamente eficaces o ingredientes farmacéuticos activos, a las células y/o tejidos deseados, sigue siendo un desafío general en el desarrollo de productos farmacéuticos terapéuticamente viables. Sigue existiendo la necesidad de compuestos dirigidos a diana estables y eficaces que tengan afinidad y/o puedan unirse selectivamente a células y tejidos específicos, que puedan utilizarse o emplearse como ligandos para facilitar el suministro de moléculas de carga terapéutica a esas células o tejidos específicos. Además, existe una necesidad específica de compuestos que sean capaces de dirigirse selectivamente a la integrina alfa-v beta-3 y que sean adecuados para conjugarse con moléculas de carga y administrar las moléculas de carga a células que expresan dichas integrinas, tales como células tumorales, *in vivo*. Para los oligonucleótidos y los productos terapéuticos basados en oligonucleótidos en particular (por ejemplo, un compuesto basado en oligonucleótidos tal como un oligonucleótido antisentido o un agente de ARNI), sigue existiendo la necesidad de ligandos que puedan dirigirse a la integrina alfa-v beta-3 y/o a la integrina alfa-v beta-5 y facilitar el suministro de estos compuestos basados en oligonucleótidos a las células que expresan dichas integrinas.

40 El documento WO 2016/172710 describe métodos y kits para pronosticar, tratar y gestionar el tratamiento del cáncer en un sujeto. Los métodos implican seleccionar un sujeto que tiene cáncer y obtener, del sujeto seleccionado, una muestra que contiene exosomas o una muestra que contiene la molécula S100. Los exosomas o la muestra que contiene la molécula S100, respectivamente, se ponen en contacto luego con uno o más reactivos adecuados para detectar niveles más altos o más bajos o la presencia o ausencia de una o más integrinas en dichos exosomas o niveles más altos o más bajos o la presencia o ausencia de una o más moléculas S100 en la muestra que contiene la molécula S100. A continuación se pronostica el cáncer, se administra el tratamiento o se controla el tratamiento.

45 En el documento WO 2016/134223 se describen compuestos fluorados y métodos para sintetizar estos compuestos. También se describen composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos fluorados y métodos para tratar la fibrosis, la degeneración macular, la retinopatía diabética (DR), el edema macular, el edema macular diabético (DME) y el edema macular posterior a la oclusión de la vena retiniana (RVO), mediante la administración de estos compuestos y composiciones farmacéuticas a sujetos que los necesitan.

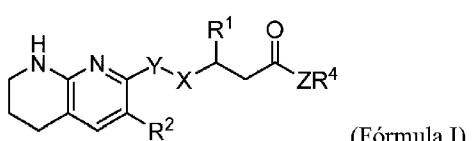
50 En el documento WO 2016/176532 se describen derivados del ácido tetrahidronaftiridinilpropiónico y su uso para tratar o prevenir una fibrosis.

55 Hutchinson et al. JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 46, n°. 22, 2003, páginas 4790-4798 describen un antagonista de  $\alpha v\beta 3$  neopeptídico.

60 En el documento US2004/224986 A1 se describen compuestos dirigidos a piperidinilo que se unen selectivamente a integrinas.

5    **Resumen**

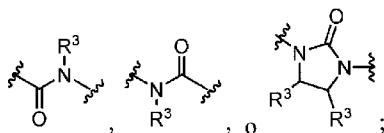
- En la presente memoria se describen compuestos que tienen afinidad por determinadas integrinas, incluidas la  $\alpha v\beta 3$  y la  $\alpha v\beta 5$ , que pueden emplearse como ligandos (denominados en la presente memoria «ligandos dirigidos a integrinas», «ligandos dirigidos a integrina  $\alpha v\beta 3$ », «ligandos de integrina  $\alpha v\beta 3$ », o simplemente «ligandos de integrina») para dirigir selectivamente los compuestos u otras moléculas a las que están unidos a las células o tejidos que expresan integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o  $\alpha v\beta 5$ . Los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria son estables en el suero y tienen afinidad por, y pueden unirse con especificidad a, estas integrinas. Los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria se pueden conjugar con moléculas de carga para facilitar el suministro de las moléculas de carga a las células o tejidos que expresan la integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o  $\alpha v\beta 5$ .
- 15    En la presente memoria se describen métodos para administrar una molécula de carga a un tejido y/o célula que expresa la integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o la integrina  $\alpha v\beta 5$  *in vivo*, en donde los métodos incluyen administrar a un sujeto uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria que se han conjugado con una o más moléculas de carga. En la presente memoria se describen además métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad, síntoma o trastorno para el que la administración de una molécula de carga terapéutica (por ejemplo, un ingrediente farmacéutico activo) a una célula que expresa la integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o la integrina  $\alpha v\beta 5$  es capaz de tratar al sujeto, en donde los métodos incluyen administrar a un sujeto uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria que se han conjugado con una o más moléculas de carga terapéuticas.
- 20    En la presente memoria se describen además métodos para inhibir la expresión de un gen diana en una célula *in vitro* o *in vivo*, en donde los métodos incluyen administrar a la célula una cantidad eficaz de un conjugado que incluye uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria que se han conjugado con uno o más productos terapéuticos basados en oligonucleótidos, tales como un agente de ARNi, que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana en una célula. En algunas realizaciones en la presente memoria se describen métodos para inhibir la expresión de un gen diana en una célula de un sujeto, en donde al sujeto se le administra una cantidad eficaz de uno o más productos terapéuticos basados en oligonucleótidos (tales como un agente de ARNi) que se han conjugado con uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria.
- 25    En otro aspecto más, se describen en la presente memoria composiciones que incluyen los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser composiciones farmacéuticas o medicamentos que incluyen uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria conjugados con una o más moléculas de carga terapéuticas, tales como un agente de ARNi u otra molécula de carga o sustancia terapéutica.
- 30    En la presente memoria se describen métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno mediado, al menos en parte, por la expresión de un gen diana en una célula que expresa la integrina  $\alpha v\beta 3$ , en donde los métodos incluyen administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica incluye uno o más productos terapéuticos basados en oligonucleótidos capaces de inhibir la expresión de un gen diana, tal como un agente de ARNi, que está conjugado con uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno mediado, al menos en parte, por la expresión de un gen diana en una célula tumoral, en donde los métodos incluyen administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica incluye uno o más productos terapéuticos basados en oligonucleótidos capaces de inhibir la expresión de un gen diana, tal como un agente de ARNi, conjugados con uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria. En la presente memoria se describen métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno mediado, al menos en parte, por la expresión de un gen diana en una célula tumoral de riñón, tal como una célula tumoral de carcinoma renal de células claras, en donde los métodos incluyen administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica incluye uno o más productos terapéuticos basados en oligonucleótidos capaces de inhibir la expresión de un gen diana, tal como un agente de ARNi, conjugados con uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria.
- 35    En un primer aspecto, esta descripción proporciona ligandos sintéticos dirigidos a integrinas.
- 40    Un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria incluye la estructura de la siguiente Fórmula:



65    o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde,

X es  $-\text{C}(\text{R}^3)_2-$ ,  $-\text{NR}^3-$ ,

5



Y es alqueno Ci-Cs opcionalmente sustituido;

10 Z es O, NR<sup>3</sup> o S;

n es un número entero de 1 a 8;

15 R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;

R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;

20 cada caso de R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga;

R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y

en donde al menos uno de Y, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, cada caso de R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> comprende una molécula de carga.

25 Cualquiera de los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria puede unirse a una molécula de carga, un grupo reactivo y/o un grupo reactivo protegido. La unión a un grupo reactivo, por ejemplo, puede usarse para facilitar la conjugación del ligando dirigido a integrina con una molécula de carga. Los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria pueden aumentar la capacidad de una molécula de carga de ir dirigida a una célula que expresa una integrina, incluida la integrina αvβ3 y/o la integrina αvβ5. Una molécula de carga puede ser, pero no se limita a, un ingrediente o compuesto farmacéuticamente activo, un profármaco u otra sustancia con un beneficio terapéutico conocido. En algunas realizaciones, una molécula de carga puede ser, pero no se limita a, una molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, una etiqueta o marcador, un lípido, un oligonucleótido natural o modificado, un compuesto basado en oligonucleótidos modificada (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido o un agente de ARNi), un ácido nucleico natural o modificado, un péptido, un aptámero, un polímero, poliamina, una proteína, una toxina, una vitamina, un polietilenglicol, un hapteno, una digoxigenina, una biotina, un átomo o molécula radiactiva o un fluoróforo. En algunas realizaciones, una molécula de carga incluye un ingrediente farmacéuticamente activo o un profármaco. En algunas realizaciones, una molécula de carga es o incluye un producto terapéutico basado en oligonucleótidos, tal como un compuesto antisentido o un agente de ARNi. En algunas realizaciones, una molécula de carga es o incluye un compuesto a base de oligonucleótidos que es un ingrediente farmacéuticamente activo. En algunas realizaciones, una molécula de carga es o incluye un agente de ARNi que es un ingrediente farmacéuticamente activo.

45 En la presente memoria se describe el uso de los ligandos dirigidos a integrinas αvβ3/5 descritos para atacar y administrar una molécula de carga a una célula que expresa integrinas. La molécula de carga se puede administrar a una célula *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* o *in vivo*.

50 En otro aspecto, esta descripción proporciona composiciones que incluyen uno o más de los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones que comprenden uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria incluyen uno o más compuestos basados en oligonucleótidos, tales como uno o más agentes de ARNi, que se administran a una célula *in vivo*. En algunas realizaciones, en la presente memoria se describen composiciones para administrar un agente de ARNi a una célula *in vivo*, en donde el agente de ARNi está unido a uno o más ligandos dirigidos a integrinas.

55 Se describen composiciones que incluyen uno o más ligandos dirigidos a integrinas. En algunas realizaciones, una composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una composición que incluye uno o más ligandos dirigidos a integrinas comprende una o más sustancias farmacéuticas o ingredientes o compuestos farmacéuticamente activos. En algunas realizaciones, en la presente memoria se describen medicamentos que incluyen uno o más ligandos dirigidos a integrinas.

60 Las composiciones que incluyen uno o más ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria pueden administrarse *in vivo* o *in vitro* a diversas células cancerosas, incluidas, p. ej., células tumorales de carcinoma renal de células claras (p. ej., A498), otras células de cáncer de riñón (p. ej., ACHN, CAK-I-2, 769-P, 786-O), células de melanoma (p. ej., A375), células de glioblastoma (por ejemplo, U87MG), células de cáncer de páncreas (p. ej., PANC-1), células de cáncer de pulmón (p. ej., H460, H661, H1573, H2126), células de cáncer de colon (p. ej., HT29, HCT116), células de cáncer de hígado (p. ej., Hep2G, Hep3B), células de cáncer de mama (p. ej., MCF7, SK-BR3), células de

- 5      cáncer de próstata (p. ej., DU145, PC3, LNCaP, MDA-PCa-2b)), células de cáncer oral (por ejemplo, KB), células de cáncer de lengua (p. ej., CAL27, SCC9), células de cáncer de faringe (p. ej., Detroit562) y/o células de cáncer de ovario (p. ej., OVCAR3, SKOV3, A2780) y/u otros xenoinjertos derivados de pacientes.
- 10     En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos que incluyen el uso de uno o más ligandos y/o composiciones dirigidos a integrinas tal como se describe en la presente memoria y, si se desea, llevar los ligandos y/o composiciones dirigidos a integrinas descritos a una forma adecuada para la administración como un producto farmacéutico. En otras realizaciones, la descripción proporciona métodos para la fabricación de los ligandos y composiciones, por ejemplo, medicamentos, descritos en la presente memoria.
- 15     Las composiciones que incluyen uno o más ligandos dirigidos a integrinas pueden administrarse a sujetos *in vivo* usando vías de administración conocidas en la técnica por ser adecuadas para dicha administración en vista de la molécula de carga que se busca administrar, incluida, por ejemplo, la administración subcutánea, intravenosa, intratumoral, inhalada (formulaciones en aerosol o polvo seco), intranasal, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, oral, sublingual o tópica. En algunas realizaciones, las composiciones que incluyen uno o más ligandos dirigidos a integrinas se pueden administrar para la administración sistémica, por ejemplo, mediante administración intravenosa o subcutánea.
- 20     En la presente memoria se describen métodos para administrar una o más moléculas de carga deseadas a una célula tumoral de carcinoma renal de células claras *in vivo*, en donde los métodos incluyen administrar al sujeto uno o más ligandos dirigidos a integrinas conjugados con una o más moléculas de carga.
- 25     En la presente memoria se describen métodos para administrar un compuesto basado en oligonucleótidos a una célula tumoral *in vivo*, en donde los métodos incluyen administrar al sujeto uno o más ligandos dirigidos a integrinas conjugados con el uno o más compuestos basados en oligonucleótidos. En algunas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos para administrar un agente de ARNi a una célula tumoral *in vivo*, en donde los métodos incluyen administrar al sujeto uno o más ligandos dirigidos a integrinas conjugados con el uno o más agentes de ARNi. En algunas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos para inhibir la expresión de un gen diana en una célula tumoral de carcinoma renal de células claras *in vivo*, en donde los métodos incluyen administrar al sujeto un agente de ARNi conjugado con uno o más ligandos que tienen afinidad por la integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o la integrina  $\alpha v\beta 5$ .
- 30     Otros objetos, características, aspectos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.
- 35     **Descripción detallada**

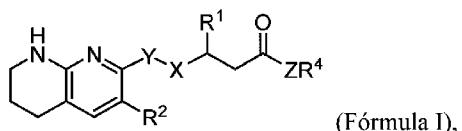
40     **Ligandos dirigidos a integrinas**

En la presente memoria se describen compuestos que tienen afinidad por las integrinas, muestran estabilidad sérica *in vivo* y pueden usarse como ligandos para facilitar el suministro de moléculas de carga a células y/o tejidos que expresan integrinas, tales como la integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o la integrina  $\alpha v\beta 5$ . Los ligandos dirigidos a integrinas se pueden usar para atacar células que expresan integrinas *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* y/o *in vivo*.

45     En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria pueden conjugarse con una o más moléculas de carga para dirigir preferentemente y atacar las moléculas de carga a células o tejidos que expresan integrinas, incluidas la integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o la integrina  $\alpha v\beta 5$ . En algunas realizaciones, las moléculas de carga incluyen o consisten en compuestos farmacéuticamente activos. En algunas realizaciones, las moléculas de carga incluyen o consisten en compuestos basados en oligonucleótidos, tales como agentes de ARNi. En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria se conjugan con moléculas de carga para dirigir las moléculas de carga a células tumorales *in vivo*. En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria se conjugan con moléculas de carga para dirigir las moléculas de carga a células tumorales de carcinoma renal de células claras *in vivo*.

50     **Fórmula I**

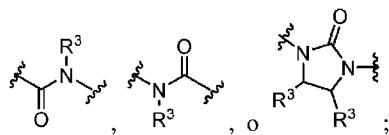
55     Se describen ligandos de integrina de la estructura:



60     en donde,

65     X es  $-C(R^3)_2-$ ,  $-NR^3-$ ,

5



Y es alquíleno opcionalmente sustituido;

10 Z es O, NR<sup>3</sup> o S;

n es un número entero de 1 a 8;

15 R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;

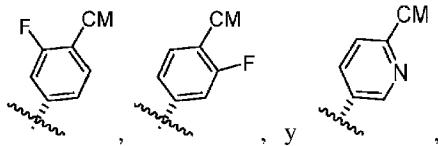
R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;

20 cada caso de R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga;

R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y

en donde al menos uno de Y, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, cada caso de R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> comprende una molécula de carga.

25 En algunas realizaciones de la Fórmula I, R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en:

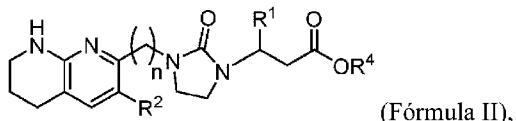


30 en donde indica el punto de unión y CM comprende una molécula de carga.

En algunas realizaciones de la Fórmula I, Y es alquíleno C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

Fórmula II

35 Se describen ligandos dirigidos a integrinas que incluyen la estructura de la siguiente fórmula:



40 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde,

n es un número entero de 1 a 8;

45 R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;

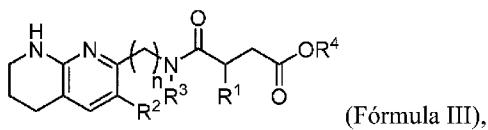
R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;

50 R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y

en donde al menos uno de R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga.

Fórmula III

55 En la presente memoria se describe un ligando dirigido a integrina que incluye la estructura de la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde,

10 n es un número entero de 1 a 8;

15 R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;

20 R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;

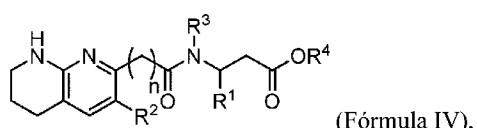
25 R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga;

30 R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y

35 en donde al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga.

#### Fórmula IV

40 En la presente memoria se describe un ligando dirigido a integrina que incluye la estructura de la siguiente fórmula:



45 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde

50 n es un número entero de 1 a 8;

55 R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;

R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;

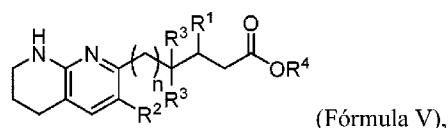
R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga;

40 R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y

45 en donde al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga.

#### 45 Fórmula V

En la presente memoria se describe un ligando dirigido a integrina que incluye la estructura de la siguiente fórmula:



50 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde

55 n es un número entero de 1 a 8;

R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;

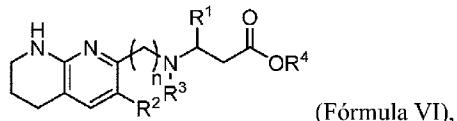
R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;

- 5 cada caso de R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga;
- R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y
- 10 en donde al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga.

## Fórmula VI

En la presente memoria se describe un ligando dirigido a integrina que incluye la estructura de la siguiente fórmula:

15

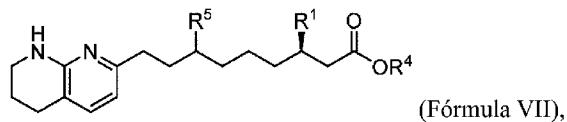


o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde

- 20 n es un número entero de 1 a 8;
- R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;
- 25 R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;
- cada caso de R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga;
- 30 R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y
- en donde al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga.

## Fórmula VII

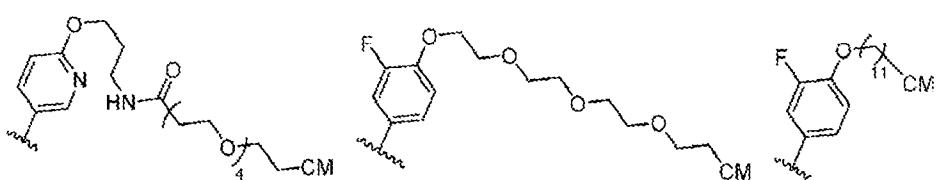
- 35 En la presente memoria se describe un ligando dirigido a integrina que incluye la estructura de la siguiente fórmula:



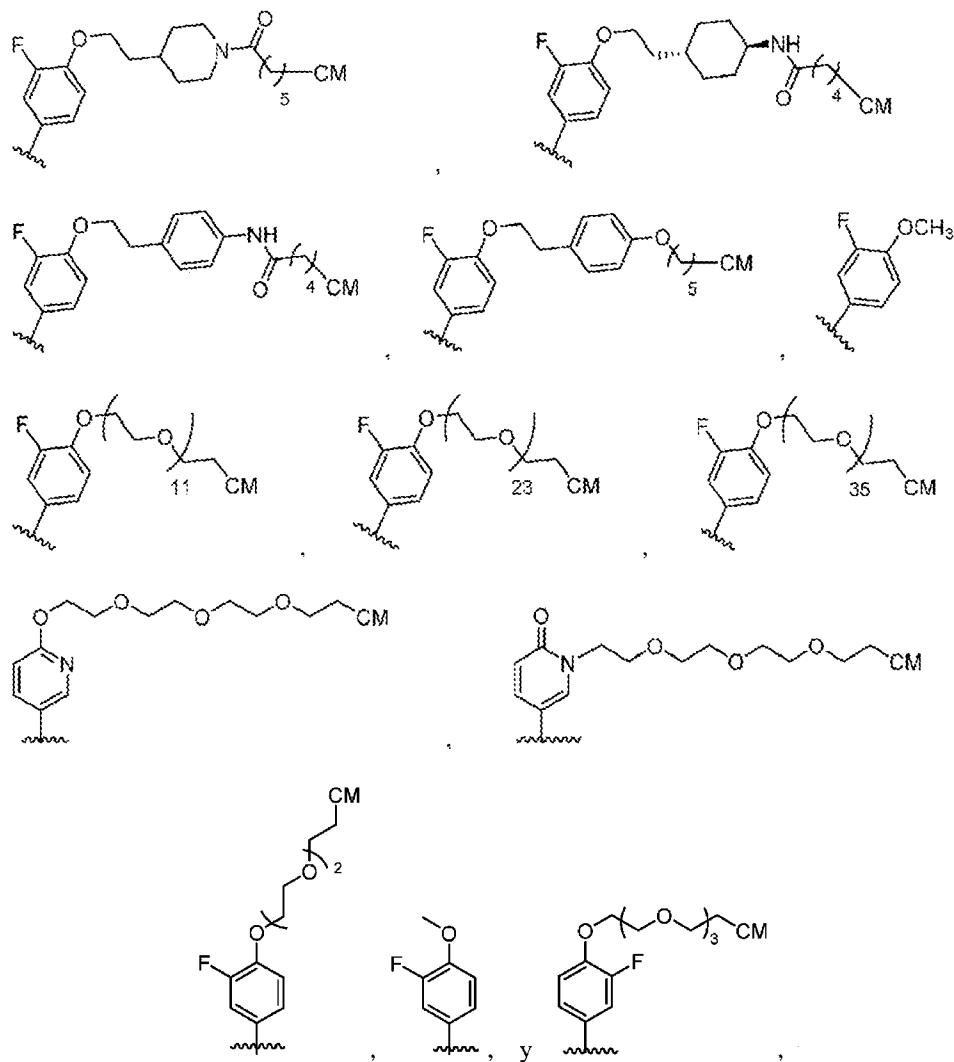
- 40 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde
- R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;
- 45 R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;
- R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y
- en donde al menos uno de R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> comprende una molécula de carga.

50 R<sup>1</sup>

- En realizaciones de la Fórmula I, R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga.
- 55 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en:



5

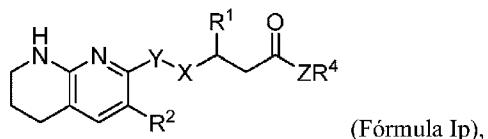


10

en donde indica el punto de unión y CM comprende una molécula de carga.

#### Precursos de ligandos dirigidos a integrinas

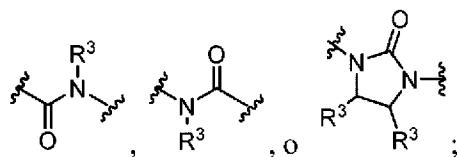
- 20 En algunas realizaciones, los precursores de ligandos dirigidos a integrinas que se pueden usar para unir un ligando dirigido a integrina a un resto comprenden una molécula de carga. En la presente memoria se proporcionan precursores de ligandos dirigidos a integrinas de la fórmula:



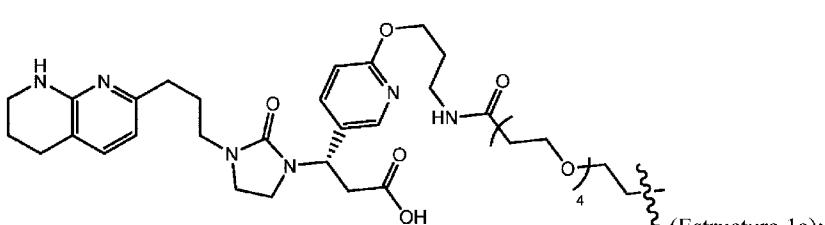
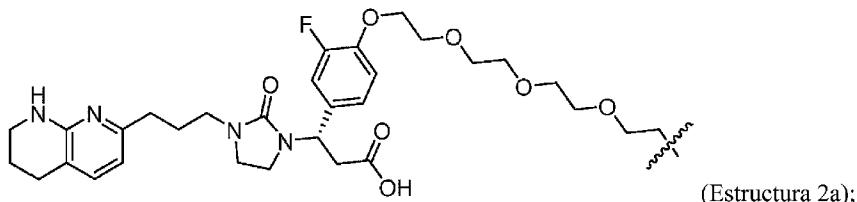
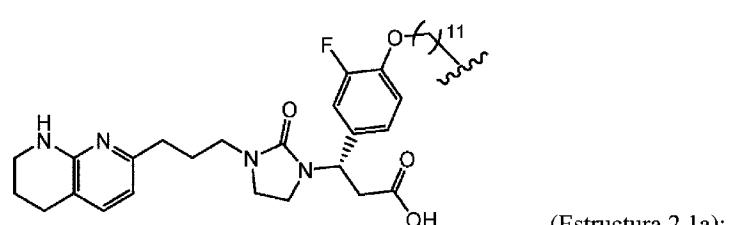
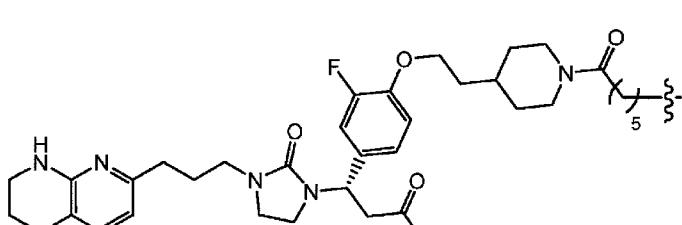
25

en donde,

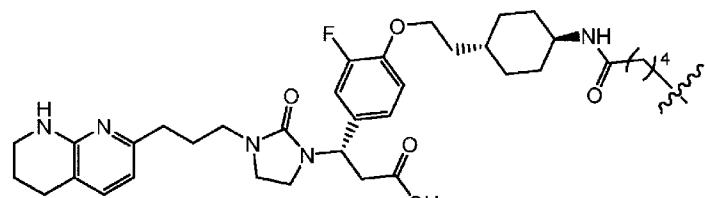
X es  $-\text{C}(\text{R}^3)_2-$ ,  $-\text{NR}^3-$ ,



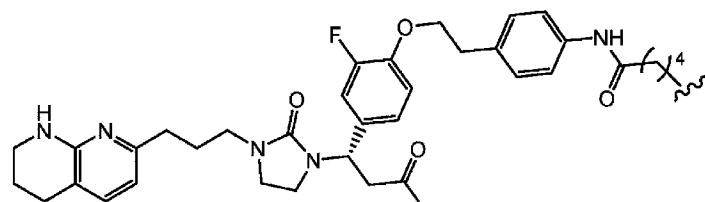
30

- 5 Y es alquieno opcionalmente sustituido;
- Z es O, NR<sup>3</sup> o S;
- 10 n es un número entero de 1 a 8;
- R<sup>1</sup> es arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido o R<sup>1</sup> comprende una molécula de carga;
- 15 R<sup>2</sup> es H, alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>2</sup> comprende una molécula de carga;
- cada caso de R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> comprende una molécula de carga;
- 20 R<sup>4</sup> es H o alquilo opcionalmente sustituido; y  
en donde al menos uno de Y, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, cada caso de R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> comprende un grupo reactivo.
- En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula I<sub>p</sub>, el grupo reactivo comprende una azida.
- 25 Compuestos de Fórmula I
- Los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria tienen estructuras que incluyen, consisten en o  
30 consisten esencialmente en cualquiera de las estructuras representadas por lo siguiente:
-   
(Estructura 1a);
-   
(Estructura 2a);
-   
(Estructura 2.1a);
-   
(Estructura 2.2a);

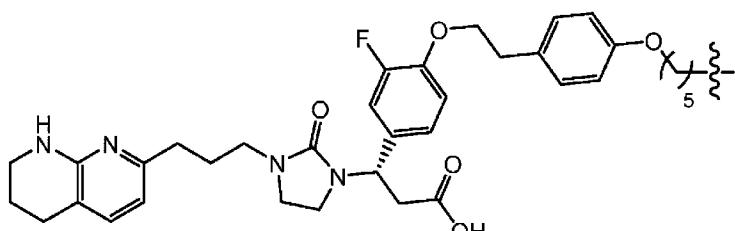
5



(Estructura 2.3a);

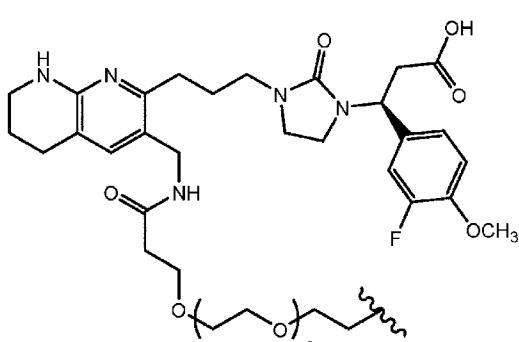


(Estructura 2.4a);

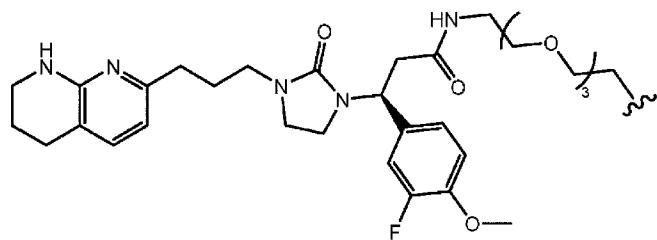


(Estructura 2.5a);

10

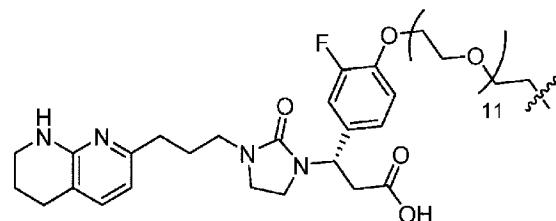


(Estructura 2.6a);



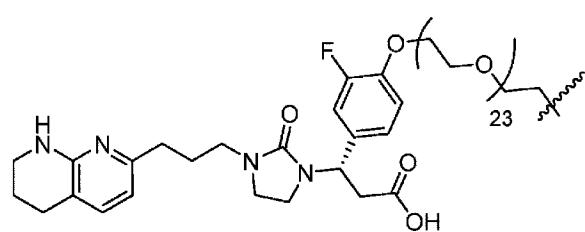
(Estructura 2.7a);

15

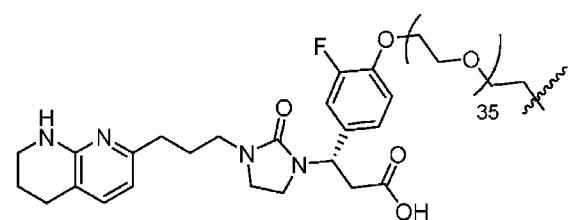


(Estructura 2.8a);

5

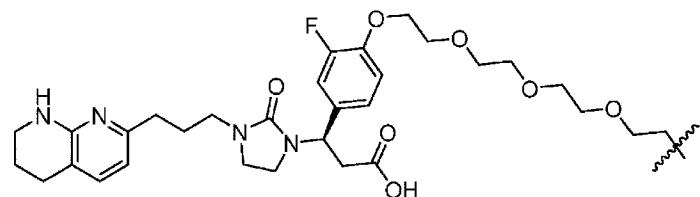


(Estructura 2.9a);

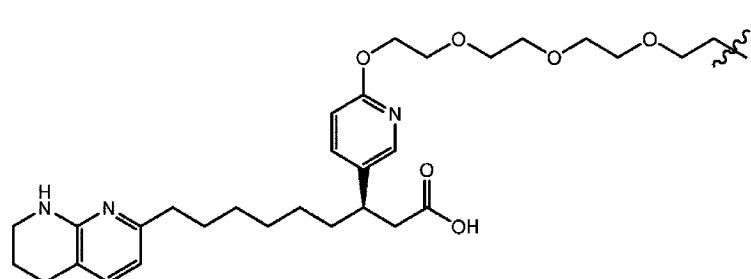


(Estructura 2.10a);

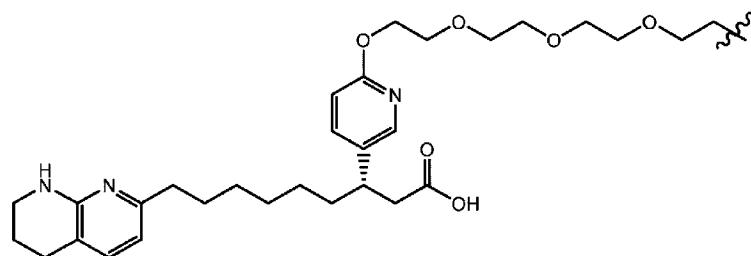
10



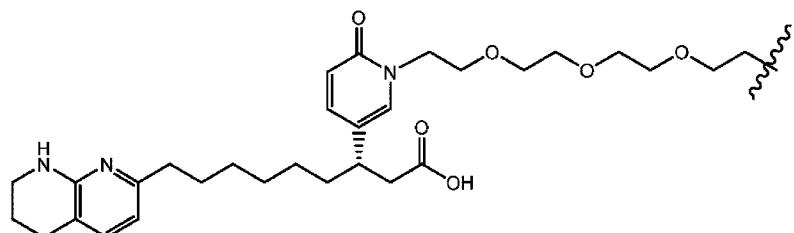
(Estructura 2.11a);



(Estructura 28a);

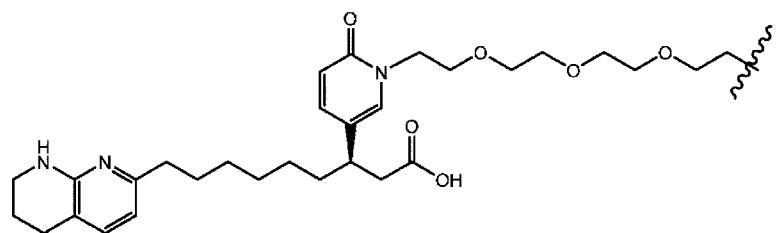


(Estructura 29a);



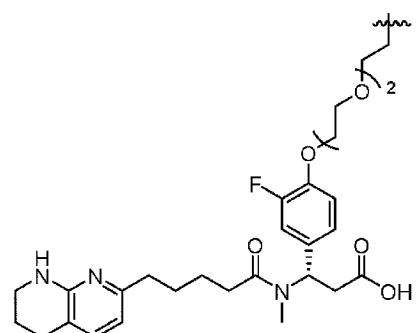
(Estructura 30a);

15

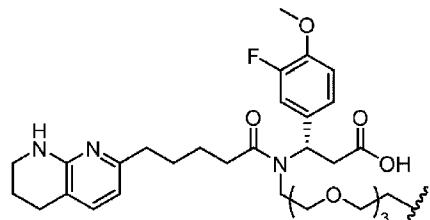


5

(Estructura 31a);

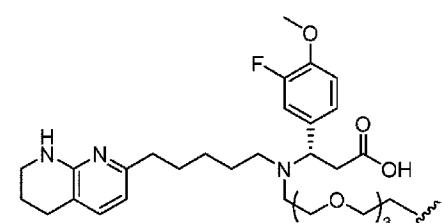


(Estructura 32a);

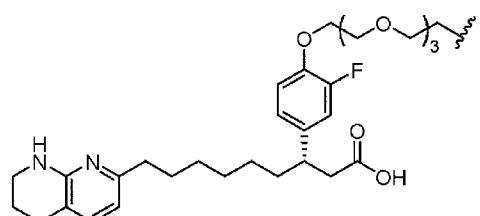


(Estructura 33a);

10

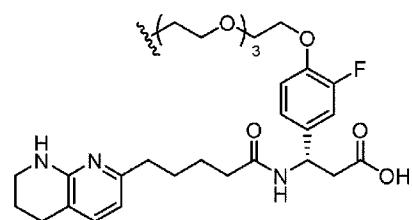


(Estructura 34a);

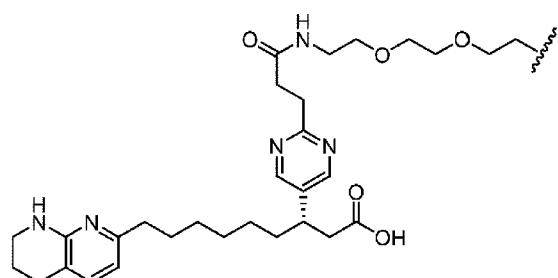


(Estructura 36a);

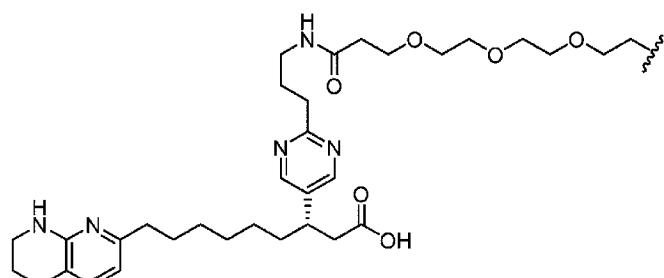
5



(Estructura 37a);

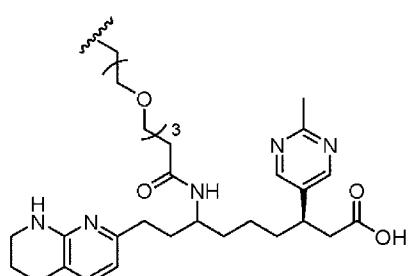


(Estructura 38a);

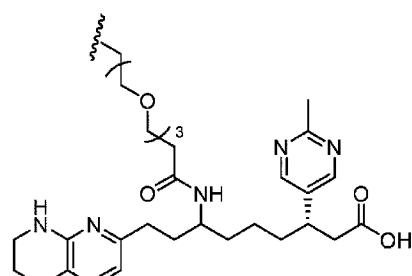


(Estructura 39a);

10



(Estructura 40a); y



(Estructura 41a).

- 15 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria puede conjugarse con una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; o de 1 a 10, 2 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, 2 a

5 10, 3 a 10, 4 a 10, 5 a 10, 2 a 5, 2 a 4 o 3 a 5) moléculas de carga (por ejemplo, cualquiera de las moléculas de carga descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica).

10 En algunas realizaciones, más de un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30; o de 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 5 a 30, 5 a 25, 5 a 20, 5 a 15, 5 a 10, 10 a 30, 10 a 25, 10 a 20, 10 a 15, 15 a 30, 15 a 25, 15 a 20, 20 a 30, 20 a 25 o 25 a 30 ligandos dirigidos a integrinas) se pueden conjugar con una molécula de carga (por ejemplo, cualquiera de las moléculas de carga descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica).

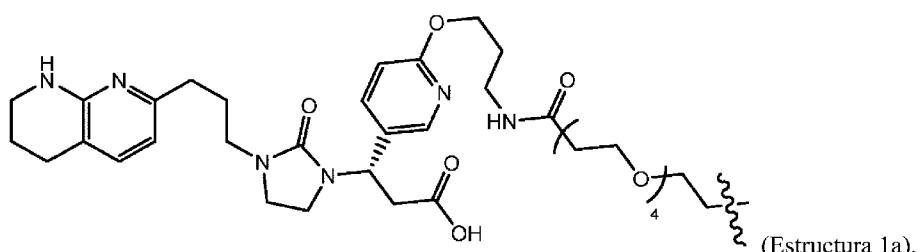
15 En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria se conjugan opcionalmente con una o más moléculas de carga a través de un grupo de unión, tal como, por ejemplo, un grupo polietilenglicol (PEG).

20 En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria se conjugan opcionalmente con una o más moléculas de carga a través de una estructura base o esqueleto que incluye al menos un punto de unión para cada ligando y al menos un punto de unión para cada molécula de carga. En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en, un ligando dirigido a integrina conjugado con una molécula de carga. En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en, un ligando dirigido a integrina conjugado con más de una molécula de carga.

25 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, cualquiera de la estructura 1a, estructura 2a, estructura 2.1a, estructura 2.2a, estructura 2.3a, estructura 2.4a, estructura 2.5a, estructura 2.6a, estructura 2.8a, estructura 2.9a, estructura 2.10a, estructura 2.11a, estructura 28a, estructura 29a, estructura 30a, estructura 31a, estructura 32a, estructura 33a, estructura 34a, estructura 36a, estructura 37a, estructura 38a, estructura 39a, estructura 40a y estructura 41a, cada una como se describe en la presente memoria.

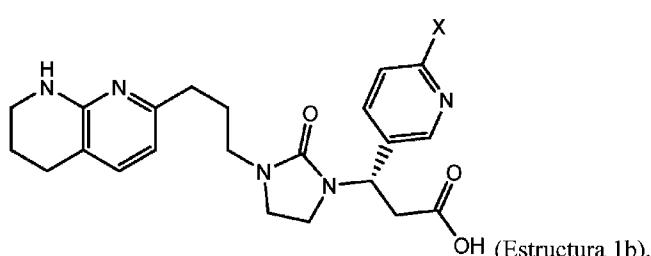
30 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

35



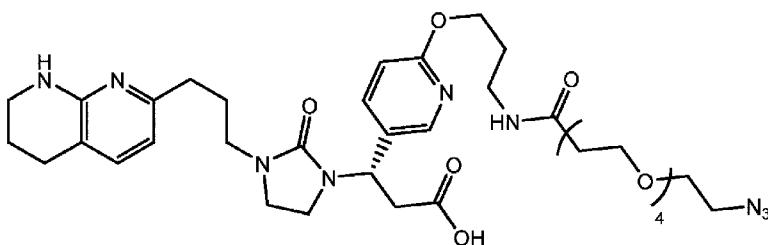
40 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 1a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agentes de ARNi).

45 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:



45 donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

50 En algunas realizaciones, un precursor de ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

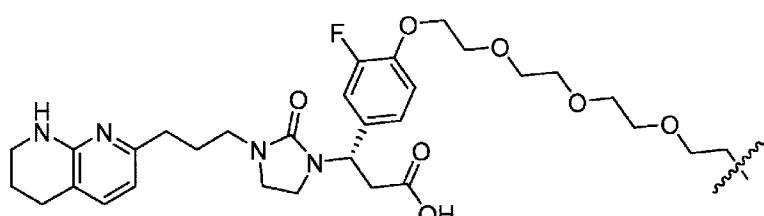


5

Se puede utilizar un grupo reactivo (o grupo reactivo protegido) para facilitar la conjugación del ligando dirigido a integrina a una molécula de interés, por ejemplo, a una molécula de carga (ya sea directamente o a través de uno o más esqueletos y/o enlazadores).

10

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

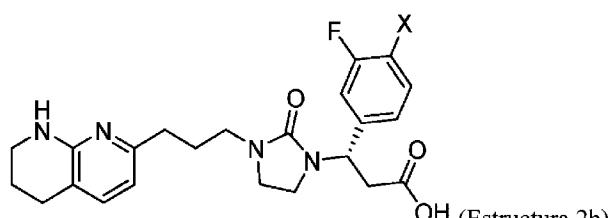


15

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agentes de ARNi).

20

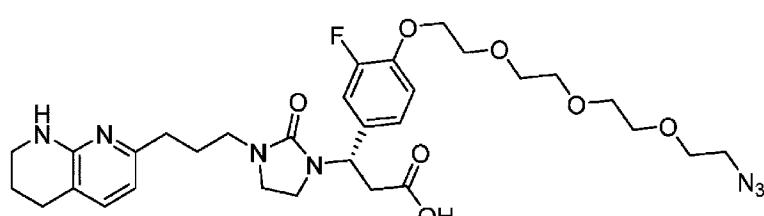
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:



25

en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

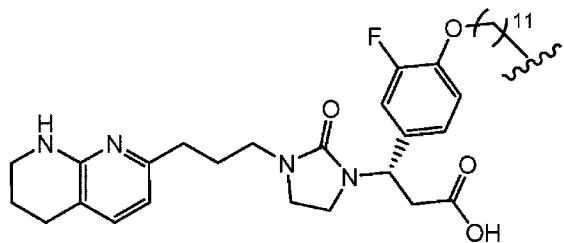
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



30

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

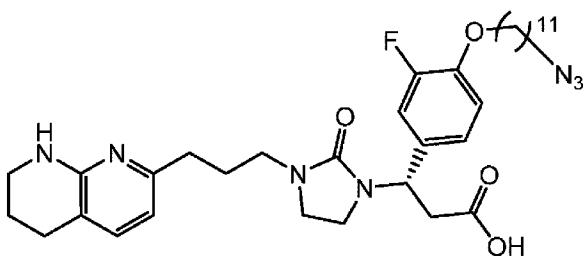
5



(Estructura 2.1a).

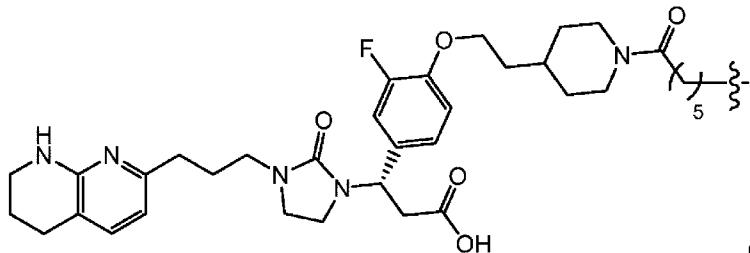
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.1a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

- 10 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



(Estructura 2.1c).

- 15 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

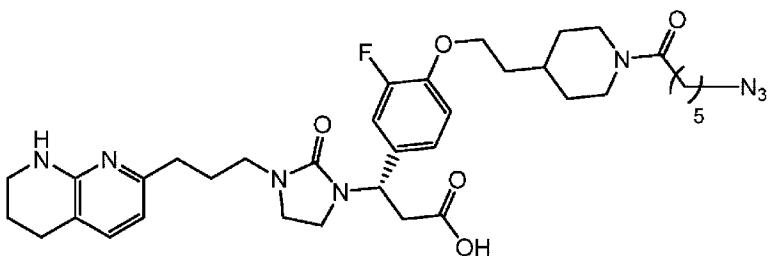


(Estructura 2.2a).

- 20 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.2a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

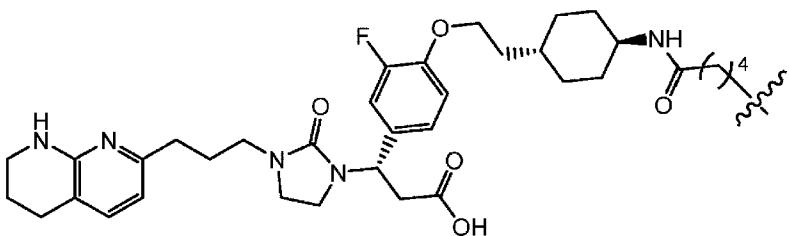
25



(Estructura 2.2c).

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

30

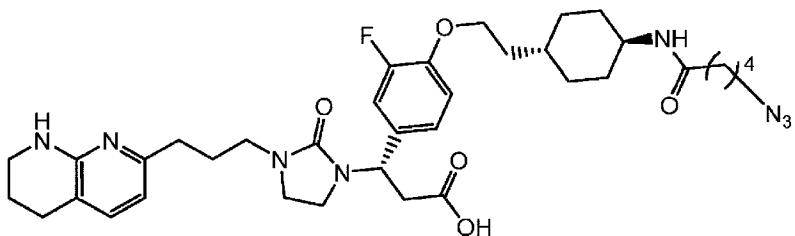


5

(Estructura 2.3a).

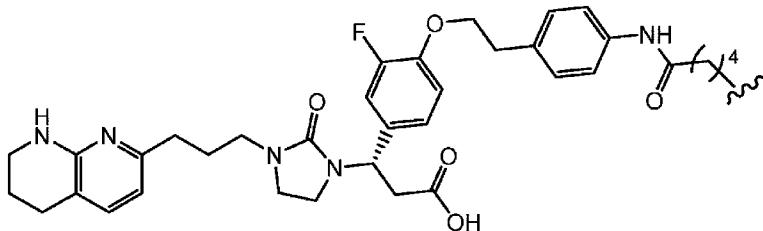
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.3a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

- 10 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



(Estructura 2.3c).

- 15 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

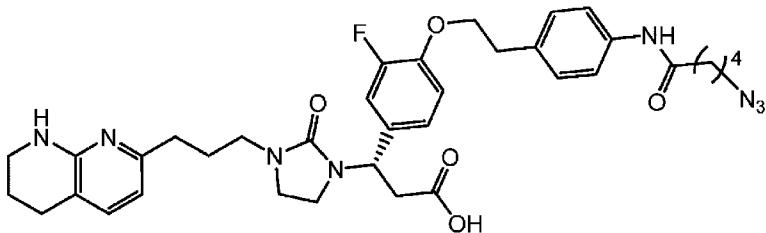


(Estructura 2.4a).

- 20 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.4a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

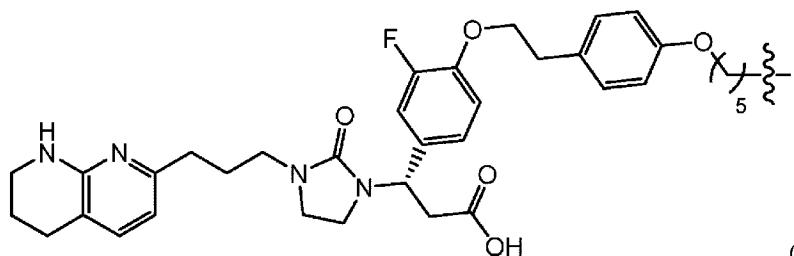
25



(Estructura 2.4c).

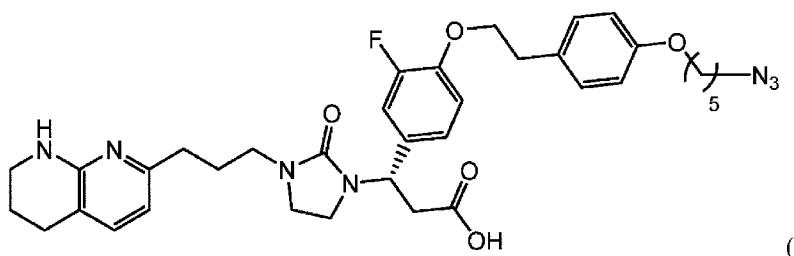
En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

30

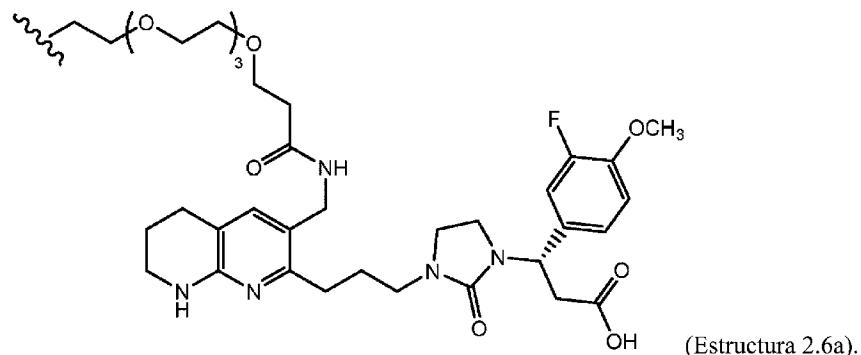


En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.5a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

- 10 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



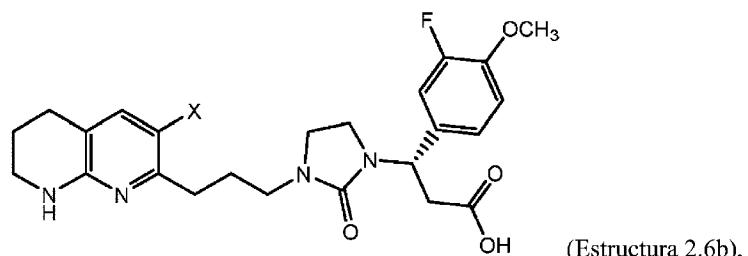
- 15 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:



- 20 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.6a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

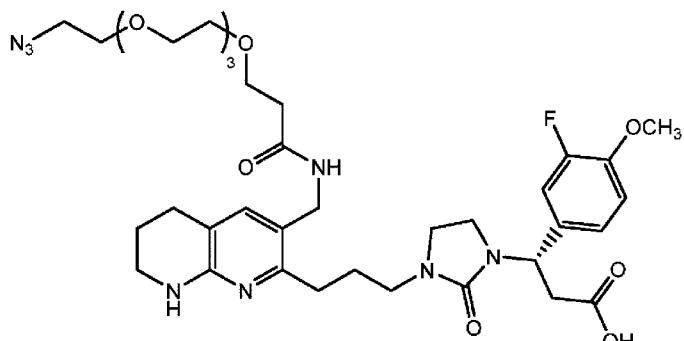
25



en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

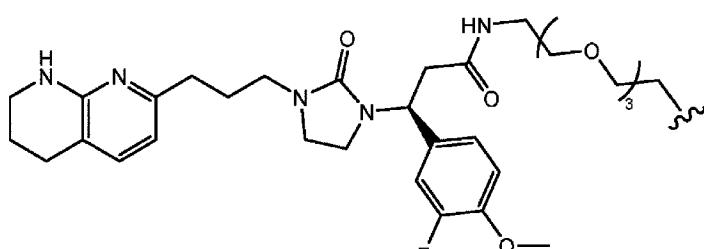
- 30 En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas se pueden sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprenden la siguiente estructura:

5



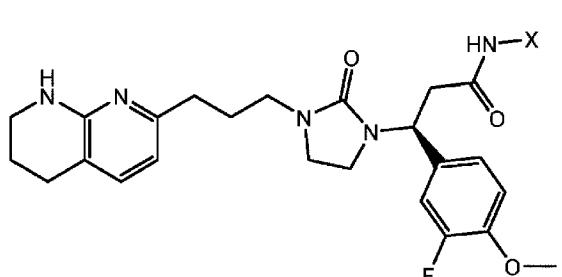
- Se puede utilizar un grupo reactivo (o grupo reactivo protegido) para facilitar la conjugación del ligando dirigido a integrina a una molécula de interés, por ejemplo, a una molécula de carga (ya sea directamente o a través de uno o más esqueletos y/o enlazadores).

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:



- En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.7a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

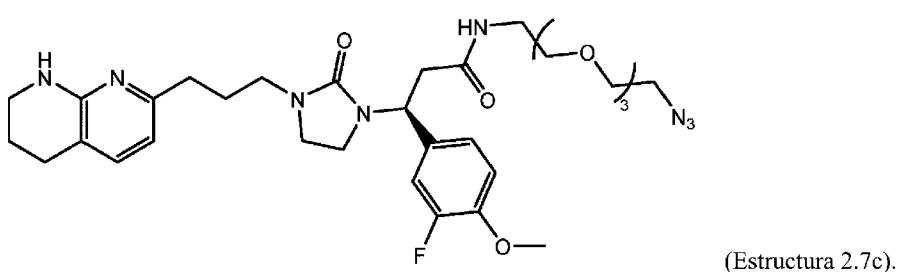
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:



- en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

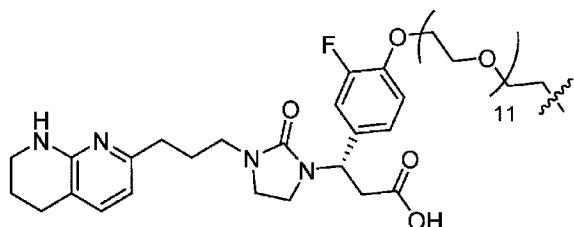
En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas se pueden sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprenden la siguiente estructura:

30



5 Se puede utilizar un grupo reactivo (o grupo reactivo protegido) para facilitar la conjugación del ligando dirigido a integrina a una molécula de interés, por ejemplo, a una molécula de carga (ya sea directamente o a través de uno o más esqueletos y/o enlazadores).

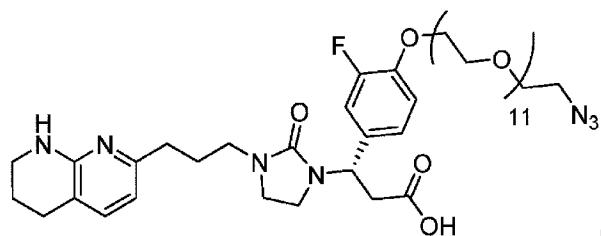
10 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:



(Estructura 2.8a).

15 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.8a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

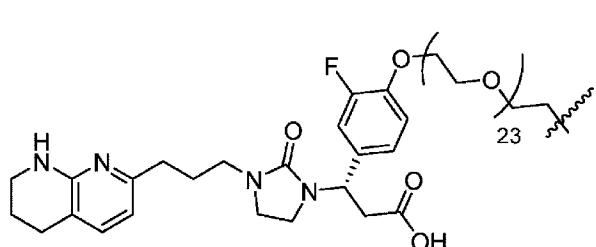
En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrina se pueden sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprenden la siguiente estructura:



(Estructura 2.8c).

20 Se puede utilizar un grupo reactivo (o grupo reactivo protegido) para facilitar la conjugación del ligando dirigido a integrina a una molécula de interés, por ejemplo, a una molécula de carga (ya sea directamente o a través de uno o más esqueletos y/o enlazadores).

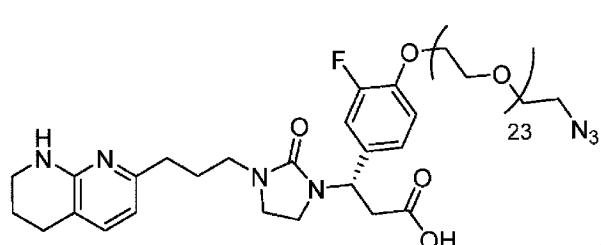
25 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:



(Estructura 2.9a).

30 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.9a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

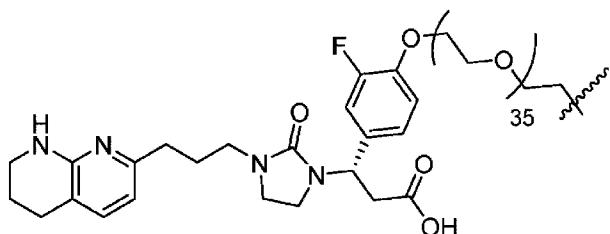
35 En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas se pueden sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprenden la siguiente estructura:



(Estructura 2.9c).

5 Se puede utilizar un grupo reactivo (o grupo reactivo protegido) para facilitar la conjugación del ligando dirigido a integrina a una molécula de interés, por ejemplo, a una molécula de carga (ya sea directamente o a través de uno o más esqueletos y/o enlazadores).

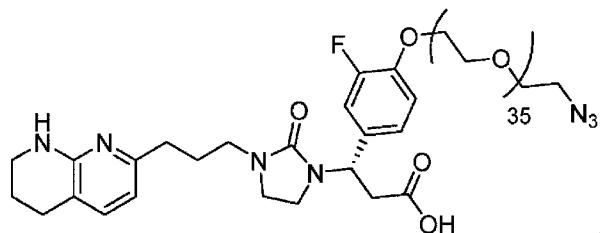
10 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:



(Estructura 2.10a).

15 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.10a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas se pueden sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprenden la siguiente estructura:

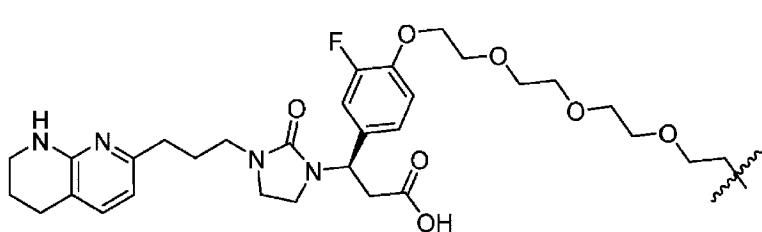


(Estructura 2.10c).

20

Se puede utilizar un grupo reactivo (o grupo reactivo protegido) para facilitar la conjugación del ligando dirigido a integrina a una molécula de interés, por ejemplo, a una molécula de carga (ya sea directamente o a través de uno o más esqueletos y/o enlazadores).

25 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

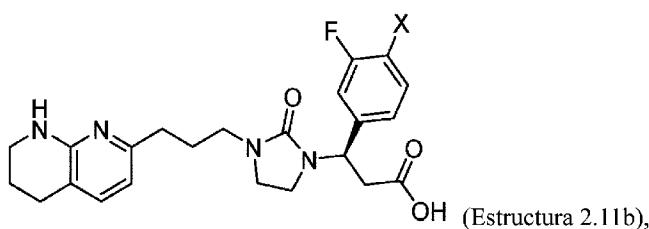


(Estructura 2.11a).

30

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 2.11a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

35 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

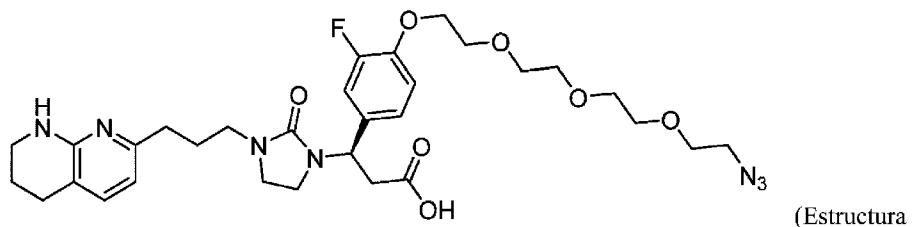


(Estructura 2.11b),

en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (p. ej., un agente de ARNi).

5

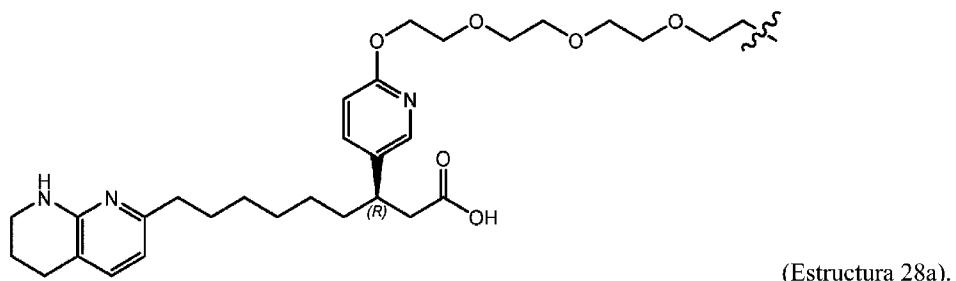
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



10

Se puede utilizar un grupo reactivo (o grupo reactivo protegido) para facilitar la conjugación del ligando dirigido a integrina a una molécula de interés, por ejemplo, a una molécula de carga (ya sea directamente o a través de uno o más esqueletos y/o enlazadores).

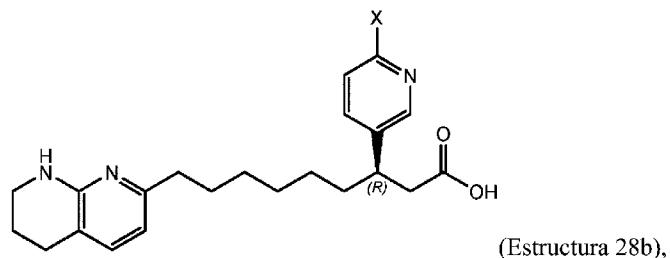
15 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:



20 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 28a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

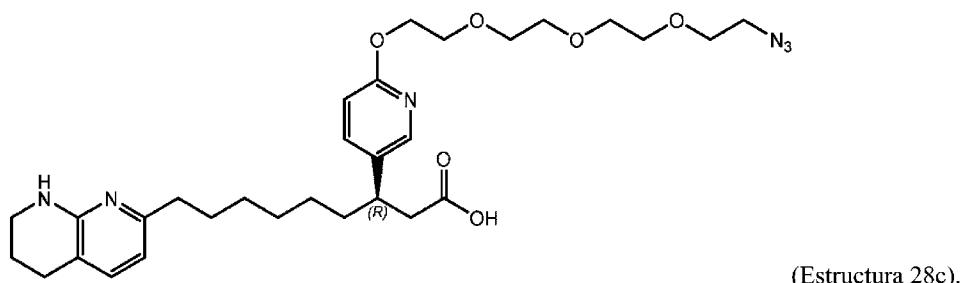
25



en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

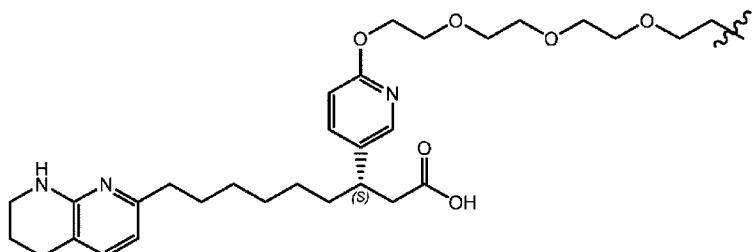
30

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



5

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

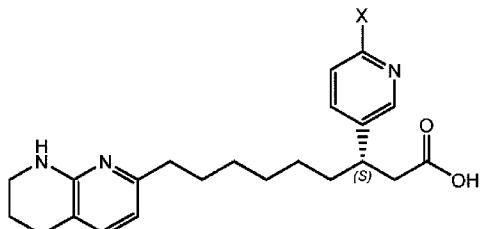


(Estructura 29a).

10

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 29a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

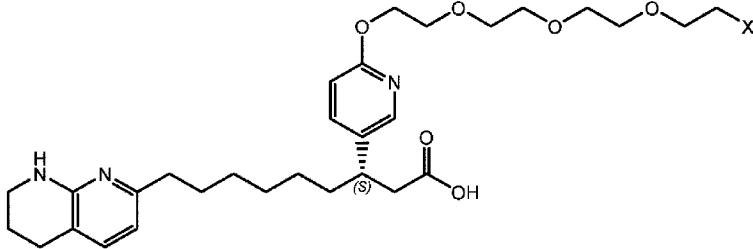
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:



(Estructura 29b),

en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

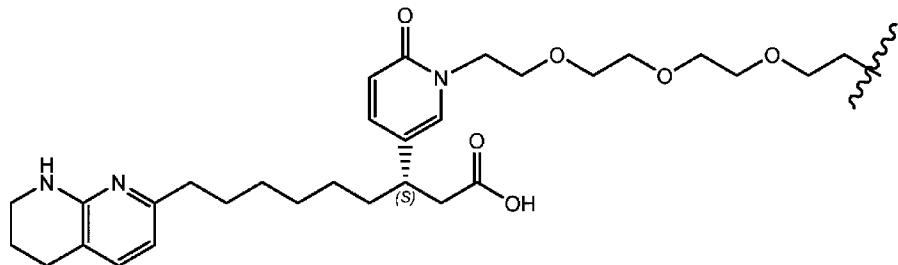
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



(Estructura 29c).

25

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

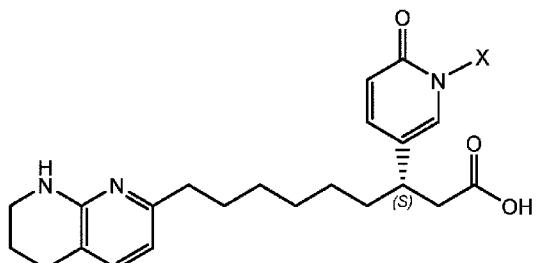


(Estructura 30a).

30

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 30a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

- 5 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

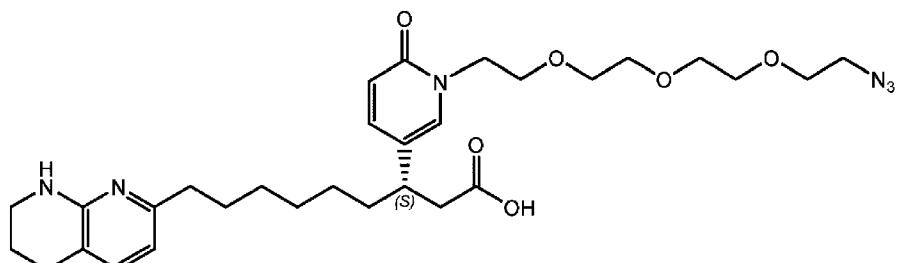


(Estructura 30b),

- 10 en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

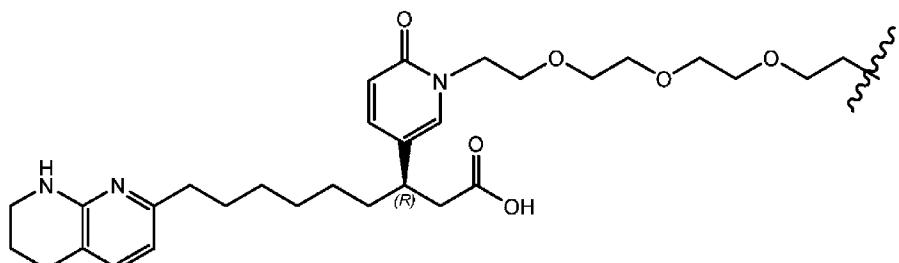
15



(Estructura 30c).

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

20

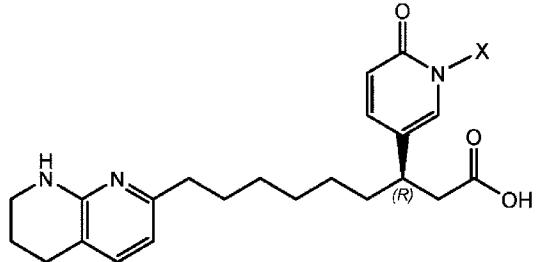


(Estructura 31a).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 31a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

25

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:



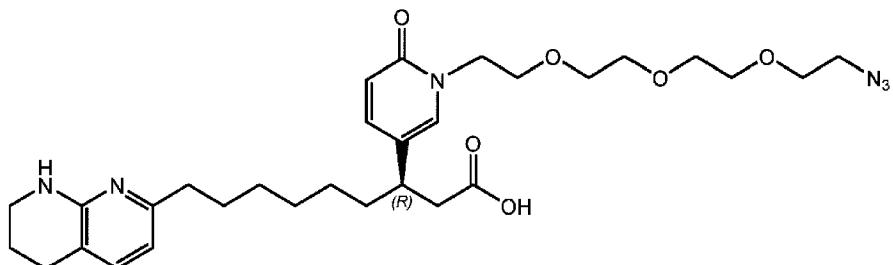
(Estructura 31b),

30

- 5 en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

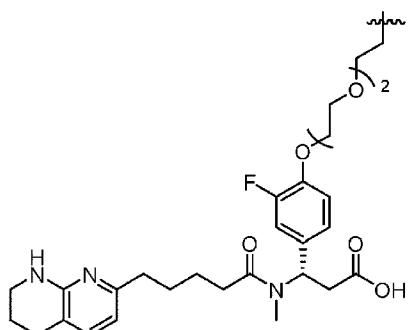
10



(Estructura 31c).

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

15

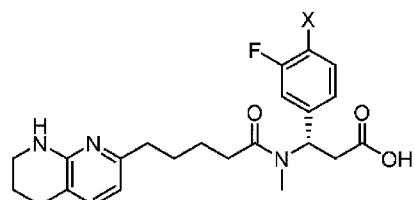


(Estructura 32a).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 32a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

20

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

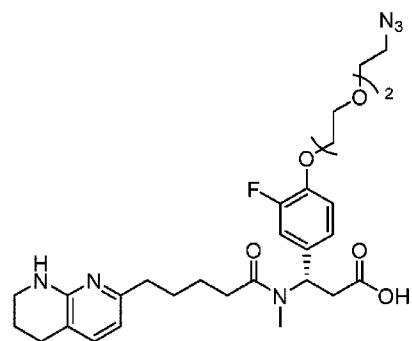


(Estructura 32b),

25

en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

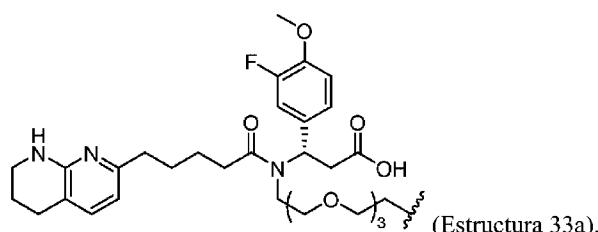
30 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



5

(Estructura 32c).

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

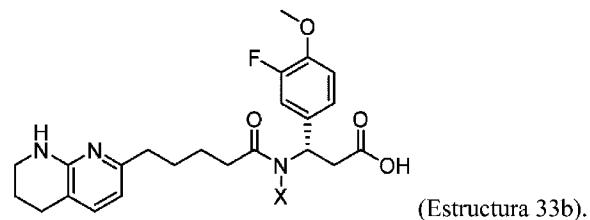


10

(Estructura 33a).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 33a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

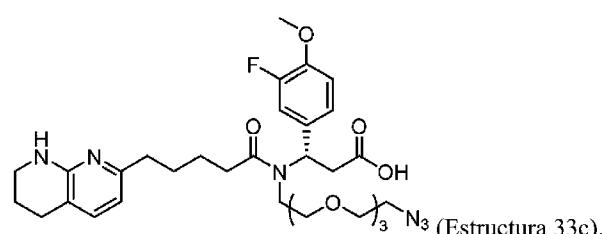
- 15 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:



- 20 donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

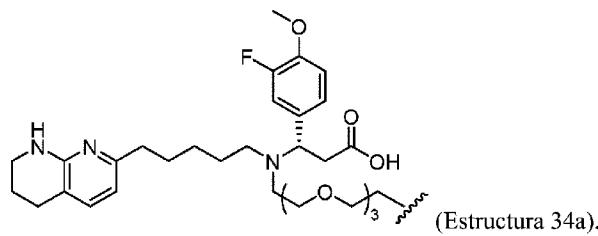
25



En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

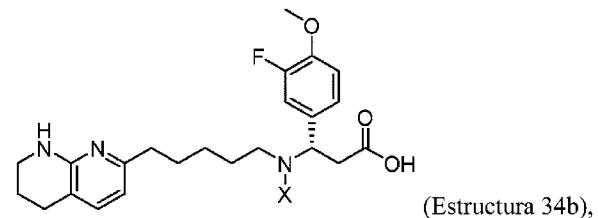
30

5



En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 34a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

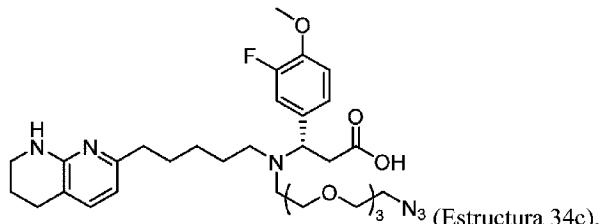
- 10 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:



- 15 en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

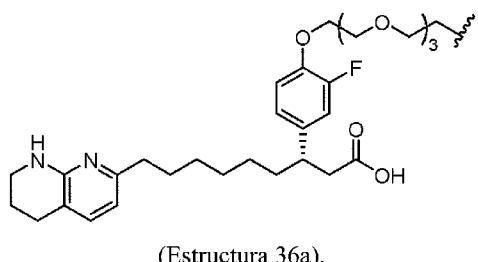
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

20



En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

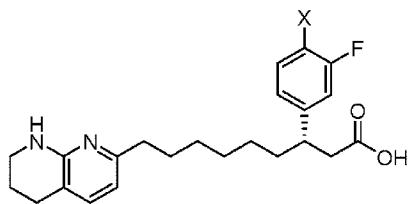
25



En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 36a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

- 30 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

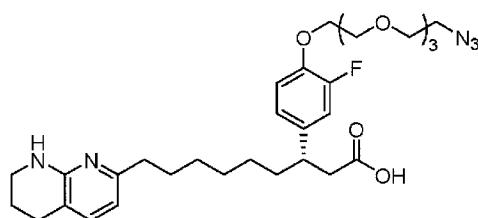
5



(Estructura 31b),

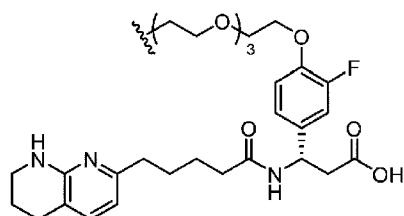
en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

- 10 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



(Estructura 31c).

- 15 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

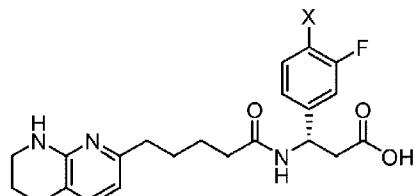


(Estructura 37a).

- 20 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 37a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

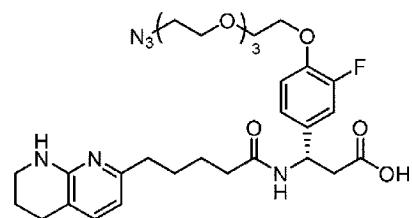
25



(Estructura 37b),

en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

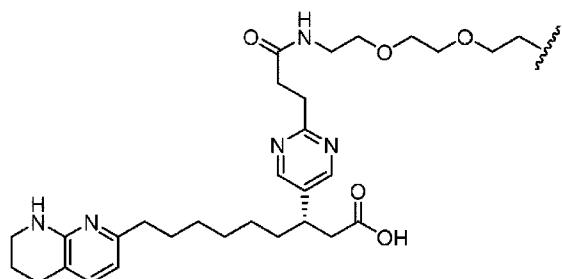
- 30 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



5

(Estructura 37c).

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

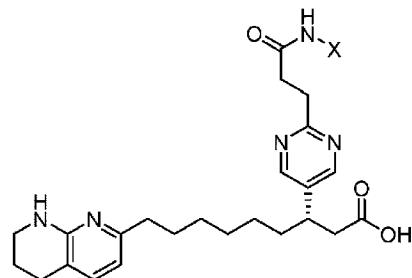


10

(Estructura 38a).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 38a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

15 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

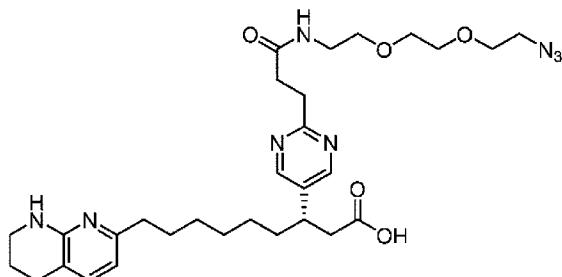


(Estructura 38b),

20 en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

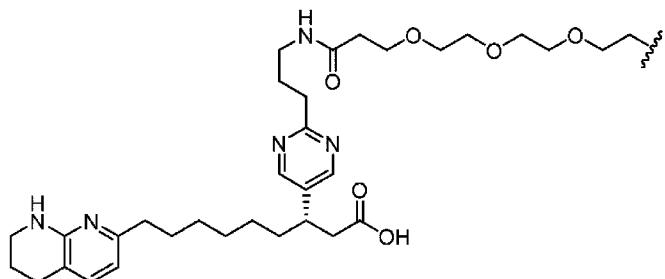
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

25



(Estructura 38c).

- 5 En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

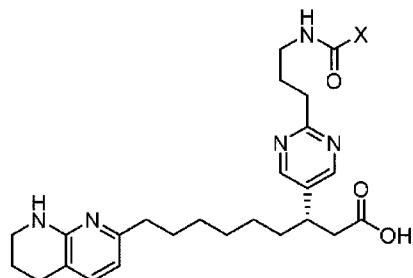


(Estructura 39a).

- 10 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 39a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

15

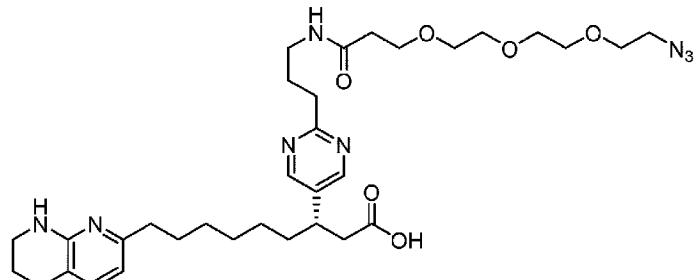


(Estructura 39b),

en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

20

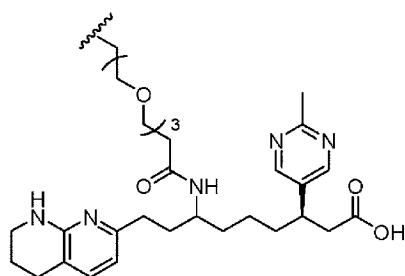
En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:



(Estructura 39c).

25

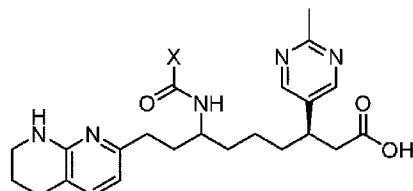
En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:



5

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 40a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

- 10 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

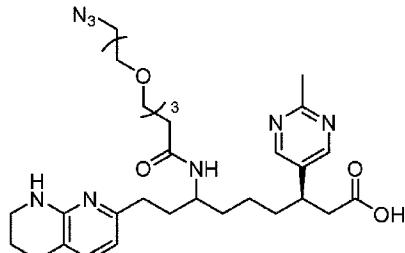


(Estructura 40b),

- 15 en donde  $X$  incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

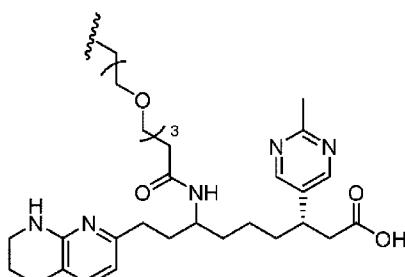
20



(Estructura 40c).

En algunas realizaciones, un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria comprende la siguiente estructura:

25

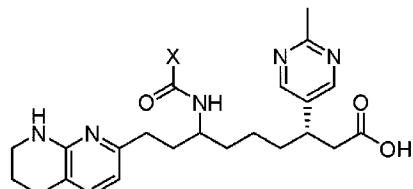


(Estructura 41a).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina de la estructura 41a está unido a una o más moléculas de carga (por ejemplo, agente(s) de ARNi).

30

- 5 En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga, y comprende la siguiente estructura:

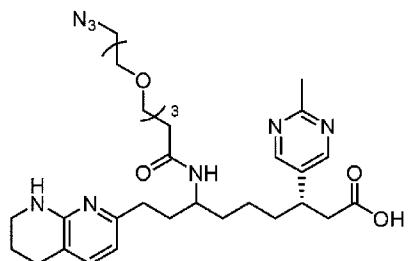


(Estructura 41b),

- 10 en donde X incluye un grupo reactivo, un grupo reactivo protegido o una molécula de carga (por ejemplo, un agente de ARNi).

En algunas realizaciones, el ligando dirigido a integrina se puede sintetizar para incluir un grupo reactivo azida, y comprende la siguiente estructura:

15



(Estructura 41c).

- 20 El grupo reactivo azida como se describe en cualquiera de la estructura 1c, estructura 2c, estructura 2.1c, estructura 2.2c, estructura 2.3c, estructura 2.4c, estructura 2.5c, estructura 2.6c, estructura 2.7c, estructura 2.8c, estructura 2.9c, estructura 2.10c, estructura 2.11c, estructura 28c, estructura 29c, estructura 30c, estructura 31c, estructura 32c, estructura 33c, estructura 34c, estructura 36c, estructura 37c, estructura 38c, estructura 39c, estructura 40c y estructura 41c se puede utilizar para unir el ligando dirigido a integrina a una molécula de interés, es decir, a una molécula de carga tal como un agente de ARNi. La molécula de carga puede ser cualquier molécula que se desee dirigir a una célula que exprese integrina.

25

Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático saturado, de cadena lineal o ramificada, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" incluye grupos alquilo que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 carbonos en una disposición lineal o ramificada. Los ejemplos no limitativos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, *iso*-propilo, terc-butilo, n-hexilo. Como

- 30 se usa en la presente memoria, el término "aminoalquilo" se refiere a un grupo alquilo tal como se ha definido anteriormente, sustituido en cualquier posición con uno o más grupos amino según lo permita la valencia normal. Los grupos amino pueden estar no sustituidos, monosustituidos o disustituidos. Los ejemplos no limitativos de grupos aminoalquilo incluyen aminometilo, dimetilaminometilo y 2-aminoprop-1-ilo.

- 35 Como se usa en la presente memoria, el término "cicloalquilo" significa un grupo de anillo hidrocarburo no aromático saturado o insaturado que tiene de 3 a 14 átomos de carbono, salvo que se indique lo contrario. Los ejemplos no limitativos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, metilciclopropilo, 2,2-dimetil-ciclobutilo, 2-ethyl-ciclopentilo y ciclohexilo. Los cicloalquilos pueden incluir múltiples anillos espiro o fusionados. Los grupos cicloalquilo están opcionalmente mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustituidos en cualquier posición según lo permita la valencia normal.

- 40 Como se usa en la presente memoria, el término "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarburo no aromático, lineal o ramificado, que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, salvo que se indique lo contrario. En dichos grupos pueden estar presentes hasta cinco dobles enlaces carbono-carbono. Por ejemplo, alquenilo "C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" se define como un radical alquenilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, etenilo, propenilo, butenilo y ciclohexenilo. La parte lineal, ramificada o cíclica del grupo alquenilo puede contener enlaces dobles y está opcionalmente mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustituida en cualquier posición según lo permita la valencia normal. El término "cicloalquenilo" significa un grupo hidrocarburo monocíclico que tiene el número especificado de átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono.

45

50

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término “alquinilo” se refiere a un radical hidrocarburo, lineal o ramificado, que contiene de 2 a 10 átomos de carbono, salvo que se indique lo contrario, y que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Pueden estar presentes hasta 5 triples enlaces carbono-carbono. Por lo tanto, “alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>” significa un radical alquinilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero no se limitan a, etinilo, 2-propinilo y 2-butinilo. La parte lineal o ramificada del grupo alquinilo puede estar opcionalmente mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustituida en cualquier posición según lo permita la valencia normal.
- 10 Como se usa en la presente memoria, “alcoxi” o “alcoxi” se refiere a un radical -O-alquilo que tiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, se pretende que alcoxi C<sub>1-6</sub> incluya grupos alcoxi C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>. Por ejemplo, se pretende que alcoxi C<sub>1-8</sub>, incluya grupos alcoxi C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub>. Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, s-butoxi, t-butoxi, n-pentoxi, s-pentoxi, n-heptoxi y n-octoxi.
- 15 Como se usa en la presente memoria, “ceto” se refiere a cualquier grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclico, heteroarilo o arilo como se usa en la presente memoria unido a través de un puente carbonilo. Los ejemplos de grupos ceto incluyen, pero no se limitan a, alcanoílo (por ejemplo, acetilo, propionilo, butanoílo, pentanoílo o hexanoílo), alquenoílo (por ejemplo, acriloílo) alquinenoílo (por ejemplo, etinoílo, propinoílo, butinoílo, pentinoílo o hexinoílo), ariloílo (por ejemplo, benzoílo), heteroariloílo (por ejemplo, pirroloílo, imidazoloílo, quinolinoílo o piridinoílo).
- 20 Como se usa en la presente memoria, “aloxicarbonilo” se refiere a cualquier grupo alcoxi tal como se ha definido anteriormente unido a través de un puente carbonílico (es decir, -C(O)O-alquilo). Los ejemplos de grupos aloxicarbonilo incluyen, pero no se limitan a, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, iso-propoxicarbonilo, n-propoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo o n-pentoxicarbonilo.
- 25 Como se usa en la presente memoria, “ariloxicarbonilo” se refiere a cualquier grupo arilo según se define en la presente memoria unido a través de un puente oxicarbonilo (es decir, -C(O)O-arilo). Los ejemplos de grupos ariloxicarbonilo incluyen, pero no se limitan a, fenoxicarbonilo y naftiloxicarbonilo.
- 30 Como se usa en la presente memoria, “heteroariloxicarbonilo” se refiere a cualquier grupo heteroarilo según se define en la presente memoria unido a través de un puente oxicarbonilo (es decir, -C(O)O-heteroarilo). Los ejemplos de grupos heteroariloxicarbonilo incluyen, pero no se limitan a, 2-piridiloxicarbonilo, 2-oxazoliloxicarbonilo, 4-tiazoliloxicarbonilo o pirimidiniloxicarbonilo.
- 35 Como se usa en la presente memoria, “arilo” o “aromático” significa cualquier anillo de carbono monocíclico o policíclico estable de hasta 6 átomos en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, antracenilo, tetrahidronaftilo, indanilo y bifenilo. En los casos donde el sustituyente arilo es bicíclico y un anillo no es aromático, se entiende que la unión es a través del anillo aromático. Los grupos arilo están opcionalmente mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustituidos en cualquier posición según lo permita la valencia normal.
- 40 Como se usa en la presente memoria, el término “heteroarilo” representa un anillo monocíclico o policíclico estable de hasta 7 átomos en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático y contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, acridinilo, carbazolilo, cinolinilo, quinoxalinilo, pirazolilo, indolilo, benzotriazolilo, furanilo, tienvilo, benzotienilo, benzofuranilo, bencimidazonilo, benzoxazolonilo, quinolinilo, isoquinolinilo, dihidroisoindolono, imidazopiridinilo, isoindolono, indazolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, isoxazolilo, indolilo, pirazinilo, piridazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolilo y tetrahidroquinolina. “Heteroarilo” también se entiende que incluye el derivado de N-óxido de cualquier heteroarilo que contenga nitrógeno. En los casos donde el sustituyente heteroarilo es bicíclico y un anillo no es aromático o no contiene heteroátomos, se entiende que la unión es a través del anillo aromático o a través del anillo que contiene heteroátomos. Los grupos heteroarilo están opcionalmente mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustituidos en cualquier posición según lo permita la valencia normal.
- 45 Como se usa en la presente memoria, el término “heterociclo”, “heterocílico” o “heterociclico” significa un heterociclo aromático o no aromático de 3 a 14 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, incluyendo grupos policíclicos. Como se usa en la presente memoria, el término “heterocílico” también se considera sinónimo de los términos “heterociclo” y “heterociclico” y se entiende que también tiene las mismas definiciones establecidas en la presente memoria. “Heterociclico” incluye los heteroarilos mencionados anteriormente, así como sus análogos dihidro y tetrahidro. Los ejemplos de grupos heterociclicos incluyen, pero no se limitan a, azetidinilo, benzoimidazonilo, benzofuranilo, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, carbazolilo, carbolinilo, cinolinilo, furanilo, imidazolilo, indolilo, indolazinilo, indazolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftopiridinilo, oxadiazolilo, oxooxazolidinilo, oxazolilo, oxazolina, oxopiperazinilo, oxopirrolidinilo, oxomorfolinilo, isoxazolina, oxetanilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridopiridinilo, piridazinilo, piridinonilo, pirimidil, pirimidinonilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrazolilo, tetrazolopiridilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, 1,4-dioxanilo, hexahidroazepinilo, piperazinilo, piperidinilo,
- 50
- 55
- 60
- 65
- 70

5 piridin-2-onilo, pirrolidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, dihidrobenzoimidazolilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotiofenilo, dihidrobenzoxazolilo, dihidrofuranilo, dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, dihidroisooxazolilo, dihidroisotiazolilo, dihidroxadiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidropirazinilo, dihidropirazolilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dihydroquinolinilo, dihidrotetrazolilo, dihidrotiadiazolilo, dihidrotiazolilo, dihidrotienilo, dihidrotriazolilo, dihydroazetidinilo, dioxidotiomorfolinilo, metilendioxibenzoílo, tetrahidrofuranilo y tetrahidrotienilo, y sus N-óxidos. La unión de un sustituyente heterocíclico puede tener lugar a través de un átomo de carbono o a través de un heteroátomo. Los grupos heterocíclico están opcionalmente mono-, di-, tri-, tetra- o penta-sustituidos en cualquier posición según lo permita la valencia normal.

10 Como se usa en la presente memoria, los términos “tratar”, “tratamiento” y similares, significan los métodos o pasos tomados para proporcionar una disminución o alivio de la cantidad, gravedad y/o frecuencia de uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto. Como se usa en la presente memoria, “tratar” y “tratamiento” pueden incluir la prevención, el manejo, el tratamiento profiláctico y/o la inhibición de la cantidad, la gravedad y/o la frecuencia de uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto.

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión “administrar a una célula” y similares, cuando se refiere a una molécula de carga, significa administrar funcionalmente la molécula de carga a la célula. La expresión “administrar funcionalmente” significa administrar la molécula de carga a la célula de una manera que permita que la molécula de carga tenga la actividad biológica esperada. Cuando se hace referencia específicamente a una molécula de carga que es un agente de ARNi, la actividad biológica esperada es, por ejemplo, la inhibición de la expresión génica específica de la secuencia.

20 Salvo que se indique lo contrario, el uso del símbolo  como se usa en la presente memoria significa que cualquier grupo o grupos pueden estar unidos al mismo según el alcance de las invenciones descritas en la presente memoria.

25 Como se usa en la presente memoria, el término “isómeros” se refiere a compuestos que tienen fórmulas moleculares idénticas, pero que difieren en la naturaleza o la secuencia de enlace de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan “estereoisómeros”. Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan “diastereoisómeros” y los estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles se denominan “enantiómeros” o, a veces, isómeros ópticos. Un átomo de carbono unido a cuatro sustituyentes no idénticos se denomina “centro quiral”.

30 Como se usa en la presente memoria, un grupo de unión es uno o más átomos que conectan una molécula o porción de una molécula con otra a la segunda molécula o segunda porción de una molécula. En la técnica, los términos grupo de unión y espaciadores a veces se usan indistintamente. De manera similar, como se usa en la técnica, el término esqueleto a veces se usa indistintamente con un grupo de unión. En algunas realizaciones, En algunas realizaciones, un grupo de unión puede incluir o consistir en un grupo PEG o un resto PEG.

35 Como se usa en la presente memoria, el término “unido” o “conjugado” cuando se refiere a la conexión entre dos moléculas significa que dos moléculas están unidas por un enlace covalente o que dos moléculas están asociadas a través de enlaces no covalentes (por ejemplo, enlaces de hidrógeno o enlaces iónicos). En algunos ejemplos, donde el término “unido” se refiere a la asociación entre dos moléculas a través de enlaces no covalentes, la asociación entre las dos moléculas diferentes tiene una  $K_D$  de menos de  $1 \times 10^{-4}$  M (por ejemplo, menos de  $1 \times 10^{-5}$  M, menos de  $1 \times 10^{-6}$  M o menos de  $1 \times 10^{-7}$  M) en tampón fisiológicamente aceptable (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Salvo que se indique, el término enlazado como se usa en la presente memoria puede referirse a la conexión entre un primer compuesto y un segundo compuesto, ya sea con o sin átomos o grupos de átomos intermedios.

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. Cuando se usa en una reivindicación de la presente memoria, la expresión “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

45 La persona con experiencia en la técnica entenderá y apreciará fácilmente que los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria pueden tener determinados átomos (por ejemplo, átomos de N, O o S) en un estado protonado o desprotonado, dependiendo del entorno en el que se coloque el compuesto o composición. Por consiguiente, como se usa en la presente memoria, las estructuras descritas en la presente memoria prevén que determinados grupos funcionales, tales como, por ejemplo, OH, SH o NH, pueden protonarse o desprotonarse. La presente memoria pretende cubrir los compuestos y composiciones descritos independientemente de su estado de protonación basado en el pH del entorno, como entendería fácilmente la persona con experiencia en la técnica.

50 Como se usa en una reivindicación de la presente memoria, la expresión “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. Cuando se usa en una reivindicación de la presente memoria, la expresión “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

55 Salvo que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si bien se puede utilizar métodos o materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para la

5 implementación o evaluación de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales adecuados.

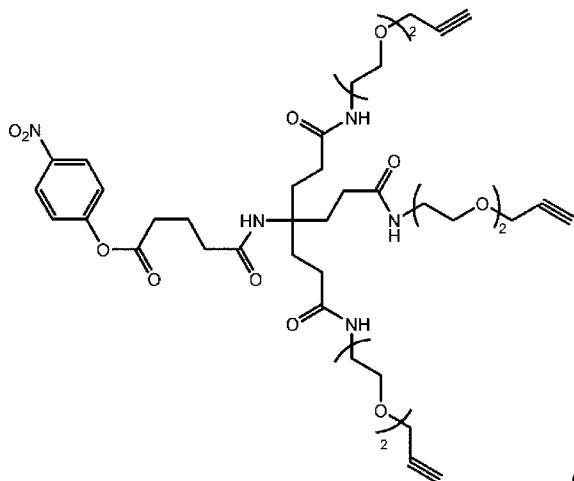
#### Ligandos de integrina $\alpha v \beta 3$ multidentados y esqueletos

10 Como se describe en la presente memoria, en algunas realizaciones, uno o más ligandos de integrina  $\alpha v \beta 3/5$  pueden estar unidos a una o más moléculas de carga. En algunas realizaciones, solo un ligando de integrina se conjuga con una molécula de carga (denominado en la presente memoria ligando “monodentado” o “monovalente”). En algunas realizaciones, dos ligandos de integrina se conjugan con una molécula de carga (denominado en la presente memoria grupo que se puede dirigir a diana “bidentado” o “divalente”). En algunas realizaciones, tres ligandos de integrina se conjugan con una molécula de carga (denominado en la presente memoria grupo que se puede dirigir a diana “tridentado” o “trivalente”). En algunas realizaciones, cuatro ligandos de integrina se conjugan con una molécula de carga (denominado en la presente memoria grupo que se puede dirigir a diana “tetrudentado” o “tetravalente”). En algunas realizaciones, más de cuatro ligandos de integrina se conjugan con una molécula de carga.

15 20 En algunas realizaciones, cuando solo un ligando de integrina se conjuga con una molécula de carga (denominado en la presente memoria ligando “monodentado”), el ligando de integrina puede conjugarse directamente con la molécula de carga. En algunas realizaciones, un ligando de integrina descrito en la presente memoria puede conjugarse con una molécula de carga a través de un esqueleto u otra estructura de unión.

25 30 En algunas realizaciones, los ligandos de integrina descritos en la presente memoria incluyen uno o más esqueletos. Los esqueletos, también denominados a veces en la técnica como grupos de unión o enlazadores, se pueden utilizar para facilitar la unión de una o más moléculas de carga a uno o más ligandos de integrina descritos en la presente memoria. Los esqueletos útiles compatibles con los ligandos descritos en la presente memoria son generalmente conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de esqueletos que se pueden usar con los ligandos de integrina  $\alpha v \beta 3$  descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, polímeros y poliaminoácidos (por ejemplo, ácido bis-glutámico, poli-L-lisina, etc.). En algunas realizaciones, los esqueletos pueden incluir enlazadores o grupos cisteína, DBCO-PEG<sub>1-24</sub>-NHS, Propargil-PEG<sub>1-24</sub>-NHS y/o restos de DBCO y/o propargilo multidentados.

35 En algunas realizaciones, el esqueleto utilizado para unir uno o más ligandos de integrina descritos en la presente memoria a una o más moléculas de carga tiene la siguiente estructura:

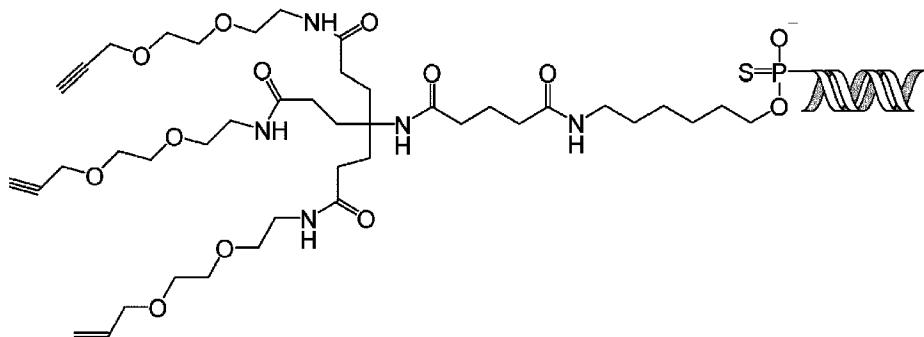


(Esqueleto 1)

40 45 El uso del esqueleto 1, por ejemplo, facilita la conjugación eficiente tanto con los monómeros de ligando de integrina como con la una o más moléculas de carga. El esqueleto 1 incluye un éster de p-nitrofenol (también llamado 4-nitrofenol) reactivo con amina, un enlace amida y tres brazos unitarios de PEG<sub>2</sub>, así como alquinos terminales. El éster de 4-nitrofenol se puede conjugar con la amina primaria en una molécula de carga, tal como la amina primaria en un disparador de ARN formulado con un grupo amina terminal (por ejemplo, NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>), a través de la formación de amida. El alquino terminal se puede conjugar con ligandos modificados con azido (tanto péptidos como moléculas pequeñas) a través de química clic catalizada por cobre.

50 En algunas realizaciones, la molécula de carga es un agente de ARNi. En algunas realizaciones, el esqueleto 1 puede unirse al extremo terminal de un agente de ARNi, tal como al extremo terminal 5' de la cadena de sentido de un agente de ARNi. Por ejemplo, el extremo 5' terminal de la cadena de sentido de un agente de ARNi puede modificarse de modo que incluya una amina C<sub>6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>) unida al extremo 5' del nucleótido 5' terminal del agente de ARNi. Un agente de ARNi que tenga una modificación de amina C<sub>6</sub> de este tipo (u otra modificación que dé como resultado una amina terminal) puede conjugarse fácilmente con el esqueleto 1, como se muestra mediante la representación en la siguiente estructura:

5

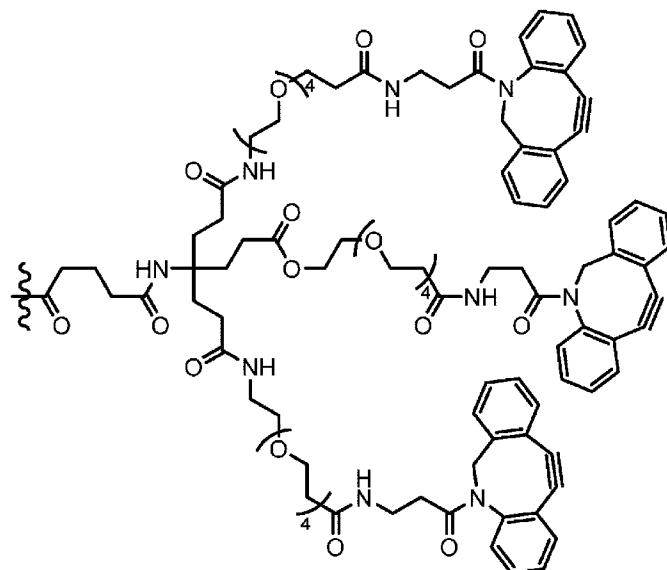


(Estructura 380), en donde indica un agente de ARNi.

Los grupos alquino de la estructura 380 anterior pueden luego conjugarse con los ligandos de integrina descritos en la presente memoria para formar grupos dirigidos a integrinas tridentados.

10

En algunas realizaciones, un esqueleto se puede sintetizar usando DBCO (dibenzociclooctino), que se puede representar por la siguiente estructura:



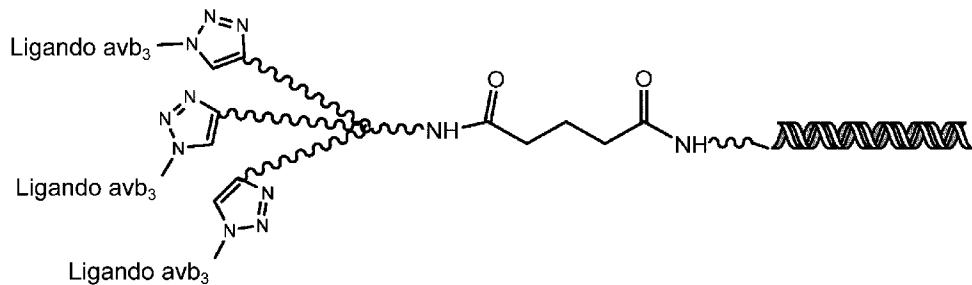
(Estructura 381),

15

en donde indica la unión a un grupo reactivo o un resto que comprende una molécula de carga.

En algunas realizaciones, se forman grupos triazol entre el agente de ARNi y los ligandos de integrina descritos en la presente memoria, como se muestra en la siguiente estructura general:

20

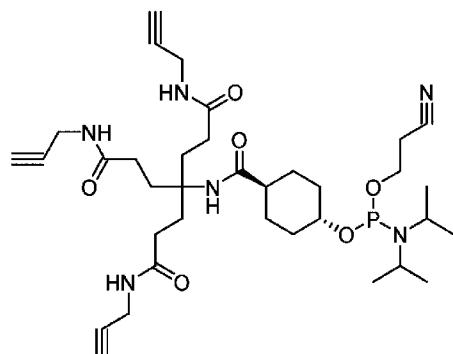


- 5 (Estructura 390), en donde  indica cualquier esqueleto o enlazador adecuado que se puede usar para unir un ligando a un agente de ARNi, y



- 10 indica un agente de ARNi.

En algunas realizaciones, un esqueleto puede sintetizarse como un compuesto de fosforamidita, un ejemplo del cual se muestra en la siguiente estructura:



(Estructura 400).

15

El compuesto de trialquino de la estructura 400 permite que un ligando tridentado se acople fácilmente al extremo 5' terminal de la cadena de sentido de un agente de ARNi a través de una reacción de clic de un alquino con un ligando que se puede dirigir a diana que comprende una azida.

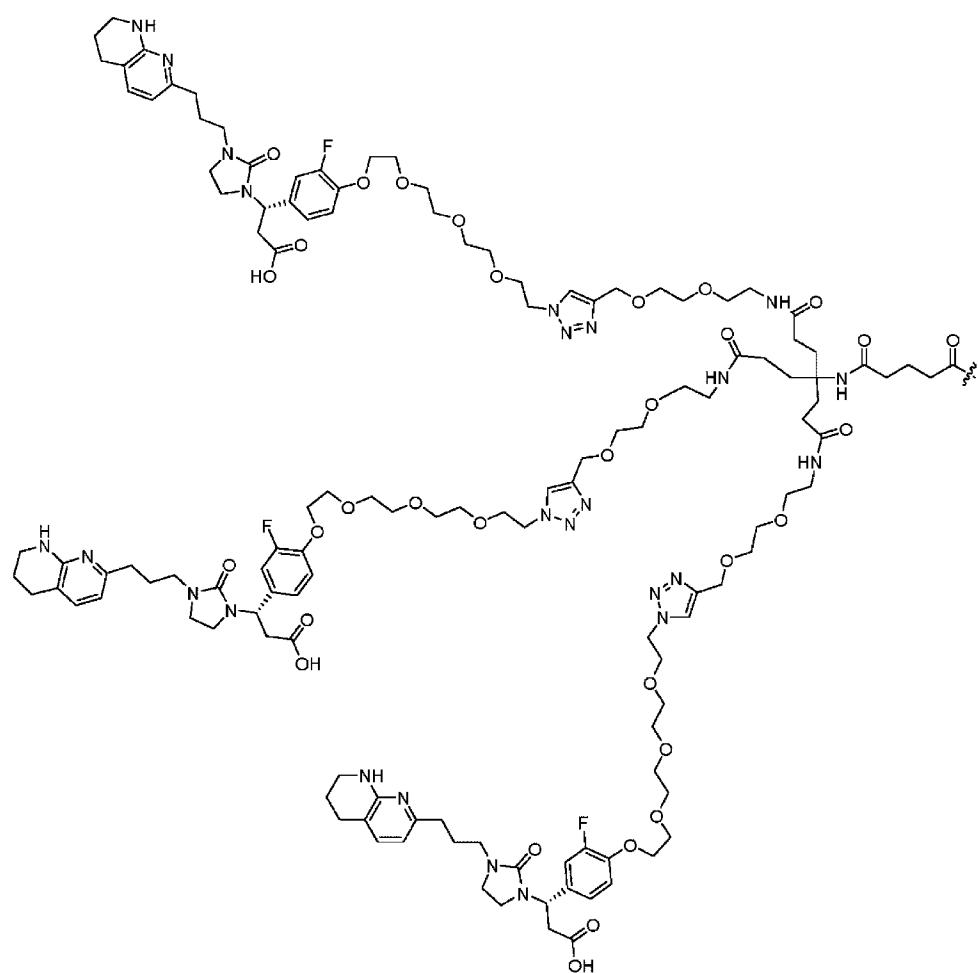
20

En algunas realizaciones, un grupo dirigido a integrinas descrito en la presente memoria comprende la estructura 1a, la estructura 2a, la estructura 2.1a, la estructura 2.2a, la estructura 2.3a, la estructura 2.4a, la estructura 2.5a, la estructura 2.6a, la estructura 2.7a, la estructura 2.8a, la estructura 2.9a, la estructura 2.10a, la estructura 2.11a, la estructura 28a, la estructura 29a, la estructura 30a, la estructura 31a, la estructura 32a, la estructura 33a, la estructura 34a, la estructura 36a, la estructura 37a, la estructura 38a, la estructura 39a, la estructura 40a y la estructura 41a, en donde el grupo dirigido a integrina  $\alpha\beta 3$  es un grupo que se puede dirigir a diana tridentado y comprende tres ligandos.

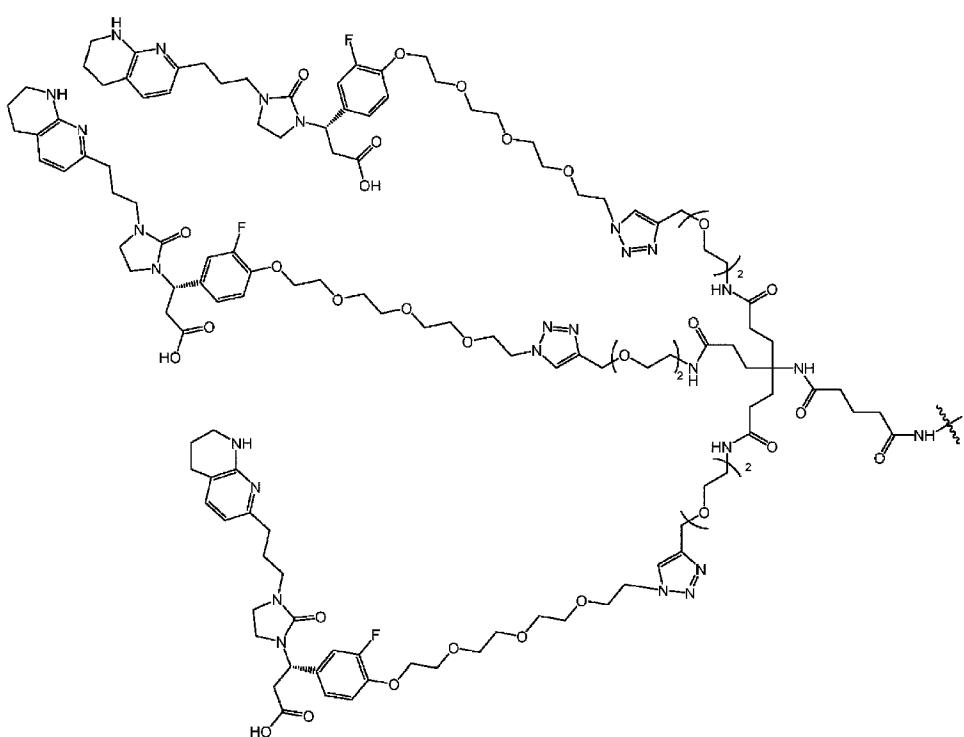
25

En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana tridentado  $\alpha\beta 3$  descrito en la presente memoria comprende tres ligandos de la estructura 2a, y puede representarse por la siguiente estructura:

30



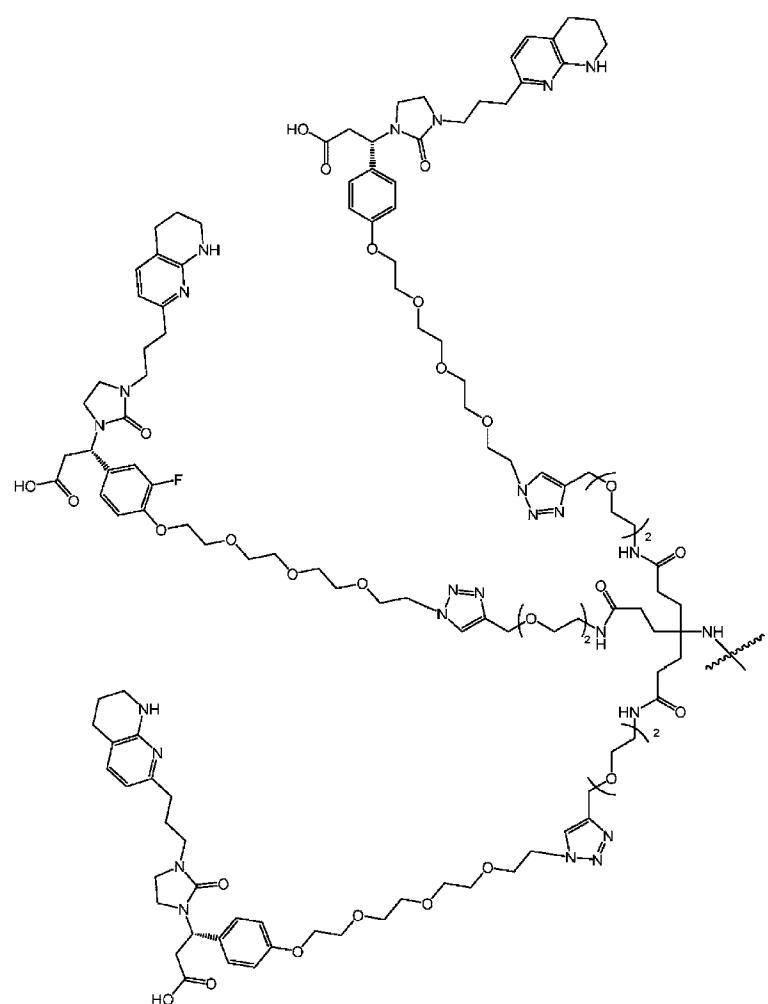
En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana tridentado descrito en la presente memoria comprende tres ligandos de la estructura 2a, y puede representarse por la siguiente estructura:



(Estructura 701)

5

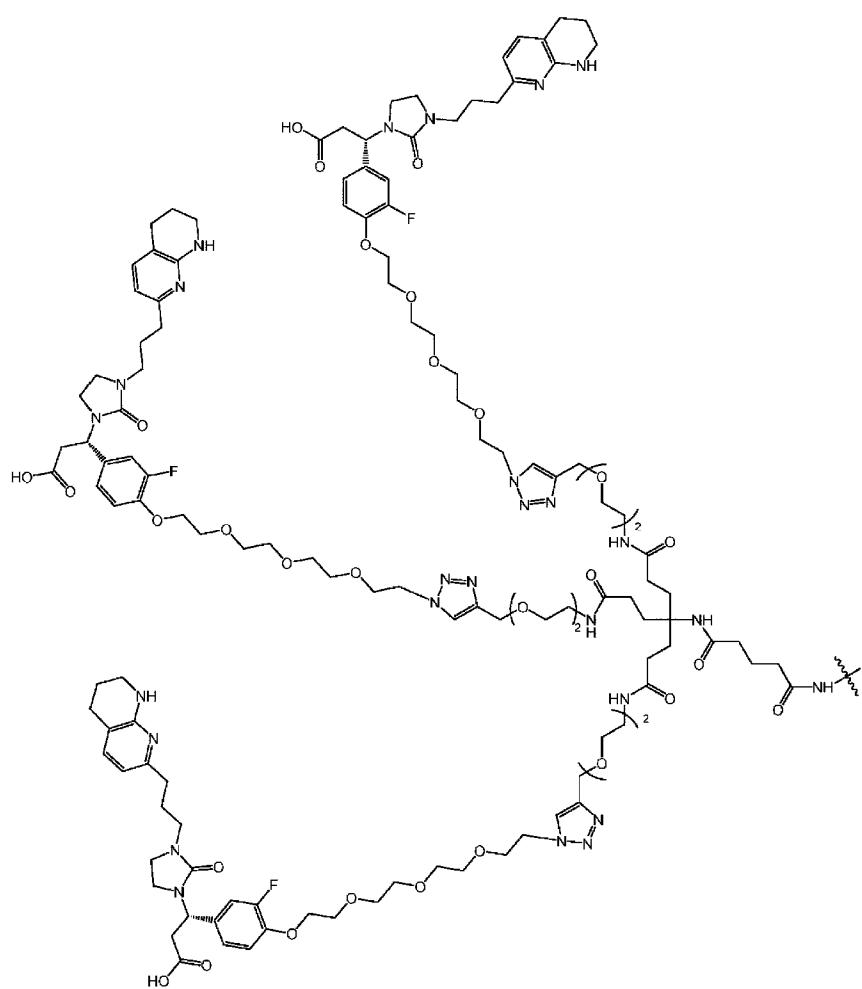
En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana tridentado descrito en la presente memoria comprende tres ligandos de la estructura 2a, y puede representarse por la siguiente estructura:



(Estructura 701a)

5

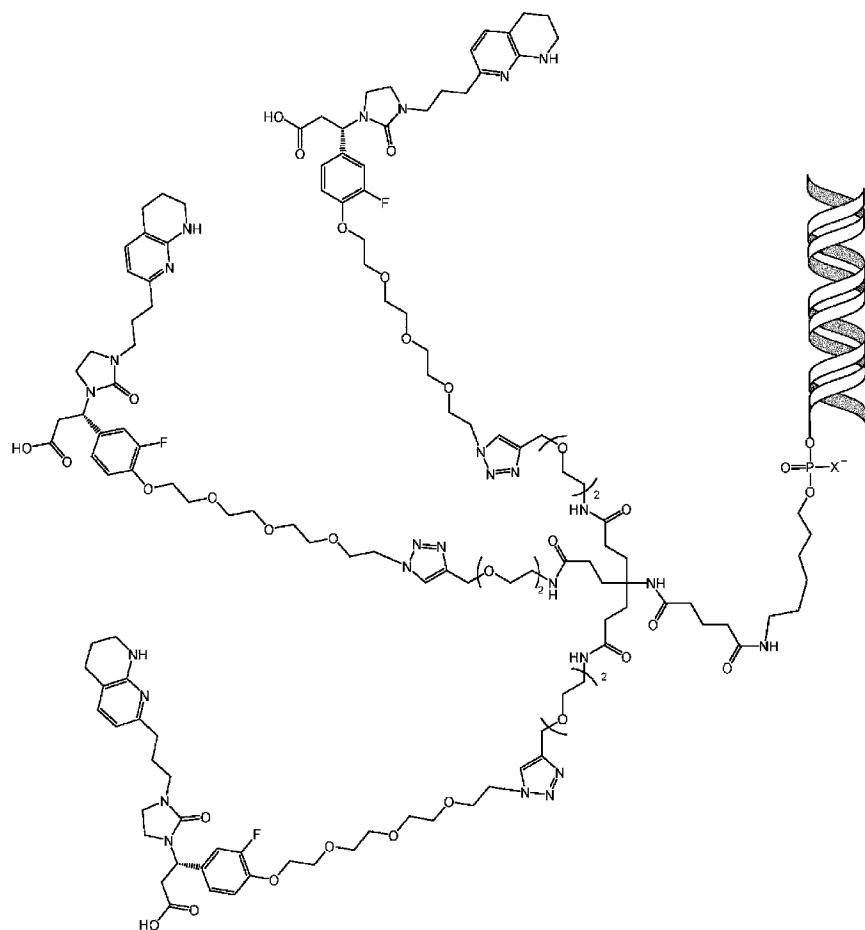
En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que comprende un enlazador glutárico comprende tres ligandos de la estructura 2a, y puede representarse por la siguiente estructura:



## (Estructura 701b)

5

En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana tridentado descrito en la presente memoria comprende tres ligandos de la estructura 2a, y puede representarse por la siguiente estructura:



5

(Estructura 701c),

en donde,

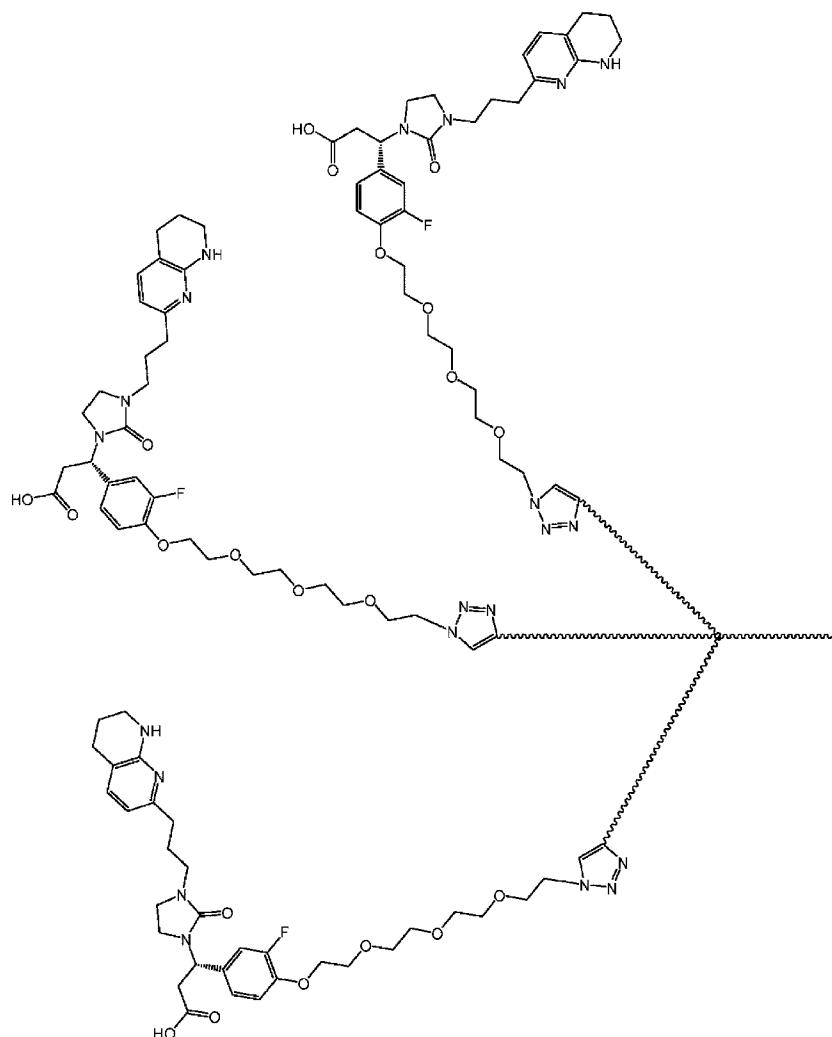


10

indica un agente de ARNi y X = O o S.

En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana tridentado descrito en la presente memoria comprende tres ligandos de la estructura 2a, y puede representarse por la siguiente estructura:

15

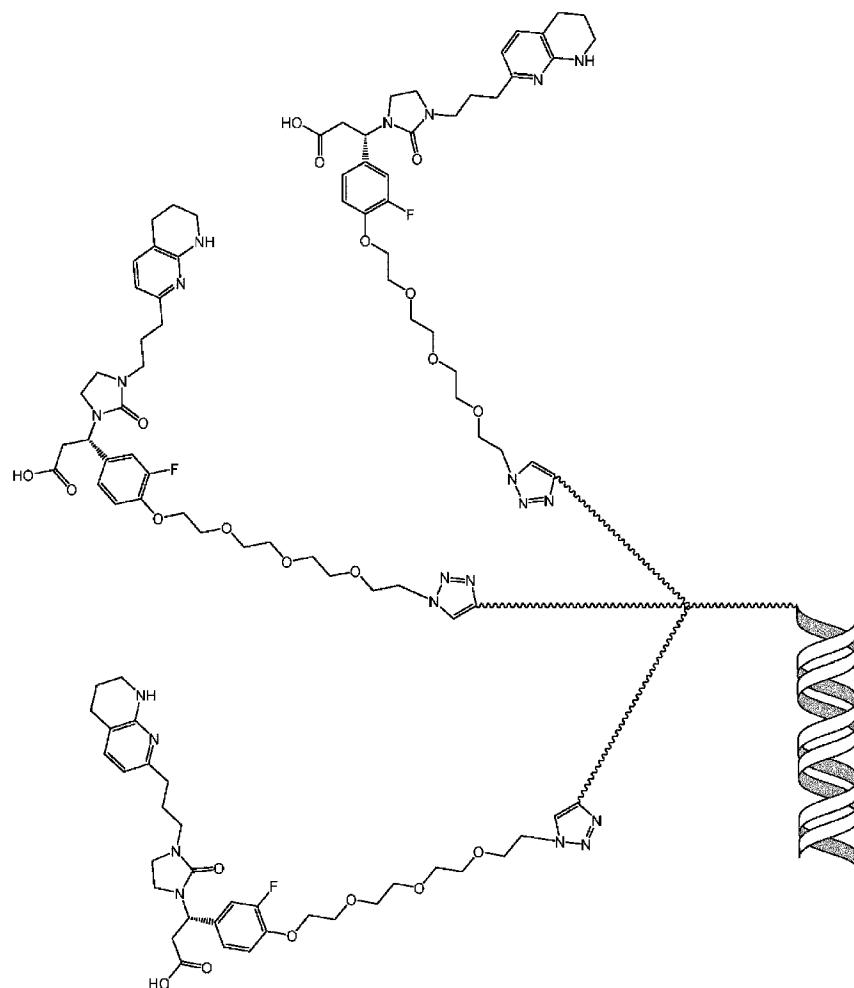


5

(Estructura 701d),

en donde - indica cualquier esqueleto o enlazador adecuado que se puede usar para unirse a un ligando y una molécula de carga.

- 10 En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana tridenteado  $\alpha\beta_3$  conjugado con un agente de ARNi comprende tres ligandos de estructura 2a, y puede representarse por la siguiente estructura:



5

(Estructura 701e),

en donde ~~~~~ indica cualquier esqueleto o enlazador adecuado que se puede usar para unirse a un ligando y un agente de ARNi, e

10



indica un agente de ARNi.

15

Grupos reactivos y grupos reactivos protegidos.

15

Los grupos reactivos son bien conocidos en la técnica y proporcionan la formación de enlaces covalentes entre dos moléculas o reactivos. Los grupos reactivos adecuados para su uso en el alcance de las invenciones de la presente memoria incluyen, pero no se limitan a: grupos amino, grupos amida, grupos ácido carboxílico, azidas, alquinos, grupos propargilo, BCN(biciclo [6.1.0]nonino, DBCO(dibenzociclooctino)tioles, grupos maleimida, grupos aminooxi, N-hidroxisuccinimida (NHS) u otro éster activado (por ejemplo, PNP, TFP, PFP), grupos bromo, aldehídos, carbonatos, tosilatos, tetrazinas, trans-cicloocteno (TCO), hidrazidas, grupos hidroxilo, disulfuros y grupos disulfuro de ortopiridilido.

20

La incorporación de grupos reactivos puede facilitar la conjugación de un ligando de integrina descrito en la presente memoria con una molécula de carga. Las reacciones de conjugación son bien conocidas en la técnica y proporcionan la formación de enlaces covalentes entre dos moléculas o reactivos. Las reacciones de conjugación adecuadas para su uso en el alcance de las invenciones de la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, reacción de acoplamiento de amida, reacción de adición de Michael, reacción de formación de hidrazone y reacción de cicloadición de química clic.

25

En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria se sintetizan como un éster de tetrafluorofenilo (TFP), que puede ser desplazado por un grupo amino reactivo para unir una molécula de carga. En algunas realizaciones, los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria se sintetizan

30

5 como una azida, que se puede conjugar con un grupo propargilo o DBCO, por ejemplo, mediante una reacción de cicloadición química clic, para unir una molécula de carga.

10 Los grupos reactivos protegidos también se usan comúnmente en la técnica. Un grupo protector proporciona una transformación química temporal de un grupo reactivo en un grupo que no reacciona en condiciones en las que el grupo no protegido reacciona, por ejemplo, para proporcionar quimioselectividad en una reacción química posterior. Los grupos reactivos protegidos adecuados para su uso en el alcance de las invenciones de la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, grupos BOC (*t*-butoxicarbonilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), grupos carboxibencílico (CBZ), ésteres bencílicos y PBF (2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo).

15 Moléculas de carga (incluidos agentes de ARNi)

Una molécula de carga es cualquier molécula que, cuando se separa de los ligandos de integrina descritos en la 20 presente memoria, tendría un efecto deseable en una célula que comprende un receptor de integrina. Una molécula de carga puede ser, pero no se limita a, un ingrediente farmacéutico, un producto farmacéutico, un profármaco, una sustancia con un beneficio terapéutico conocido, una molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, una etiqueta o marcador, un lípido, un ácido nucleico o polinucleótido natural o modificado, un péptido, un polímero, una poliamina, una proteína, un aptámero, una toxina, una vitamina, un PEG, un hapteno, una digoxigenina, una biotina, un átomo o molécula radiactiva o un fluoróforo. En algunas 25 realizaciones, una o más moléculas de carga (por ejemplo, las mismas o diferentes moléculas de carga) se unen a uno o más ligandos de integrina para dirigir las moléculas de carga a una célula que expresa la integrina  $\alpha\beta 3$  y/o la integrina  $\alpha\beta 5$ .

En algunas realizaciones, la una o más moléculas de carga es un ingrediente farmacéutico o composición 30 farmacéutica. En algunas realizaciones, la una o más moléculas de carga es un compuesto basado en oligonucleótidos. Como se usa en la presente memoria, un “compuesto basado en oligonucleótidos” es una secuencia de nucleótidos que contiene aproximadamente 10-50 (p. ej., 10 a 48, 10 a 46, 10 a 44, 10 a 42, 10 a 40, 10 a 38, 10 a 36, 10 a 34, 10 a 32, 10 a 30, 10 a 28, 10 a 26, 10 a 24, 10 a 22, 10 a 20, 10 a 18, 10 a 16, 10 a 14, 10 a 12, 12 a 50, 12 a 48, 12 a 46, 12 a 44, 12 a 42, 12 a 40, 12 a 38, 12 a 36, 12 a 34, 12 a 32, 12 a 30, 12 a 28, 12 a 26, 12 a 24, 12 a 22, 12 a 20, 12 a 18, 12 a 16, 12 a 14, 14 a 50, 14 a 48, 14 a 46, 14 a 44, 14 a 42, 14 a 40, 14 a 38, 14 a 36, 14 a 34, 14 a 32, 14 a 30, 14 a 28, 14 a 26, 14 a 24, 14 a 22, 14 a 20, 14 a 18, 14 a 16, 16 a 50, 16 a 48, 16 a 46, 16 a 44, 16 a 42, 16 a 40, 16 a 38, 16 a 36, 16 a 34, 16 a 32, 16 a 30, 16 a 28, 16 a 26, 16 a 24, 16 a 22, 16 a 20, 16 a 18, 18 a 50, 18 a 48, 18 a 46, 18 a 44, 18 a 42, 18 a 40, 18 a 38, 18 a 36, 18 a 34, 18 a 32, 18 a 30, 18 a 28, 18 a 26, 18 a 24, 18 a 22, 18 a 20, 20 a 50, 20 a 48, 20 a 46, 20 a 44, 20 a 42, 20 a 40, 20 a 38, 20 a 36, 20 a 34, 20 a 32, 20 a 30, 20 a 28, 20 a 26, 20 a 24, 20 a 22, 22 a 50, 22 a 48, 22 a 46, 22 a 44, 22 a 42, 22 a 40, 22 a 38, 22 a 36, 22 a 34, 22 a 32, 22 a 30, 22 a 28, 22 a 26, 22 a 24, 24 a 50, 24 a 48, 24 a 46, 24 a 44, 24 a 42, 24 a 40, 24 a 38, 24 a 36, 24 a 34, 24 a 32, 24 a 30, 24 a 28, 24 a 26, 26 a 50, 26 a 48, 26 a 46, 26 a 44, 26 a 42, 26 a 40, 26 a 38, 26 a 36, 26 a 34, 26 a 32, 26 a 30, 26 a 28, 28 a 50, 28 a 48, 28 a 46, 28 a 44, 28 a 42, 28 a 40, 28 a 38, 28 a 36, 28 a 34, 28 a 32, a 28 a 30, 30 a 50, 30 a 48, 30 a 46, 30 a 44, 30 a 42, 30 a 40, 30 a 38, 30 a 36, 30 a 34, 30 a 32, 32 a 50, 32 a 48, 32 a 46, 32 a 44, 32 a 42, 32 a 40, 32 a 38, 32 a 36, 32 a 34, 34 a 50, 34 a 48, 34 a 46, 34 a 44, 34 a 42, 34 a 40, 34 a 38, 34 a 36, 36 a 50, 36 a 48, 36 a 46, 36 a 44, 36 a 42, 36 a 40, 36 a 38, 38 a 50, 38 a 48, 38 a 46, 38 a 44, 38 a 42, 38 a 40, 40 a 50, 40 a 48, 40 a 46, 40 a 44, 40 a 42, 42 a 50, 42 a 48, 42 a 46, 42 a 44, 44 a 50, 44 a 48, 44 a 46, 46 a 50, 46 a 48, o 48 a 50) nucleótidos o pares de bases de nucleótidos. En algunas realizaciones, un compuesto basado 45 en oligonucleótidos tiene una secuencia de nucleobases que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia codificante en un ácido nucleico diana o gen diana expresado (por ejemplo, la transcripción génica o ARNm de un gen diana) dentro de una célula. En algunas realizaciones, los compuestos basados en oligonucleótidos, tras la administración a una célula que expresa un gen, son capaces de inhibir la expresión del gen subyacente, y se denominan en la presente memoria “compuestos basados en oligonucleótidos que inhiben la expresión”. La expresión 50 génica se puede inhibir *in vitro* o *in vivo*.

55 Los “compuestos basados en oligonucleótidos” incluyen, pero no se limitan a: oligonucleótidos monocatenarios, oligonucleótidos antisentido monocatenarios, ARN cortos o pequeños de interferencia (ARNpi), ARN bicatenarios (ARNbc), microARN (mi-ARN), ARN de horquilla corta (ARNhc), ribozimas, moléculas de ARN de interferencia y substratos de Dicer. En algunas realizaciones, un compuesto basado en oligonucleótidos es un oligonucleótido monocatenario, tal como un oligonucleótido antisentido. En algunas realizaciones, un compuesto basado en oligonucleótidos es un oligonucleótido bicatenario. En algunas realizaciones, un compuesto basado en oligonucleótidos es un oligonucleótido bicatenario que es un agente de ARNi.

65 En algunas realizaciones, la una o más moléculas de carga es/son un “agente de ARNi”, que como se define en la presente memoria es una composición química que incluye una molécula de oligonucleótido de tipo ARN o ARN (por ejemplo, ARN modificado químicamente) que es capaz de degradar o inhibir la traducción de transcritos de ARN mensajero (ARNm) de un ARNm diana de una manera específica de secuencia. Como se usa en la presente memoria, los agentes ARNi pueden operar a través del mecanismo de interferencia de ARN (es decir, inducir interferencia de ARN a través de la interacción con la maquinaria de la ruta de interferencia de ARN (complejo silenciador inducido por ARN o RISC) de células de mamífero), o mediante mecanismo(s) alternativo(s) o ruta(s) alternativa(s) cualesquiera. 70 Si bien se cree que los agentes de ARNi, como se usa ese término en la presente memoria, actúan principalmente a

5 través del mecanismo de interferencia de ARN, los agentes de ARNi descritos no se unen ni se limitan a ninguna vía o mecanismo de acción particular. Los agentes de ARNi descritos en la presente memoria están compuestos por una cadena con sentido y una cadena antisentido, e incluyen, pero no se limitan a: ARN cortos o pequeños de interferencia (ARNpi), ARN bicanenarios (ARNbc), microARN (mi-ARN), ARN de horquilla corta (ARNhc) y sustratos de Dicer. La cadena antisentido de los agentes de ARNi descritos en la presente memoria es al menos parcialmente complementaria al ARNm diana. Los agentes de ARNi pueden incluir uno o más nucleótidos modificados y/o uno o más enlaces no fosfodiéster.

10 De forma típica, los agentes de ARNi pueden estar compuestos por al menos una cadena con sentido (también denominada cadena pasajera) que incluye una primera secuencia, y una cadena antisentido (también denominada cadena guía) que incluye una segunda secuencia. La longitud de las cadenas de sentido y antisentido de un agente de ARNi puede ser cada una de 16 a 49 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, las cadenas de sentido y antisentido de un agente de ARNi tienen independientemente una longitud de 17 a 26 nucleótidos. En algunas realizaciones, las cadenas de sentido y antisentido tienen independientemente una longitud de 19 a 26 nucleótidos. En algunas realizaciones, las cadenas de sentido y antisentido tienen independientemente una longitud de 21 a 26 nucleótidos. En algunas realizaciones, las cadenas de sentido y antisentido tienen independientemente una longitud de 21 a 24 nucleótidos. En algunas realizaciones, las cadenas de sentido y antisentido tienen cada una una longitud de 21 nucleótidos. Las cadenas de sentido y antisentido pueden tener la misma longitud o longitudes diferentes. Los agentes de ARNi incluyen una secuencia de cadena antisentido que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia en el gen diana, y tras la administración a una célula que expresa la diana, un agente de ARNi puede inhibir la expresión de uno o más genes diana *in vivo* o *in vitro*.

15 Los compuestos basados en oligonucleótidos en general, y los agentes de ARNi específicamente, pueden estar compuestos por nucleótidos modificados y/o uno o más enlaces no fosfodiéster. Como se usa en la presente memoria, un "nucleótido modificado" es un nucleótido distinto de un ribonucleótido (nucleótido 2'-hidroxilo). En algunas realizaciones, al menos el 50 % (por ejemplo, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %) de los nucleótidos son nucleótidos modificados. Como se usa en la presente memoria, los nucleótidos modificados incluyen, pero no se limitan a, desoxirribonucleótidos, miméticos de nucleótidos, nucleótidos abásicos, nucleótidos modificados en posición 2', nucleótidos de enlaces 3' a 3' (invertidos), nucleótidos que comprenden bases no naturales, nucleótidos puenteados, ácidos nucleicos peptídicos, miméticos de 2',3'-seconucleótidos (análogos de nucleobases desbloqueados, nucleótidos bloqueados, nucleótidos 3'-O-metoxi (con uniones internucleosílicas en posición 2'), nucleótidos 2'-F-Arabino, nucleótidos 5'-Me, 2'-fluoro, nucleótidos morfolino, desoxirribonucleótidos de fosfonato de vinilo, nucleótidos que contienen fosfonato de vinilo y nucleótidos que contienen fosfonato de ciclopropilo. Los nucleótidos modificados en posición 2' (es decir, un nucleótido con un grupo distinto de un grupo hidroxilo en la posición 2' del anillo de azúcar de cinco miembros) incluyen, pero no se limitan a, 2'-O-metilnucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoronucleótidos, 2'-desoxinucleótidos, 2'-metoxietil(2'-O-2-metoxiletin)nucleótidos, 2'-aminonucleótidos y 2'-alquilnucleótidos.

20 Además, uno o más nucleótidos de un compuesto basado en oligonucleótidos, tal como un agente de ARNi, pueden estar unidos por enlaces o estructuras principales no estándar (es decir, enlaces internucleósidos modificados o estructuras principales modificadas). Un enlace internucleósido modificado puede ser un enlace internucleósido covalente que no contiene fosfato. Los enlaces o estructuras principales de internucleósidos modificados incluyen, pero no se limitan a, grupos 5'-fosforotioato, fosforotioatos quirales, tiofosfatos, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de alquilo (por ejemplo, fosfonatos de metilo o fosfonatos de 3'-alquieno), 25 fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos (por ejemplo, 3'-aminofosforamidato, aminoalquilfosforamidatos o tionofosforamidatos), tionaalquilfosfonatos, tionaalquilfosfotriésteres, enlaces morfolino, boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos de boranofosfatos unidos 2'-5', o boranofosfatos que tienen polaridad invertida donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos en 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'.

30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720

- 5 ejemplo, unidades ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ) (por ejemplo, 20 a 850, 20 a 800, 20 a 750, 20 a 700, 20 a 650, 20 a 600, 20 a 550, 20 a 500, 20 a 450, 20 a 400, 20 a 350, 20 a 300, 20 a 250, 20 a 200, 20 a 150, 20 a 100, 20 a 75, 20 a 50, 100 a 850, 100 a 800, 100 a 750, 100 a 700, 100 a 650, 100 a 600, 100 a 550, 100 a 500, 100 a 450, 100 a 400, 100 a 350, 100 a 300, 100 a 250, 100 a 200, 100 a 150, 200 a 850, 200 a 800, 200 a 750, 200 a 700, 200 a 650, 200 a 600, 200 a 550, 200 a 500, 200 a 450, 200 a 400, 200 a 350, 200 a 300, 200 a 250, 250 a 900, 250 a 850, 250 a 800, 250 a 750, 250 a 700, 250 a 650, 250 a 600, 250 a 550, 250 a 500, 250 a 450, 250 a 400, 250 a 350, 250 a 300, 300 a 900, 300 a 850, 300 a 800, 300 a 750, 300 a 700, 300 a 650, 300 a 600, 300 a 550, 300 a 500, 300 a 450, 300 a 400, 300 a 350, 350 a 900, 350 a 850, 350 a 800, 350 a 750, 350 a 700, 350 a 650, 350 a 600, 350 a 550, 350 a 500, 350 a 450, 350 a 400, 400 a 900, 400 a 850, 400 a 800, 400 a 750, 400 a 700, 400 a 650, 400 a 600, 400 a 550, 400 a 500, 400 a 450, 450 a 900, 450 a 850, 450 a 800, 450 a 750, 450 a 700, 450 a 650, 450 a 600, 450 a 550, 450 a 500, 500 a 900, 500 a 850, 500 a 800, 500 a 750, 500 a 700, 500 a 650, 500 a 600, 500 a 550, 550 a 900, 550 a 850, 550 a 800, 550 a 750, 550 a 700, 550 a 650, 550 a 600, 600 a 900, 600 a 850, 600 a 800, 600 a 750, 600 a 700, 600 a 650, 650 a 900, 650 a 850, 650 a 800, 650 a 750, 650 a 700, 700 a 900, 700 a 850, 700 a 800, 700 a 750, 750 a 900, 750 a 850, 750 a 800, 800 a 900, 850 a 900, o 850 a 900 unidades óxido de etileno). En algunas realizaciones, la una o más moléculas de carga consisten en un resto PEG que tiene aproximadamente 455 unidades de óxido de etileno (un peso molecular de aproximadamente 20 kilodalton (kDa)). En algunas realizaciones, un resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 2 kilodaltons. En algunas realizaciones, un resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kilodaltons. En algunas realizaciones, un resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kilodaltons. Los restos PEG descritos en la presente memoria pueden ser lineales o ramificados. Los restos PEG pueden ser discretos (monodispersos) o no discretos (polidispersos). Los restos PEG para su uso como molécula de carga potenciadora de la FC se pueden comprar comercialmente. En algunas realizaciones, la una o más moléculas de carga incluyen un resto PEG que puede actuar como un modulador o potenciador de la FC, así como una molécula de carga diferente, tal como un ingrediente o compuesto farmacéuticamente activo.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 70
- Los ligandos de integrina descritos incluyen sales o solvatos de los mismos. Solvatos de un ligando de integrina se usa con el significado de aducciones de moléculas de disolvente inerte en el ligando de integrina que se forman debido a su fuerza de atracción mutua. Los solvatos son, por ejemplo, mono o dihidratos o compuestos de adición con alcoholes, tales como, por ejemplo, con metanol o etanol.
- Se pueden proporcionar grupos amino libres o grupos hidroxilo libres como sustituyentes de ligandos de integrina con grupos protectores correspondientes.
- Los ligandos de integrina  $\alpha v\beta 3$  también incluyen, por ejemplo, derivados, es decir, ligandos de integrina modificados con, por ejemplo, grupos alquilo o acilo, azúcares u oligopéptidos, que se escinden *in vitro* o en un organismo.
- En algunas realizaciones, un ligando de integrina descrito en la presente memoria facilita la administración de una molécula de carga en el citosol de una célula que presenta la integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o la integrina  $\alpha v\beta 5$  en su superficie, ya sea a través de endocitosis mediada por ligando, pinocitosis o por otros medios. En algunas realizaciones, un ligando de integrina descrito en la presente memoria facilita la administración de una molécula de carga a la membrana plasmática de una célula que presenta la integrina  $\alpha v\beta 3$  y/o la integrina  $\alpha v\beta 5$ .
- Composiciones farmacéuticas
- En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen, consisten en, o consisten esencialmente en, uno o más de los ligandos de integrina descritos en la presente memoria.
- Como se usa en la presente memoria, una “composición farmacéutica” comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un ingrediente farmacéutico activo (API) y, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes farmacéuticamente aceptables (excipientes) son sustancias distintas del ingrediente farmacéutico activo (API, producto terapéutico) que se incluyen intencionalmente en el sistema de administración de fármacos. Los excipientes no ejercen o no están destinados a ejercer un efecto terapéutico a la dosis prevista. Los excipientes pueden actuar para a) ayudar en el procesamiento del sistema de administración de fármacos durante la fabricación, b) proteger, apoyar o mejorar la estabilidad, biodisponibilidad o aceptabilidad del paciente del API, c) ayudar en la identificación del producto y/o d) mejorar cualquier otro atributo de la seguridad general, efectividad, de la administración del API durante el almacenamiento o uso. Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser o no una sustancia inerte.
- Los excipientes incluyen, pero no se limitan a: potenciadores de la absorción, antiadherentes, agentes antiespumantes, antioxidantes, aglutinantes, agentes tamponadores, portadores, agentes de recubrimiento, colores, potenciadores de la administración, polímeros de administración, dextrano, dextrosa, diluyentes, desintegrandes, emulsionantes, extensores, rellenos, sabores, deslizantes, humectantes, lubricantes, aceites, polímeros, conservantes, solución salina, sales, disolventes, azúcares, agentes de suspensión, matrices de liberación sostenida, edulcorantes, agentes espesantes, agentes de tonicidad, vehículos, agentes hidrófugos y agentes humectantes.
- Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden contener otros componentes adicionales que se encuentran comúnmente en las composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, el componente

- 5 adicional es un material farmacéuticamente activo. Los materiales farmacéuticamente activos incluyen, pero no se limitan a: antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios (por ejemplo, antihistamínico, difenhidramina, etc.), fármaco de molécula pequeña, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, aptámeros y/o vacuna.
- 10 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, odorantes, sales para la variación de la presión osmótica, tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener otro agente con un beneficio terapéutico conocido.
- 15 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración se puede realizar de cualquier manera comúnmente conocida en la técnica, tal como, pero sin limitarse a, tópica (por ejemplo, mediante un parche transdérmico), pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador, intratraqueal, intranasal), epidérmica, transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; administración subdérmica (por ejemplo, mediante un dispositivo implantado), intracraneal, intraparenquimatosa, intratecal e intraventricular. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se administran mediante inyección o infusión intravenosa o inyección subcutánea. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones. La administración también se puede llevar a cabo por vía rectal, por ejemplo, usando supositorios; local o percutáneamente, por ejemplo, usando ungüentos, cremas, geles o soluciones; o parenteralmente, por ejemplo, usando soluciones inyectables.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 70
- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELM (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtro. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen el secado al vacío y la liofilización, lo que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada de forma estéril del mismo.
- Las formulaciones adecuadas para la administración intraarticular pueden estar en forma de una preparación acuosa estéril de cualquiera de los ligandos descritos en la presente memoria que puede estar en forma microcristalina, por ejemplo, en forma de una suspensión microcristalina acuosa. Las formulaciones liposomales o los sistemas poliméricos biodegradables también se pueden utilizar para presentar cualquiera de los ligandos descritos en la presente memoria para la administración intraarticular y oftálmica.
- Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Las suspensiones liposomales también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente US-4.522.811.
- Una composición farmacéutica puede contener otros componentes adicionales que se encuentran comúnmente en las composiciones farmacéuticas. Dichos componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a: agentes antipruriginosos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios (por ejemplo, antihistamínicos, difenhidramina, etc.). Como se usa en la presente memoria, "cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un agente farmacéuticamente activo para producir un resultado farmacológico, terapéutico o preventivo.

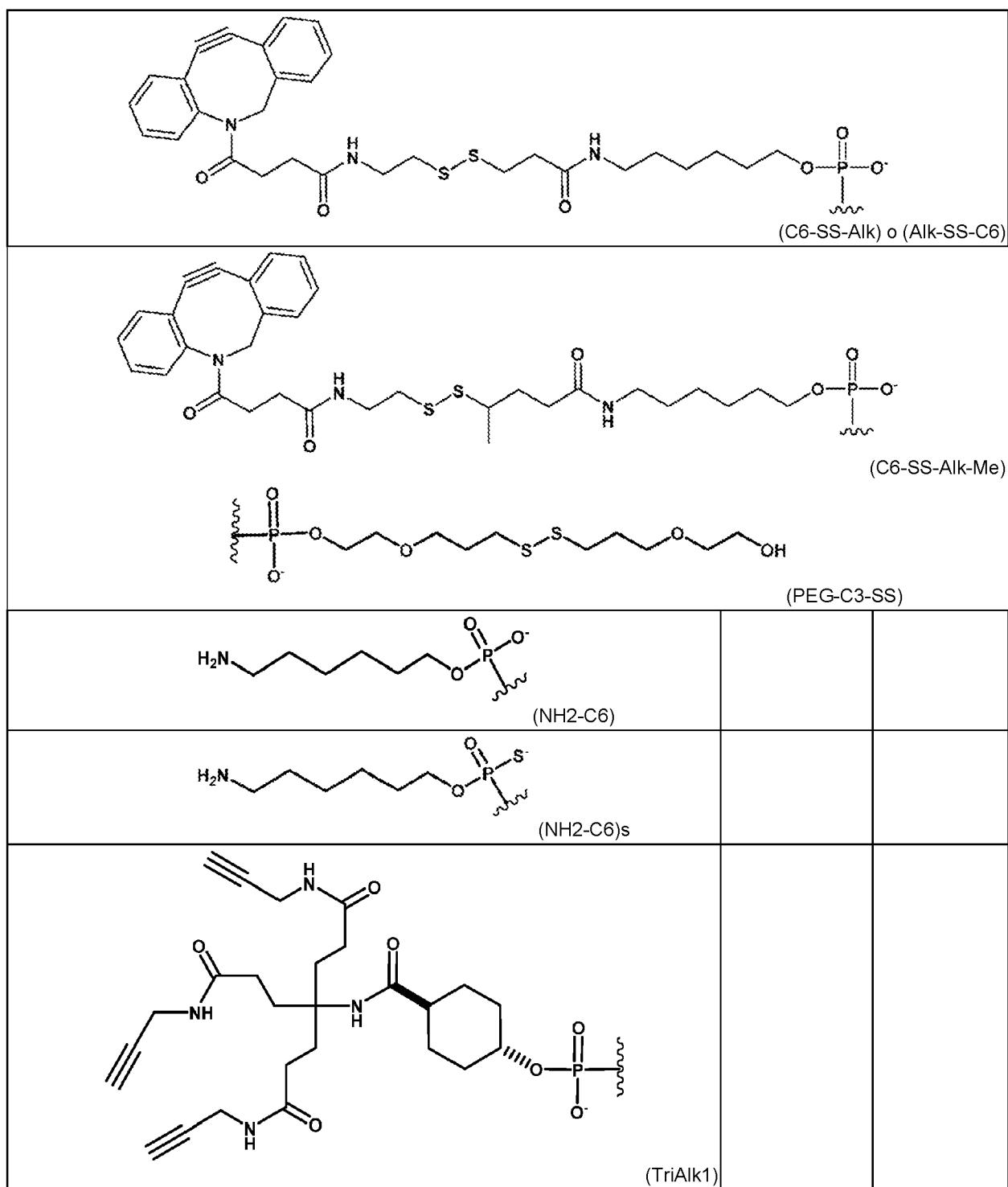
- 5 Los medicamentos que contienen un ligando de integrina  $\alpha\beta 3$  también son un objeto de la presente invención, al igual que los procesos para la fabricación de dichos medicamentos, procesos que comprenden llevar uno o más compuestos que contienen un ligando de integrina  $\alpha\beta 3$  y, si se desea, una o más sustancias con un beneficio terapéutico conocido, a una forma farmacéuticamente aceptable.
- 10 Los ligandos de integrina descritos y las composiciones farmacéuticas que comprenden los ligandos de integrina descritos en la presente memoria pueden envasarse o incluirse en un kit, recipiente, paquete o dispensador. Los ligandos de integrina y las composiciones farmacéuticas que comprenden los ligandos de integrina pueden envasarse en jeringas o viales precargados.
- 15 Grupos de enlace, potenciadores farmacocinéticos (FC), moduladores farmacodinámicos (FD), vehículos de administración y grupos que se pueden dirigir a diana
- En algunas realizaciones, un ligando de  $\alpha\beta 3$  se conjuga con uno o más grupos no nucleotídicos que incluyen, pero no se limitan a, un grupo de unión, un potenciador farmacocinético (FC) (también denominado modulador FC), un modulador farmacodinámico (FD), un polímero de administración o un vehículo de administración. El grupo no nucleotídico puede mejorar la capacidad de dirigirse a grupos, el suministro o la unión de la molécula de carga. En la presente memoria se describen ejemplos de esqueletos para dirigirse a grupos y grupos de unión. El grupo no nucleotídico puede estar unido covalentemente al extremo 3' y/o 5' de la cadena de sentido y/o la cadena antisentido. En realizaciones donde la molécula de carga es un agente de ARNi, el agente de ARNi contiene un grupo no nucleotídico unido al extremo 3' y/o 5' de la cadena de sentido. En algunas realizaciones, un grupo no nucleotídico está unido al extremo 5' de una cadena de sentido del agente de ARNi. Un ligando de integrina descrito en la presente memoria puede unirse directa o indirectamente a la molécula de carga a través de un enlazador/grupo de unión. En algunas realizaciones, un ligando de integrina está unido a la molécula de carga a través de una unión o enlazador lábil, escindible o reversible.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- En algunas realizaciones, un grupo no nucleotídico mejora las propiedades farmacocinéticas o de biodistribución de un agente de ARNi o conjugado al que está unido para mejorar la distribución específica de célula o tejido y la captación específica de célula del agente de ARNi o conjugado. En algunas realizaciones, un grupo no nucleotídico mejora la endocitosis del agente de ARNi. En algunas realizaciones, un grupo no nucleotídico mejora o modula las propiedades farmacodinámicas de un agente de ARNi o conjugado al que está unido para mejorar la distribución específica de células o tejidos y la captación específica de células del agente de ARNi o conjugado.
- Los grupos o restos que se pueden dirigir a diana mejoran las propiedades farmacocinéticas o de biodistribución de una molécula de carga a la que están unidos para mejorar la distribución específica de la célula (incluida, en algunos casos, específica del órgano) y la captación específica de la célula (o específica del órgano) de la molécula de carga. En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana puede comprender un ligando de  $\alpha\beta 3$  como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana comprende un enlazador. En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana comprende un potenciador de la FC. En algunas realizaciones, un ligando de integrina  $\alpha\beta 3$  se une a una molécula de carga usando un ligando, tal como un enlazador de PEG o uno, dos o tres residuos abásicos y/o de ribitol (ribosa abásica), que en algunos casos pueden servir como enlazadores. Los grupos que se pueden dirigir a diana pueden comprender uno o más ligandos que se pueden dirigir a diana. En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana puede comprender de uno a cuatro ligandos de integrina descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, un grupo que se puede dirigir a diana es un grupo que se puede dirigir a diana tridentado y comprende tres ligandos de integrina descritos en la presente memoria.
- Las moléculas de carga se pueden sintetizar con un grupo reactivo, tal como un grupo amino (también denominado amina en la presente memoria). En realizaciones donde la molécula de carga es un agente de ARNi, el grupo reactivo puede estar unido en el extremo 5' y/o el extremo 3'. El grupo reactivo se puede usar posteriormente para unir un ligando de integrina  $\alpha\beta 3$  usando métodos típicos en la técnica.
- Por ejemplo, en algunas realizaciones, se sintetiza un agente de ARNi que tiene un grupo  $\text{NH}_2\text{-C}_6$  en el extremo 5' de la cadena de sentido del agente de ARNi. Posteriormente, el grupo amino terminal se puede hacer reaccionar para formar un conjugado con, por ejemplo, un grupo que incluye un ligando dirigido a integrina. En algunas realizaciones, se sintetiza un agente de ARNi que tiene uno o más grupos alquino en el extremo 5' de la cadena de sentido del agente de ARNi. El(es) grupo(s) alquino terminal(es) se puede(n) hacer reaccionar posteriormente para formar un conjugado con, por ejemplo, un grupo que incluye un ligando dirigido a integrina  $\alpha\beta 3$ .
- En algunas realizaciones, un grupo de unión se conjuga con el ligando de  $\alpha\beta 3$ . El grupo de unión facilita el enlace covalente del ligando de  $\alpha\beta 3$  a una molécula de carga, potenciador de la FC, polímero de suministro o vehículo de suministro. Los ejemplos de grupos de unión incluyen, pero no se limitan a: Alk-SMPT-C6, Alk-SS-C6, DBCO-TEG, Me-Alk-SS-C6 y C6-SS-Alk-Me, grupos reactivos tales como aminas primarias y alquinos, grupos alquilo, residuos/nucleótidos abásicos, aminoácidos, grupos funcionalizados con tri-alquino, ribitol y/o grupos PEG.

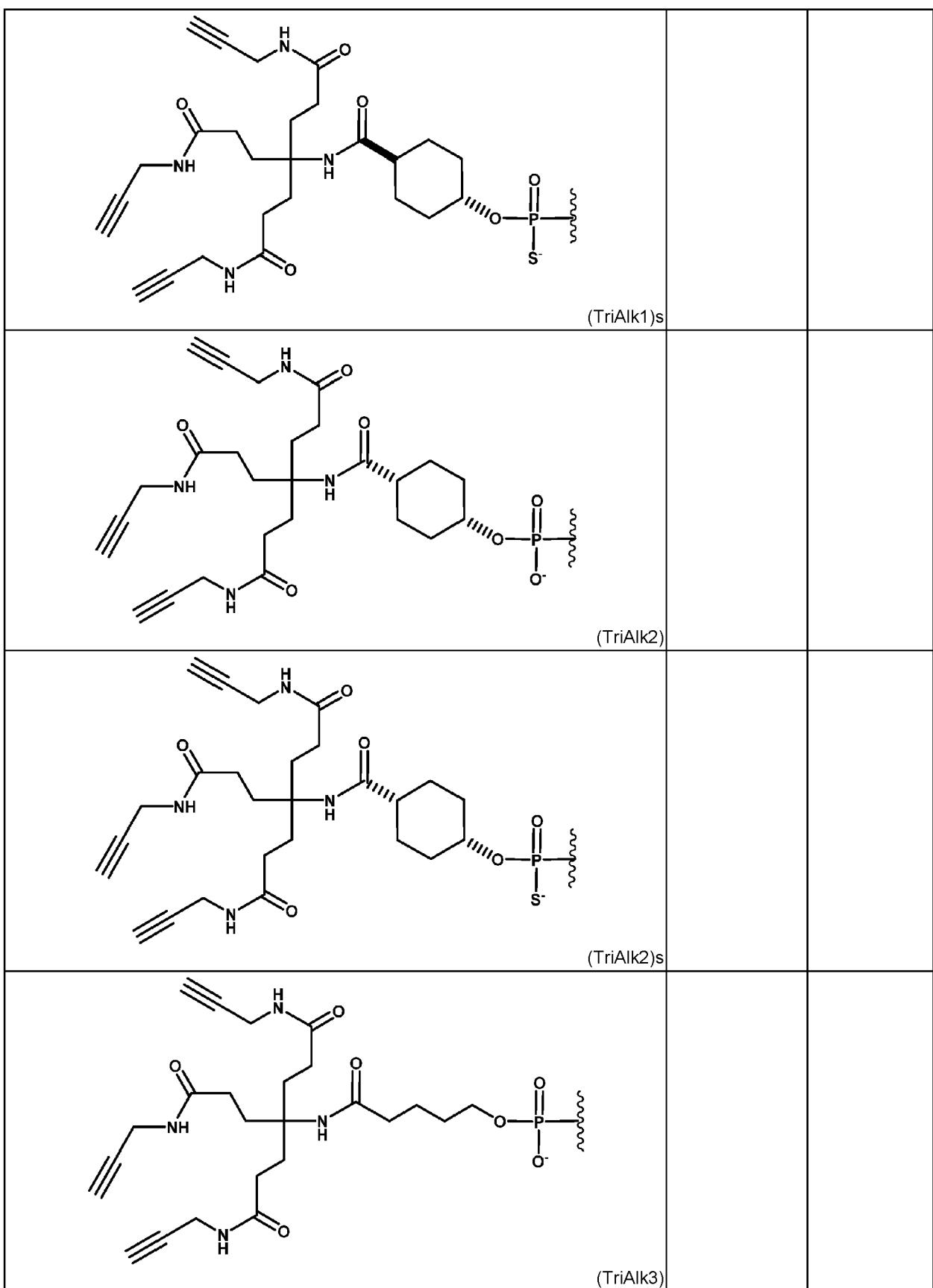
- 5 Un enlazador o grupo de unión es una conexión entre dos átomos que une un grupo químico (tal como un agente de ARNi) o segmento de interés a otro grupo químico (tal como un ligando de integrina av $\beta$ 3, potenciador de la FC, modulador de la FD o polímero de suministro) o segmento de interés a través de uno o más enlaces covalentes. Un enlace lábil contiene una unión lábil. Un enlace puede incluir opcionalmente un espaciador que aumente la distancia entre los dos átomos unidos. Un espaciador puede añadir además flexibilidad y/o longitud al enlace. Los espaciadores incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos arilo, grupos aralquilo, grupos aralquenilo y grupos aralquinilo; cada uno de los cuales puede contener uno o más heteroátomos, heterociclos, aminoácidos, nucleótidos y sacáridos. Los grupos espaciadores son bien conocidos en la técnica y la lista anterior no pretende limitar el alcance de la descripción.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, los ligandos av $\beta$ 3 están unidos a moléculas de carga sin el uso de un enlazador adicional. En algunas realizaciones, el ligando de av $\beta$ 3 se diseña con un enlazador fácilmente presente para facilitar el enlace a una molécula de carga. En algunas realizaciones, cuando se incluyen dos o más agentes de ARNi en una composición, los dos o más agentes de ARNi pueden unirse a sus respectivos grupos que se pueden dirigir a diana usando los mismos enlazadores. En algunas realizaciones, cuando se incluyen dos o más agentes de ARNi en una composición, los dos o más agentes de ARNi se unen a sus respectivos grupos que se pueden dirigir a diana usando diferentes enlazadores.
- 20

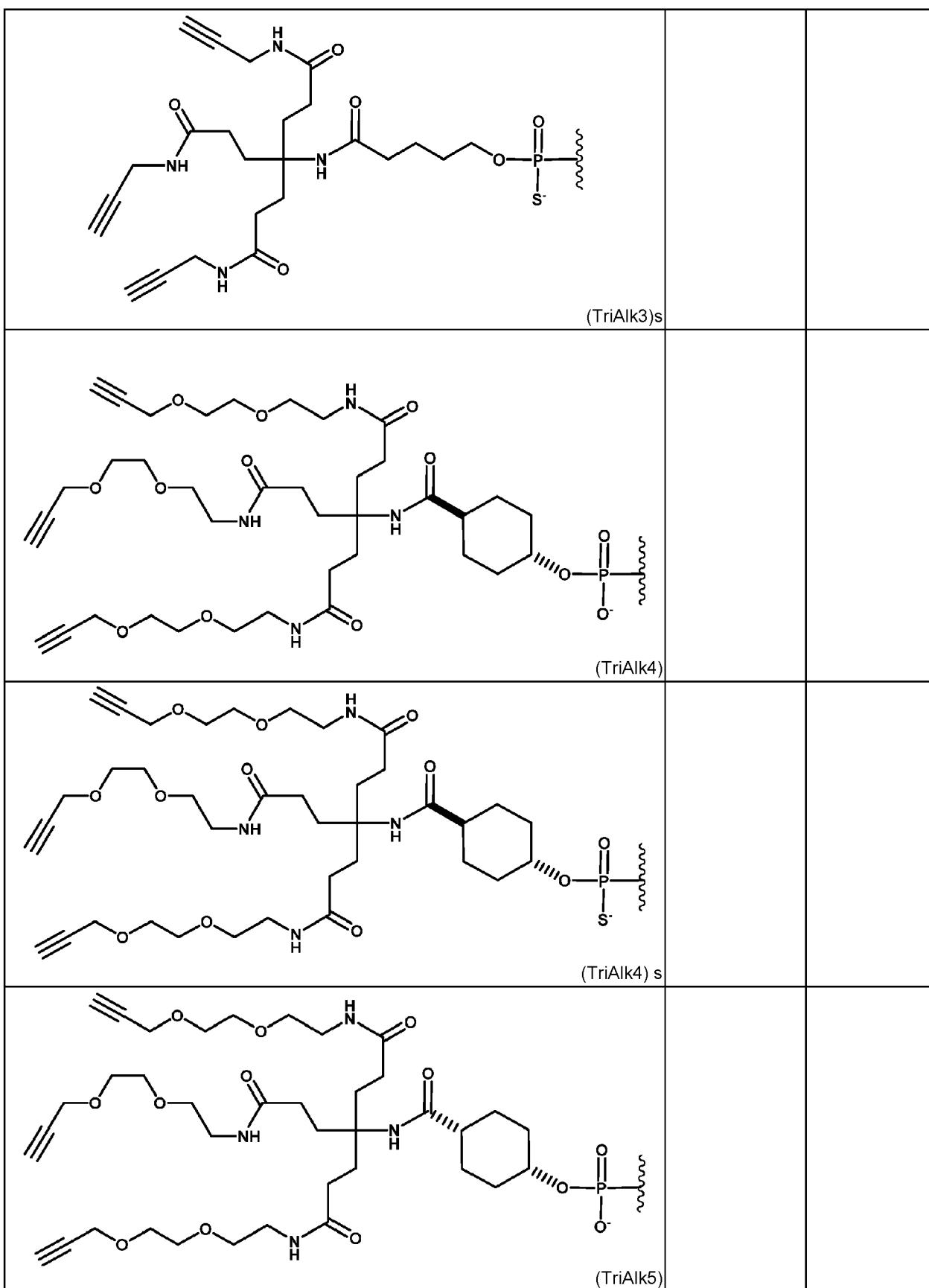
En la Tabla A se proporcionan ejemplos de determinados grupos de unión y esqueletos.

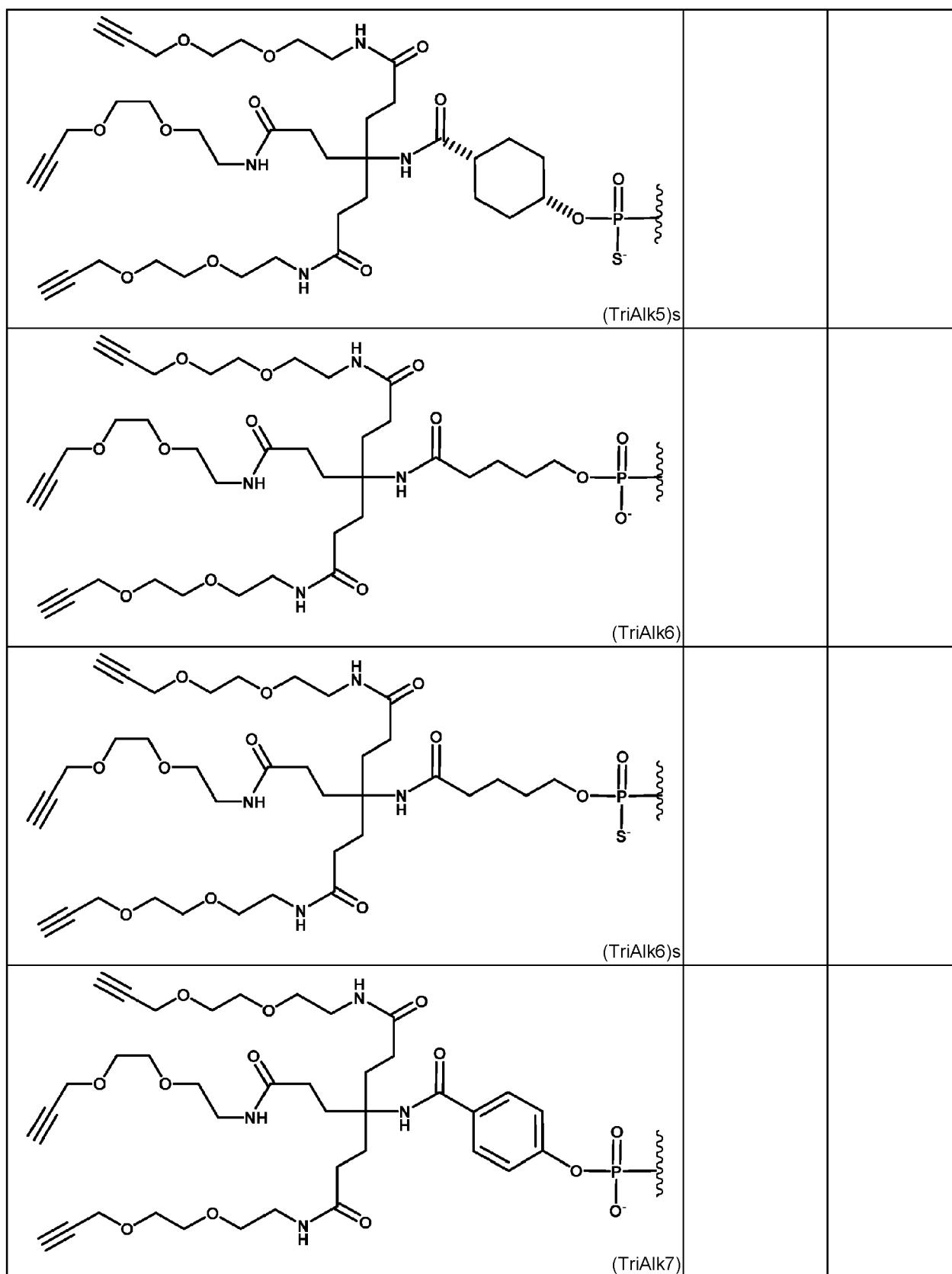
- 25 Tabla A. Estructuras que representan diversos grupos de unión y esqueletos

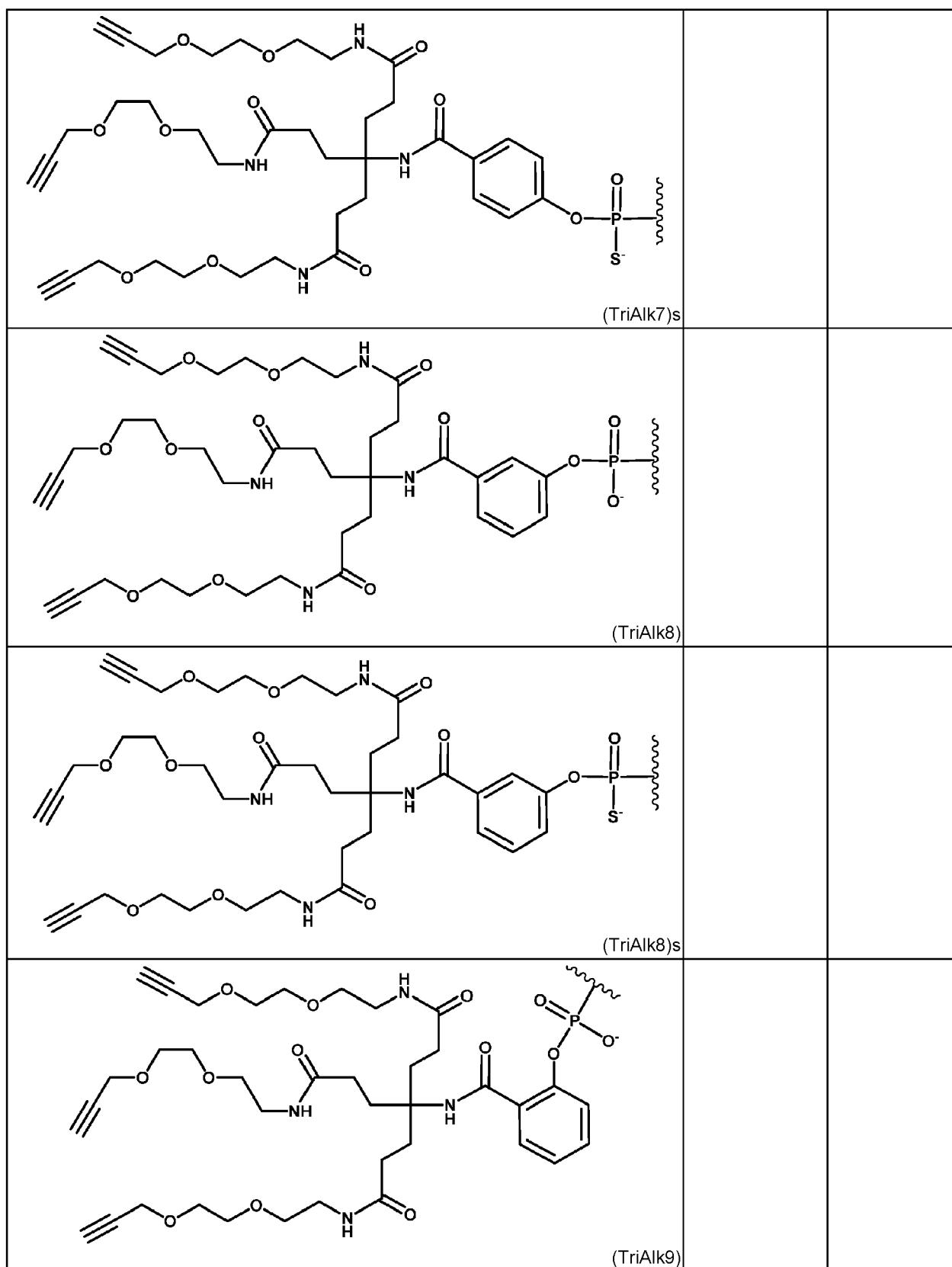
 (PAZ)		
Cuando se coloca en el extremo 3' terminal del oligonucleótido:		
 (C6-SS-C6)		
Cuando se coloca internamente en el oligonucleótido:		
	Enlace hacia el extremo 5' del oligonucleótido	Enlace hacia el extremo 3' del oligonucleótido
 (C6-SS-C6)		
Cuando se coloca en el extremo 3' terminal del oligonucleótido:		
Cuando se coloca internamente en el oligonucleótido:		
	Enlace hacia el extremo 5' del oligonucleótido	Enlace hacia el extremo 3' del oligonucleótido
 (6-SS-6)		

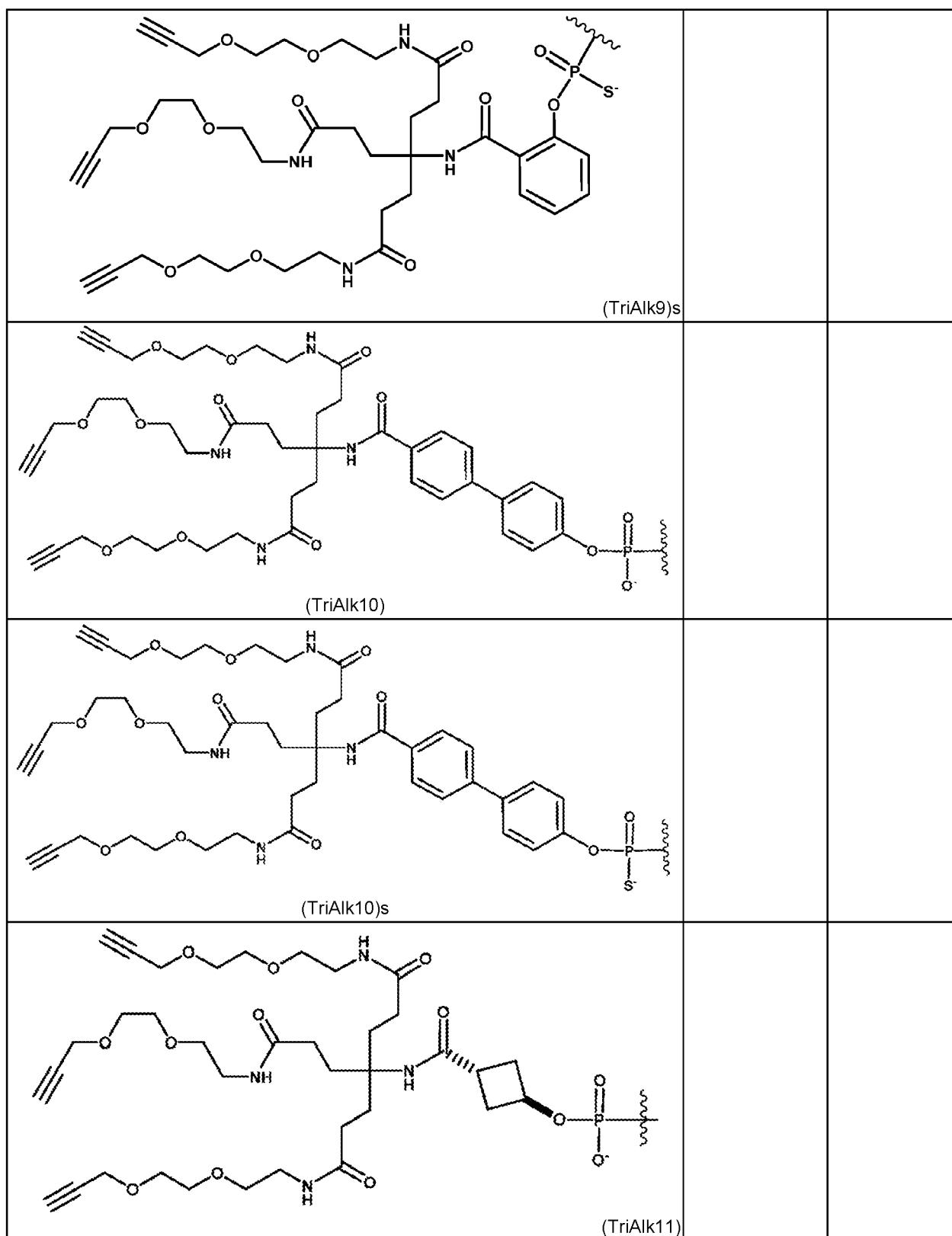


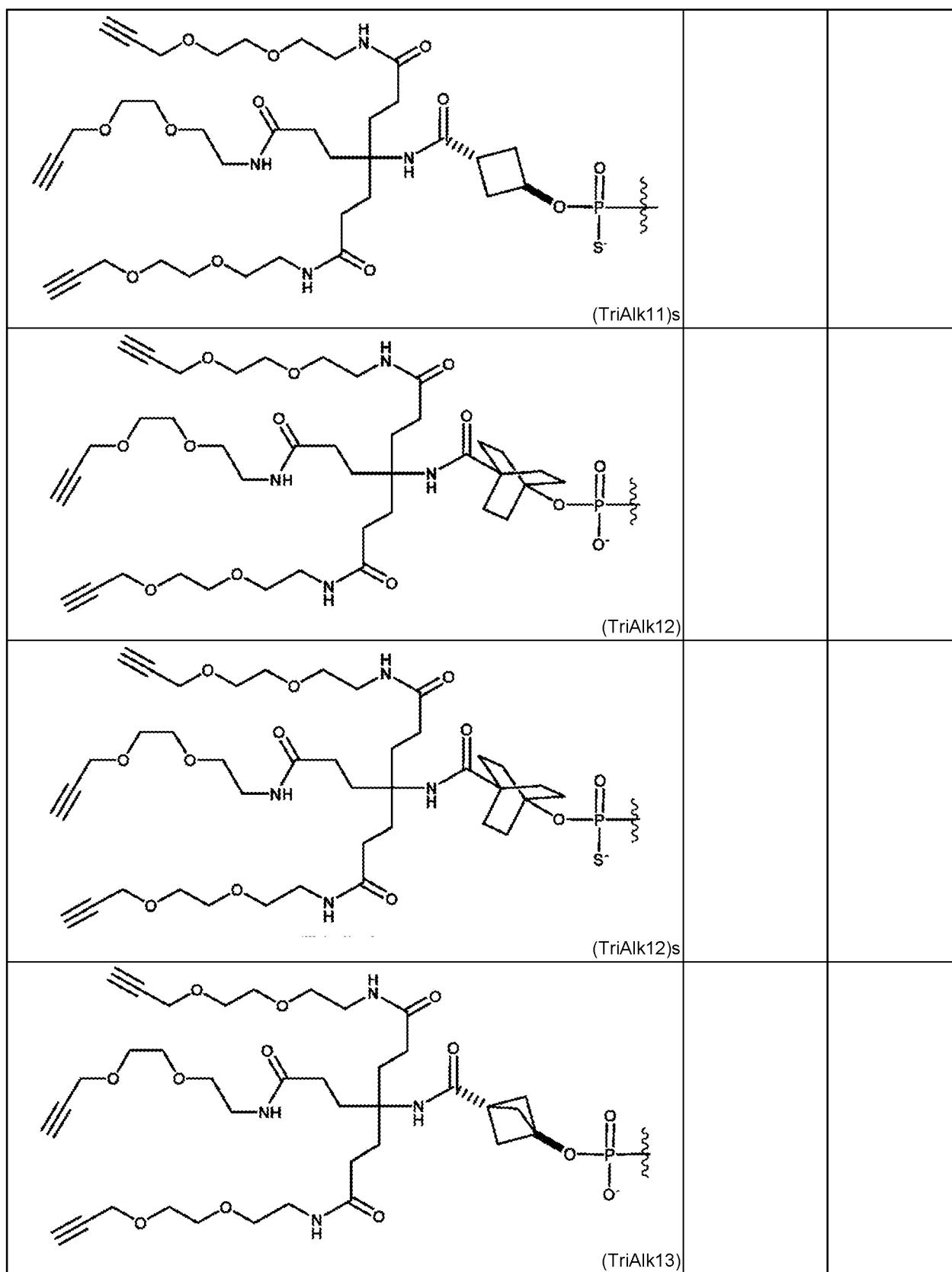


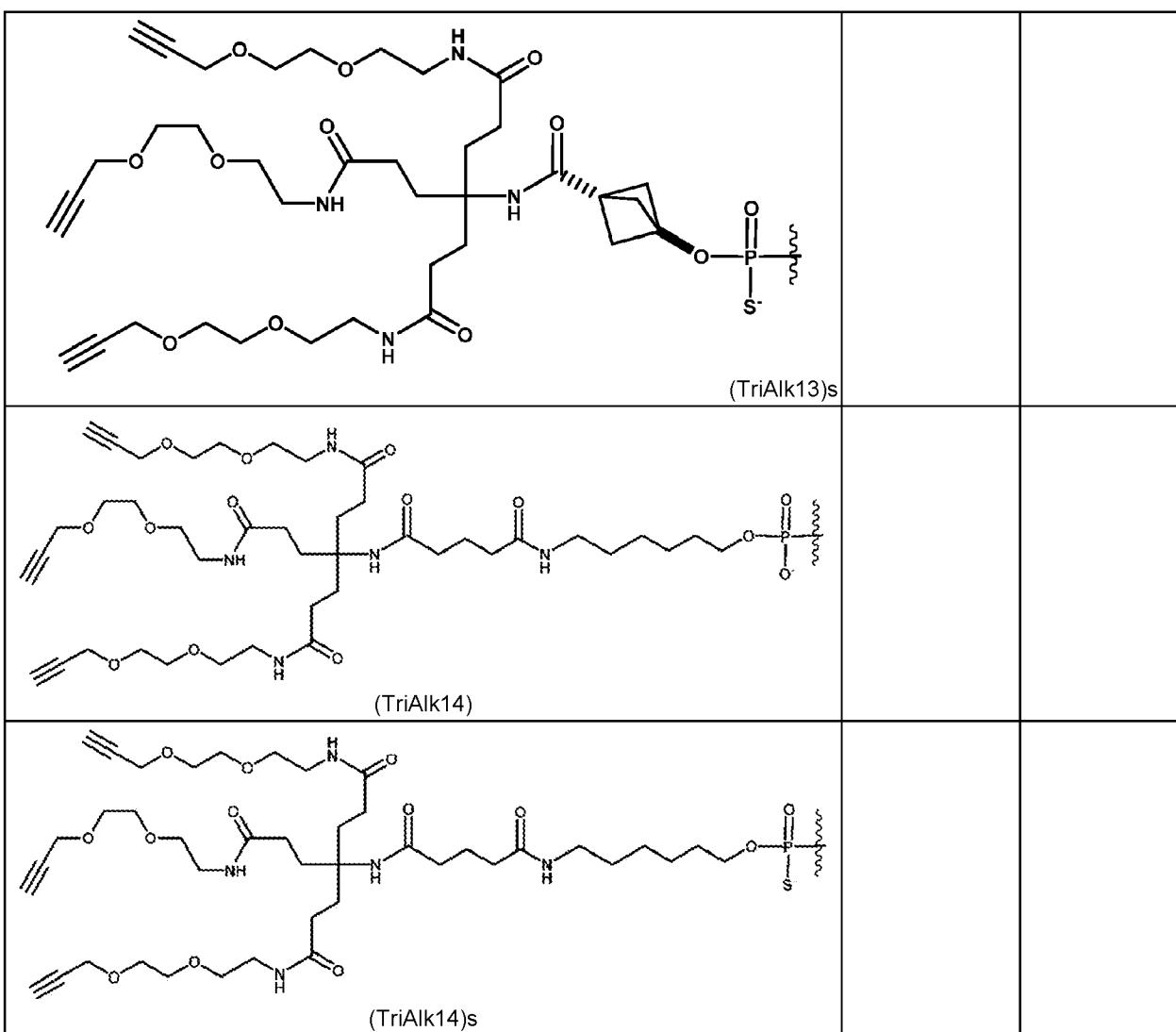












5

en donde indica el punto de unión a una molécula de carga.

Alternativamente, se pueden usar otros grupos de unión conocidos en la técnica. Se proporcionan ejemplos de grupos de unión adecuados en la solicitud PCT n.º PCT/US19/18232.

10

Las realizaciones y elementos proporcionados anteriormente se ilustran ahora con los siguientes ejemplos no limitativos.

15

Ligandos que se pueden dirigir a diana enlazados internamente

15

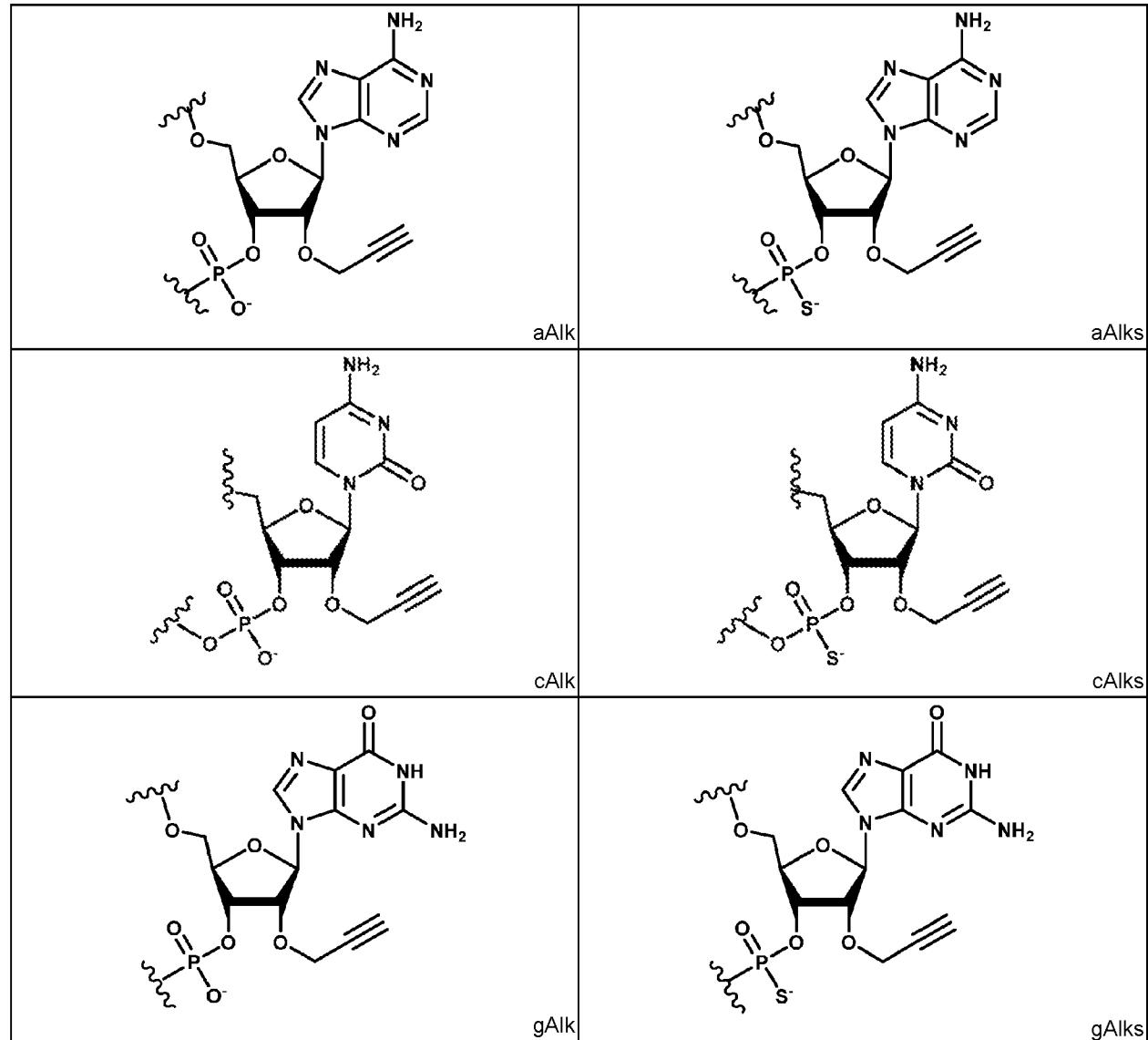
En algunas realizaciones, cuando los ligandos dirigidos a integrina descritos en la presente memoria se unen o enlazan a una molécula de ARNi, el ligando dirigido a integrina puede unirse a nucleótidos internos de la cadena de sentido o la cadena antisentido. En algunas realizaciones, se pueden conjugar hasta 15 ligandos que se pueden dirigir a diana a nucleótidos internos en la cadena de sentido de un agente de ARNi. En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 ligandos que se pueden dirigir a diana pueden conjugarse con nucleótidos internos en la cadena de sentido de un agente de ARNi alfa de HIF-2. En algunas realizaciones, de 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) ligandos que se pueden dirigir a diana se conjugan con nucleótidos internos en la cadena de sentido de un agente de ARNi. En algunas realizaciones, de 3 a 4 ligandos que se pueden dirigir a diana se conjugan con nucleótidos internos en la cadena de sentido de un agente de ARNi.

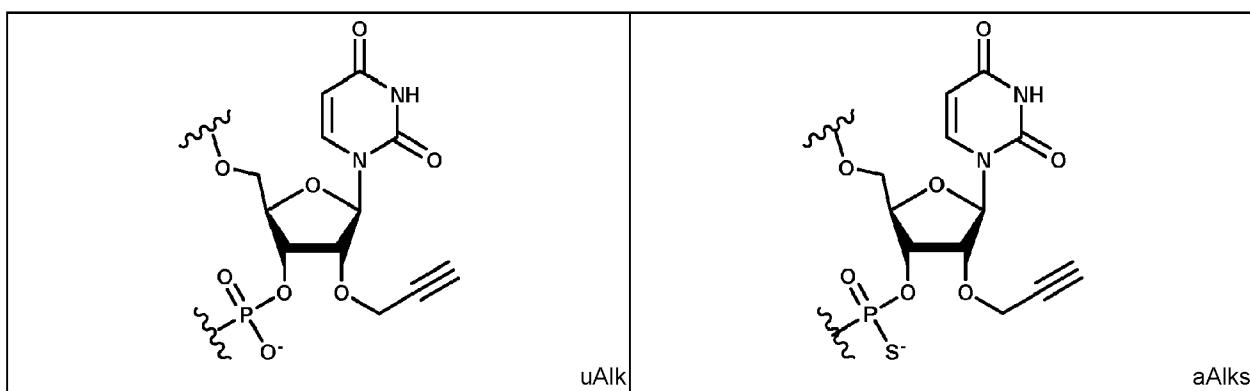
25

En algunas realizaciones, la colocación de ligandos que se pueden dirigir a diana internos puede afectar la eficacia o potencia de un agente de ARNi. En algunas realizaciones de ligandos dirigidos a integrinas  $\alpha\beta 3$  unidos a agentes de ARNi, un grupo que se puede dirigir a diana se conjuga con el extremo 5' de la cadena de sentido, y al menos 10 nucleótidos se colocan entre el grupo que se puede dirigir a diana tridentado ubicado en el extremo 5' de la cadena

- 5 de sentido y el siguiente ligando que se puede dirigir a diana más cercano ubicado en la cadena de sentido. En algunas realizaciones, al menos 5 nucleótidos se colocan entre el grupo que se puede dirigir a diana tridentado ubicado en el extremo 5' de la cadena de sentido y el siguiente ligando que se puede dirigir a diana más cercano ubicado en la cadena de sentido.
- 10 En algunas realizaciones donde dos o más ligandos que se pueden dirigir a diana se conjugan con nucleótidos internos ubicados en la cadena de sentido de un agente de ARNi, hay un espacio de al menos un nucleótido que no se conjuga con un ligando que se puede dirigir a diana ubicado entre los dos nucleótidos internos que se conjugan con ligandos que se pueden dirigir a diana. En algunas realizaciones donde dos o más ligandos que se pueden dirigir a diana se conjugan con la cadena de sentido de un agente de ARNi, al menos dos nucleótidos que no se conjuga con un ligando que se puede dirigir a diana se colocan entre dos nucleótidos internos que se conjugan con ligandos que se pueden dirigir a diana.
- 15 En algunas realizaciones, los ligandos que se pueden dirigir a diana se conjugan con los nucleótidos 2°, 4° y 6° de la cadena de sentido numerados desde 3' a 5', comenzando desde el nucleótido 3' más alejado que forma un par de bases con un nucleótido en la cadena antisentido. En algunas realizaciones, los ligandos que se pueden dirigir a diana se conjugan con los nucleótidos 2°, 4°, 6° y 8° (3'→5') del nucleótido terminal 3' en la cadena de sentido que forma un par de bases con la cadena antisentido.
- 20 Se muestran ejemplos de nucleótidos modificados para unir ligandos que se pueden dirigir a diana internos a continuación en la Tabla B:

Tabla B. Estructuras que representan nucleótidos modificados para unir ligandos que se pueden dirigir a diana.





5

**Ejemplos**

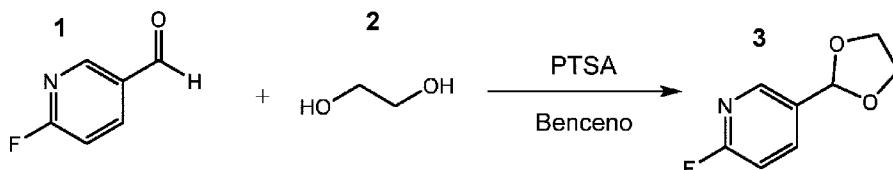
Los siguientes ejemplos no son limitativos y pretenden ilustrar determinadas realizaciones descritas en la presente memoria.

10

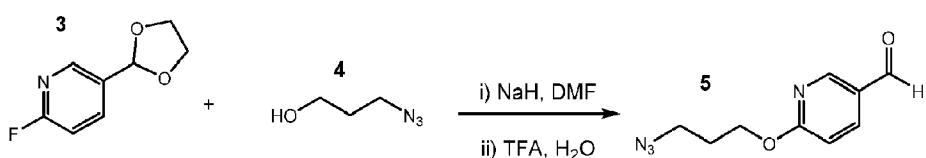
**Ejemplo 1. Síntesis de ligandos dirigidos a integrinas.**

Algunas de las abreviaturas utilizadas en los siguientes detalles experimentales de la síntesis de los ejemplos se definen de la siguiente manera: h o hr = hora(s); min = minuto(s); mol = mol(es); mmol = milimol(es); M = molar;  $\mu\text{M}$  = micromolar; g = gramo(s);  $\mu\text{g}$  = microgramo(s); ta o TA = temperatura ambiente; L = litro(s); ml = mililitro(s); wt = peso; EtZO = éter dietílico; THF = tetrahidrofuran; DMSO = sulfóxido de dimetilo; EtOAc = acetato de etilo; Et<sub>3</sub>N o TEA = trietilamina; i-Pr<sub>2</sub>NEt o DIPEA o DIEA = diisopropiletilamina; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o DCM = cloruro de metileno; CHCl<sub>3</sub> = cloroformo; CDCl<sub>3</sub> = cloroformo deuterado; CCl<sub>4</sub> = tetracloruro de carbono; MeOH = metanol; EtOH = etanol; DMF = dimetilformamida; BOC = t-butoxicarbonilo; CBZ = benciloxicarbonilo; TBS = t-butildimetilsililo; TBSCl o TBDMSCl = cloruro de t-butildimetilsililo; TFA = ácido trifluoroacético; DMAP = 4-dimetilaminopiridina; NaN<sub>3</sub> = azida de sodio; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = sulfato de sodio; NaHCO<sub>3</sub> = bicarbonato de sodio; NaOH = hidróxido de sodio; MgSO<sub>4</sub> = sulfato de magnesio; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = carbonato de potasio; KOH = hidróxido de potasio; NH<sub>4</sub>OH = hidróxido de amonio; NH<sub>4</sub>Cl = cloruro de amonio; SiO<sub>2</sub> = sílice; Pd-C = paladio sobre carbono; HCl = cloruro de hidrógeno o ácido clorhídrico; NMM = N-metilmorfolina; H<sub>2</sub> = gas hidrógeno; KF = fluoruro de potasio; EDC-HCl = clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; MTBE = metil-terc-butil éter; MeOH = metanol; Ar = argón; N<sub>2</sub> = nitrógeno; SiO<sub>2</sub> = sílice; R<sub>T</sub> = tiempo de retención; PTS = ácido para-toluenosulfónico; PPTS = para-toluenosulfonato de piridinio. 1 psi = 6894,76 Pa, 1 atm = 101325 Pa.

Síntesis de la estructura 1c (ácido (S)-3-(6-((1-azido-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azanonadecan-19-il)oxi)piridin-3-il)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanoico).



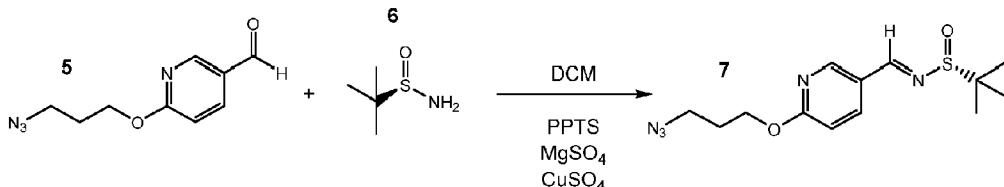
Una mezcla que contenía el compuesto 1 (1,03 g, 8,23 mmol), el compuesto 2 (0,92 g 14,8 mol) y el hidrato de PTSA (156 mg, 0,82 mmol) en benceno (25 ml) se sometió a refluo en un aparato Dean Stark durante la noche. A la mañana siguiente, la mezcla de reacción se vertió en bicarbonato de sodio saturado y posteriormente se añadió acetato de etilo. La fase orgánica se separó, se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró para proporcionar el compuesto 3 con un rendimiento del 95 %, que se usó posteriormente sin purificación adicional.



A una solución que contenía el compuesto 4 (5,39 g, 53,3 mmol) y tamices moleculares de 3 Å en DMF (100 ml) se añadió hidruro de sodio (60 % en peso, 2,13 g, 53,3 mmol) y la reacción se agitó durante 1 hora. Posteriormente se añadió una solución del compuesto 3 (7,52 g, 7,52 g) en DMF (20 ml) y la suspensión se calentó a 80 °C durante la noche. Una vez completada, la suspensión se filtró sobre un tapón de algodón y se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre éter dietílico y agua, y la fase orgánica se separó, se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró

5 a presión reducida. El residuo se trató con 20 ml de H<sub>2</sub>O al 10 % en TFA y se agitó durante 30 minutos. Al finalizar, la solución se enfrió a 0 °C y el pH se ajustó a 11 con NaOH 6 M, tras lo cual el producto precipitó como un aceite. El compuesto 5 se extrajo tres veces de la suspensión oleosa con éter dietílico. Las fases orgánicas se combinaron, se filtraron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El compuesto 5 se aisló después con un rendimiento del 26 % mediante separación sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

10

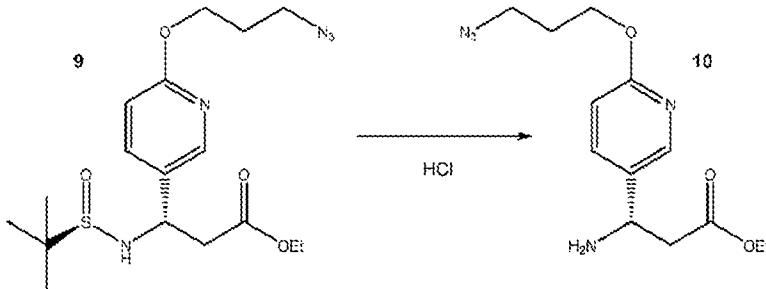


15 Se calentó una mezcla que contenía el compuesto 5 (2,29 g, 9,94 mmol), el compuesto 6 (4,82 g, 39,8 mmol), PPTS (125 mg, 0,50 mmol), sulfato de magnesio (3 g, 24,9 mmol), sulfato de cobre (3,97 g, 24,9 mmol) y tamices moleculares de 3 angstrom en DCM (22 ml) a reflujo durante la noche. Al finalizar, la mezcla se filtró y se concentró a presión reducida. El compuesto 7 se aisló después con un rendimiento del 76 % mediante separación sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos.

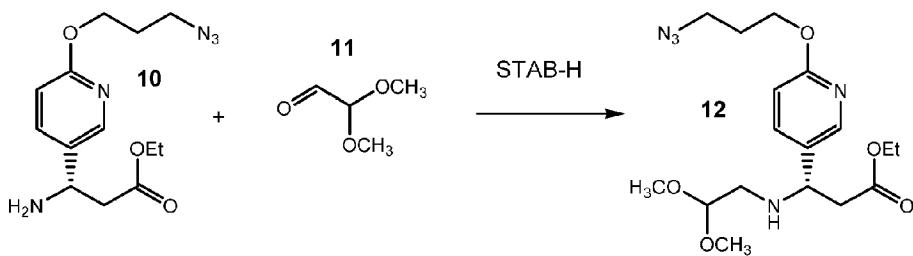
20

Un matraz secado a la llama se cargó con THF (40 ml) y diisopropilamina (2,29 g, 22,6 mmol). Se enfrió a -20 °C y se añadió n-BuLi (2,5 M, 8,64 ml, 21,6 mmol) mediante una cánula. La solución se agitó durante 10 minutos a -20 °C y a continuación se enfrió a -78 °C. Se añadió el compuesto 8 (2,02 ml, 20,6 mmol) gota a gota con agitación vigorosa. Despues de la adición, la solución se agitó durante 30 min a -78 °C. A continuación, se añadió ClTi(iPrO)<sub>3</sub> (11,26 g, 43,2 mmol) como una solución en THF (10 ml) a través de un embudo de adición durante aproximadamente 10 minutos con agitación vigorosa. La reacción se agitó durante 30 minutos a -78 °C. Finalmente, el compuesto 7 (2,29 g, 6,86 mmol) se añadió gota a gota como una suspensión en THF y se agitó a -78 °C durante 1,25 horas hasta que se completó la reacción. A la reacción a -78 °C se añadió cloruro de amonio acuoso saturado. A continuación, la reacción se retiró del enfriamiento y la fase acuosa se dejó descongelar gradualmente y se inactivó (desaparece el color amarillo anaranjado). La mezcla se repartió entre EtOAc y cloruro de amonio acuoso saturado. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo dos veces con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron y se secaron sobre salmuera, luego sobre sulfato de sodio, y luego se filtraron y concentraron. El residuo se purificó sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos. El compuesto 9 se obtuvo con un rendimiento del 75 % como diastereómero individual después de la purificación.

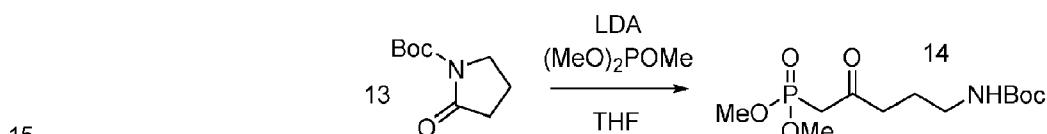
35



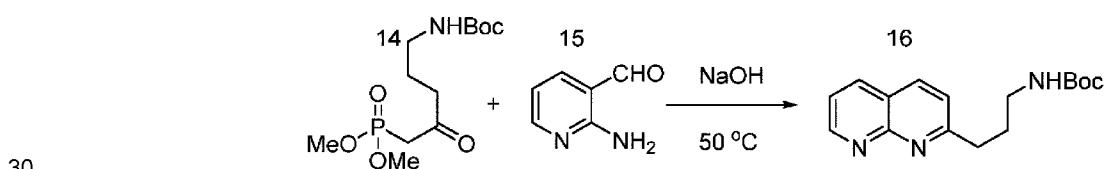
40 El compuesto 9 (1,28 g, 3,21 mmol) en MeOH (3,2 ml) se trató con HCl en dioxano (4 M, 3,2 ml, 12,9 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez completada, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se lavó con éter dietílico. Posteriormente, el pH se ajustó a 11 usando NaOH acuoso 2 N y el producto se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró, proporcionando el compuesto 10 con un rendimiento del 92 %, que posteriormente se utilizó sin purificación adicional.



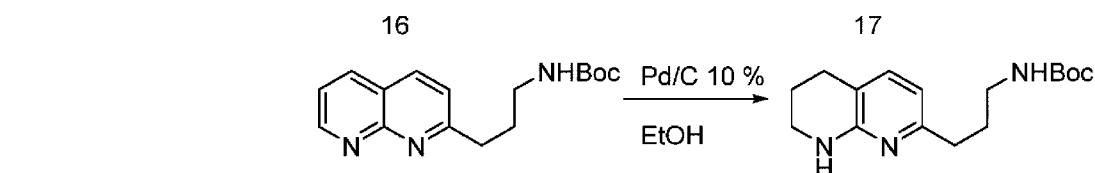
A la mezcla del compuesto 10 (0,78 g, 2,67 mmol) y el compuesto 11 (0,60 g, 3,46 mmol) en THF (6 ml) a 15 °C se le añadió STAB-H (1,29 g, 6,12 mmol) en partes como un sólido. Después de la adición, se retiró el enfriamiento y la mezcla se agitó durante aproximadamente 2,5 horas hasta completarse. La reacción se inactivó mediante la adición de bicarbonato de sodio acuoso saturado y el pH se llevó a 9. El producto se extrajo tres veces con EtOAc, las fases orgánicas se combinaron, se secaron con salmuera, luego se filtraron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El compuesto 12 se aisló con un rendimiento del 85 % mediante separación en sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos.



A DIPEA (7,53 ml, 53,75 mmol) en THF (35 ml) se añadió n-BuLi (2,5 M, 19,9 ml, 49,8 mmol) mediante una jeringa hermética al gas secada en horno durante 2 minutos a -10 °C. La mezcla se agitó durante 10 minutos a -10 °C, después se enfrió a -60 °C y se añadió gota a gota una solución de metilfosfonato de dimetilo (6,42 g, 51,8 mmol) en THF (8 ml) durante 5-10 minutos. Tras envejecer a -60 °C durante aproximadamente 1 hora, se añadió gota a gota el compuesto 13 (7,37 g, 39,82 mmol) en forma de solución en THF (15 ml) durante 5 minutos a -60 °C. La mezcla de reacción se agitó a -60 °C durante 1 hora y después a -41 °C durante aproximadamente 1,5 horas. La reacción se inactivó mediante la adición de 2,6 equivalentes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0 M) y se extrajo tres veces con acetato de etilo (~50 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con salmuera, se filtraron sobre sulfato de sodio y se concentraron brevemente para determinar el peso bruto y tomar una muestra para RMN. Tras la determinación del peso seco, el compuesto 14 se disolvió en MeOH para su uso en la siguiente reacción sin purificación adicional. Se calcula que tiene un rendimiento del 75,83 %. % p/p bruto 76,3 % mediante RMN. <sup>1</sup>H RMN: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> δ 4,75 (s, 1 H), 3,81 (s, 3 H), 3,78 (s, 3 H), 3,10 - 3,14 (m, 2 H), 3,04 - 3,09 (m, 2 H), 2,68 (t, 2 H), 1,82-1,75 (m, 2 H), 1,44 (s, 9 H).

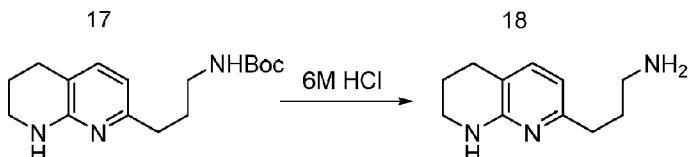


Al compuesto 14 (9,33 g en peso a partir de la RMN de ~12 g bruto, 30,16 mmol) en MeOH (40 ml), se le añadió una solución de NaOH (1,45 g, 36,2 mmol) en agua (1,5 ml). La mezcla se calentó a 50 °C y se añadió el compuesto 15 (2,76 g, 22,62 mmol). Despues de agitar durante 30 minutos, se añadió una segunda porción del compuesto 15 (736 mg, 6,03 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a 50 °C. Luego, la mezcla de reacción se concentró hasta obtener un aceite y se repartió entre 2 volúmenes de EtOAc y 1 volumen de H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se separó y se lavó con 1 volumen de agua. Los lavados acuosos se combinaron y se volvieron a extraer (2 veces, 1 volumen) con EtOAc. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. La sustancia bruta se secó sobre aproximadamente 20 g de sílice. El compuesto 16 se aisló con un rendimiento del 69 % mediante separación sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos que contenían trietilamina al 1 %. <sup>1</sup>H RMN: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> δ 9,09 (dd, 1 H), 8,17 (dd, 1 H), 8,12 (d, 1 H), 7,46 (dd, 1 H), 7,41 (d, 1 H), 4,78 (s, 1 H), 3,24 (q, 2 H), 3,10 (t, 2 H), 2,12 (quin, 2 H), 1,43 (s, 9 H).

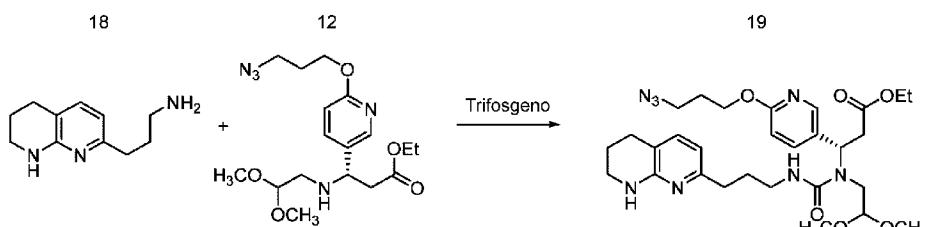


A una solución del compuesto 16 (5,98 g, 20,8 mmol) en EtOH (50 ml) se cargó con paladio (10 % sobre carbono, 2,22 g, 2,08 mmol) e hidrógeno a 1 atmósfera. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Al finalizar, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite® y se concentró. El compuesto 17 se aisló con un

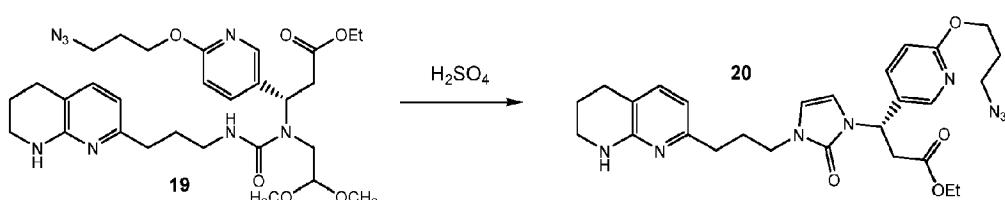
- rendimiento del 79 % mediante separación en sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos que contenía trietilamina al 1 %. **<sup>1</sup>H RMN:** 400 MHz CDCl<sub>3</sub> δ 7,05 (d, 1 H), 6,34 (d, 1 H), 5,48 (s, 1 H), 4,81 (s, 1 H), 3,36 - 3,43 (m, 2 H), 3,16 (q, 2 H), 2,68 (t, 2 H), 2,59 (t, 2 H), 1,90 (dt, 2 H), 1,83 (quin, 2 H), 1,44 (s, 9 H).



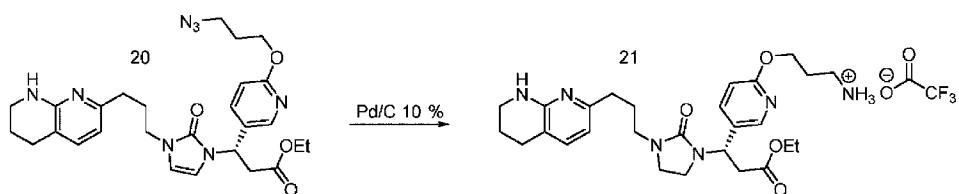
- 10 El compuesto 17 (4,81 g, 16,53 mmol) se disolvió en HCl acuoso 6 M (16,4 ml) y se calentó a 42 °C durante 2 horas.  
 15 Después se añadió una porción adicional de HCl 6 M (2,8 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas adicionales. A la reacción se añadió cloruro de sodio seguido de NaOH acuoso 2 N hasta que el producto precipitó en forma de un aceite (el pH fue superior a 12). La mezcla se extrajo tres veces con 2-butanol. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El compuesto 18 se obtuvo con un rendimiento del 85 % y posteriormente se usó sin purificación adicional. <sup>1</sup>H RMN: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> δ 7,06 (d, 1 H), 6,35 (d, 1 H), 4,83 (s, 1 H), 3,35 - 3,46 (m, 2 H), 2,75-2,67 (m, 4 H), 2,58 (t, 2 H), 1,88 - 1,95 (m, 2 H), 1,84-1,76 (m, 4 H).



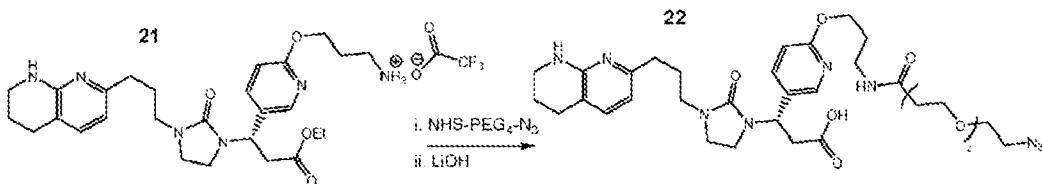
- 20 A una solución de trifosgeno (85 mg, 0,28 mmol) en THF (0,9 ml) en un matraz secado a la llama a -10 °C se añadió gota a gota una solución del compuesto 18 (236 mg, 0,62 mmol) y TEA (0,134 ml, 0,96 mmol) en THF (0,5 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. Después de que la TLC indicara que la reacción se había completado, se añadió TEA adicional (0,134 ml) seguido de la adición del compuesto 12 (166 mg, 0,87 mmol) en forma de un sólido. La mezcla heterogénea se calentó a 50 °C durante 2 horas con agitación vigorosa. Al finalizar, la mezcla de reacción se inactivó con 1 volumen de agua y se extrajo tres veces con EtOAc. La fase orgánica combinada se secó con salmuera, se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró. El compuesto 19 se obtuvo asumiendo un rendimiento del 100 % y posteriormente se usó sin purificación adicional.



- Al compuesto en bruto 19 (400 mg, 0,62 mmol asumidos) disuelto en THF (37 ml) se le añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(2M, 0,6 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A la mañana siguiente, se añadió una porción adicional de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,65 equivalentes). Cuatro horas más tarde, la reacción se completó. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se volvió a extraer una vez con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró. El compuesto 20 se aisló con un rendimiento del 75 % mediante separación sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM.

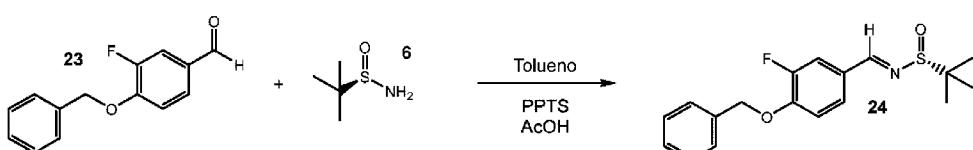


- A una suspensión del compuesto 20 (251 mg, 0,47 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 100 mg, 0,094 mmol) en etanol (9 ml) se cargó H<sub>2</sub> a 1 atmósfera y se agitó a 35 °C durante la noche. Al finalizar, el paladio se retiró mediante filtración sobre Celite®. El compuesto 21 se aisló con un rendimiento del 20 % como sal de TFA mediante HPLC de fase inversa usando una columna Cis 5u 19x250 mm BEH (Waters Corp.) eluyendo con un gradiente de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O que contenía TFA al 1 %.

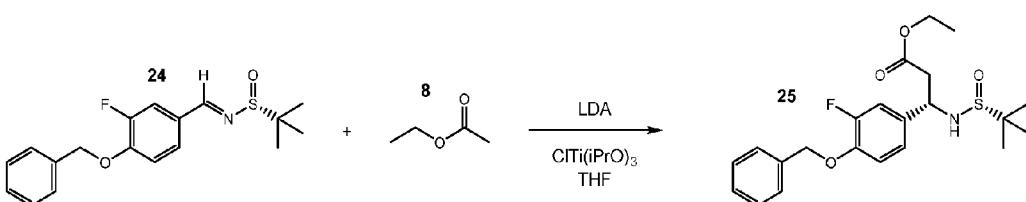


5 A una solución del compuesto 21 (61 mg, 0,097 mmol) en DCM (250 µL) se le añadió TEA (8 µL, 0,24 mmol) seguido de la adición de NHS-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (41,4 mg, 0,11 mmol) como una solución en DCM (275 µL). La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos y se comprobó la LC-MS, que mostró que la reacción se había completado. Se eliminaron todas las sustancias volátiles y el residuo se disolvió en EtOH (0,4 ml) y agua (0,4 ml). Se añadió LiOH (11,2 mg, 0,47 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 2 horas. Al finalizar, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El compuesto 22 (estructura 1c) se aisló con un rendimiento del 42 % mediante HPLC de fase inversa usando una columna Cis 5u 19x250 mm BEH (Waters Corp.) eluyendo con un gradiente de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O que contenía TFA al 1 %.

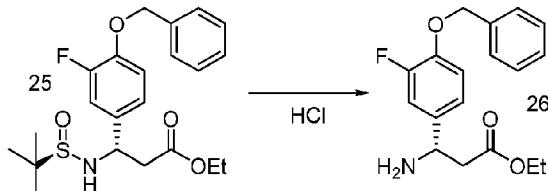
10 15 Síntesis de la estructura 2c) (ácido (S)-3-(4-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanoico).



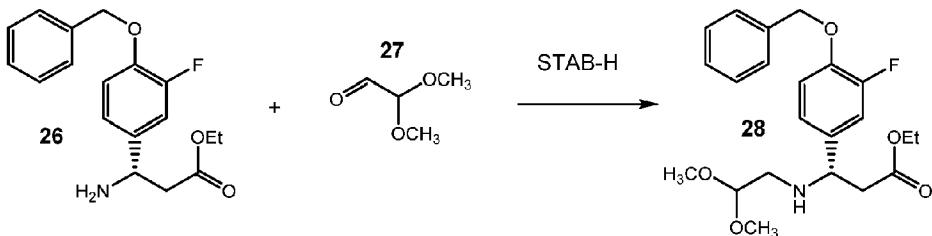
20 25 A una solución del compuesto 23 (10 g, 43,4 mmol) en tolueno (80 ml) se añadió el compuesto 6 (21,1 g, 0,17 mol), PPTS (0,55 g, 2,2 mmol) y después ácido acético (1,24 ml, 21,7 mmol). El recipiente de reacción se equipó con una trampa Dean Stark y después se sometió a refljo durante la noche. Una vez completada, la mezcla de reacción se concentró y se secó sobre 60 gramos de sílice y se purificó sobre SiO<sub>2</sub> con un gradiente de acetato de etilo en hexanos, proporcionando el compuesto 24 con un rendimiento del 66 %. <sup>1</sup>H RMN: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> δ 8,47 (s, 1 H), 7,68 (d, 1 H), 7,31 - 7,56 (m, 6 H), 6,98 - 7,16 (m, 1 H), 5,23 (s, 2 H), 1,26 (s, 9 H).



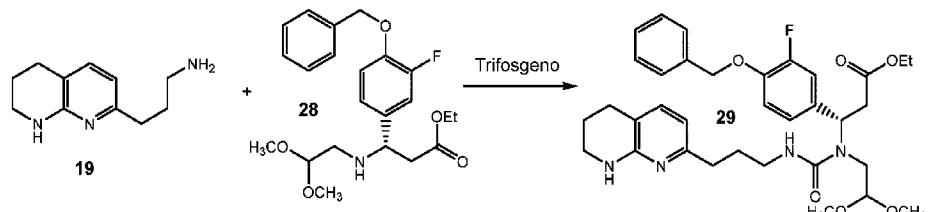
30 35 40 Se cargó un matraz secado a la llama con THF (190 ml) y DIPEA (9,07 g, 89,7 mmol), se enfrió a -20 °C y luego se cargó con n-BuLi (2,5 M, 34,2 ml, 85,6 mmol) a través de una cánula. La solución se agitó durante 10 minutos a -20 °C y a continuación se enfrió a -78 °C. El compuesto 8 (8 ml, 81,5 mmol) se añadió gota a gota con agitación vigorosa. Tras la adición, se agitó durante 30 minutos a -78 °C. A continuación, se añadió ClTi(iPrO)<sub>3</sub> (44,6 g, 0,171 mol) como solución en THF (40 ml) a través de un embudo de adición durante 10 minutos. La reacción se agitó durante 30 minutos a -78 °C. Finalmente, el compuesto 24 (9,06 g, 27,2 mmol) se añadió gota a gota como una suspensión en THF (20 ml) y se agitó a -78 °C durante 1,25 horas hasta que la reacción se completó. A la reacción a -78 °C se añadió cloruro de amonio acuoso saturado. A continuación, la reacción se retiró del enfriamiento y la fase acuosa se dejó descongelar gradualmente y se inactivó (desaparece el color amarillo anaranjado). La mezcla se repartió entre EtOAc y cloruro de amonio acuoso saturado. La fase orgánica se separó y la acuosa se lavó dos veces con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron y se secaron sobre salmuera, después sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El compuesto 25 se obtuvo con un rendimiento del 70 % como un diastereómero único mediante separación en sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos. <sup>1</sup>H RMN: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> δ 7,31 - 7,48 (m, 5 H), 7,09 (dd, 1 H), 6,89 - 7,04 (m, 2 H), 5,13 (s, 2 H), 4,59 - 4,76 (m, 2 H), 4,13 (q, 2 H), 2,81 (dd, 2 H), 1,21 - 1,25 (m, 12 H).



- 5 Al compuesto 25 (8,07 g, 19,1 mmol) se le añadió HCl acuoso (6M, 20,7 ml, 0,124 mol) seguido de MeOH (60 ml). Se añadió THF hasta que se obtuvo una solución homogénea y la mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se basificó a pH 10 con NaOH acuoso 2 N y luego se extrajo tres veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron con salmuera, se filtraron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El compuesto 26 se obtuvo con un rendimiento del 95 % y posteriormente se utilizó sin purificación adicional. **<sup>1</sup>H RMN:** 400 MHz CDCl<sub>3</sub> δ 7,28 - 7,46 (m, 6 H), 7,18 (d, 1 H), 6,99 (t, 1 H), 5,11 (s, 2 H), 4,57 (t, 1 H), 4,09 (q, 2 H), 2,97 - 3,09 (m, 1 H), 2,81 - 2,93 (m, 1 H), 1,18 (t, 3 H).
- 10

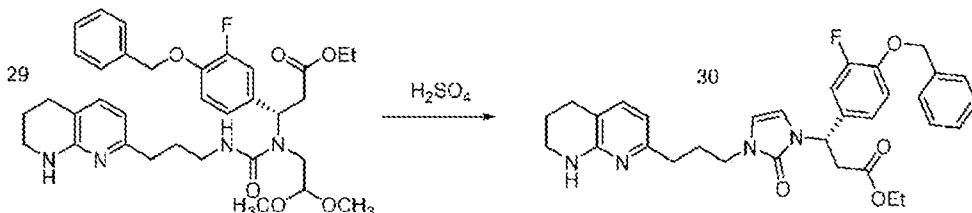


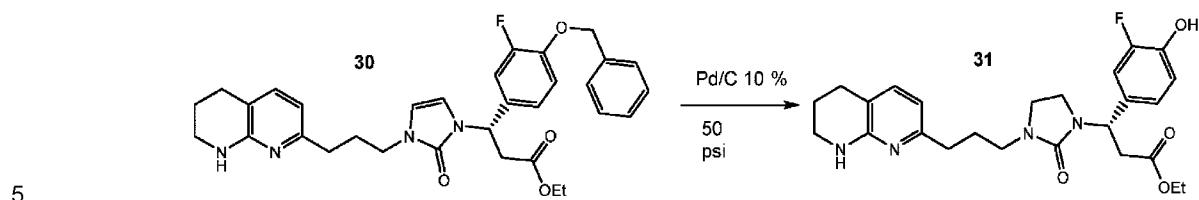
- 15 A una mezcla del compuesto 26 (5,76 g, 18,2 mmol) y el compuesto 27 (4,09 g, 23,6 mmol) en THF (40 ml) a 0 °C se le añadió STAB-H (8,85 g, 41,8 mmol) en porciones como un sólido. Después de la adición final, se retiró el enfriamiento y la mezcla se agitó durante aproximadamente 2,5 horas hasta completarse. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de bicarbonato de sodio acuoso saturado. La mezcla se extrajo tres veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron con salmuera, se filtraron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El compuesto 28 se aisló con un rendimiento del 73 % mediante separación en sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos. **<sup>1</sup>H RMN:** 400 MHz CDCl<sub>3</sub> δ 7,30 - 7,49 (m, 5 H), 7,11 (dd, 1 H), 6,88 - 7,02 (m, 2 H), 5,13 (s, 2 H), 4,40 (t, 1 H), 4,10 (q, 2 H), 4,00 (dd, 1 H), 3,35 (s, 3 H), 3,31 (s, 3 H), 2,47 - 2,75 (m, 4 H), 1,20 (t, 3 H).
- 20



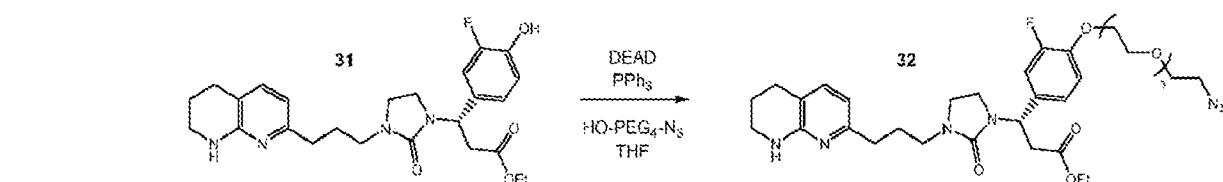
- 25 A una solución de trifosgeno (1,2 g, 4,04 mmol) en THF (24 ml) en un matraz seco a la llama a -10 °C se añadió gota a gota una solución del compuesto 19 (3,64 g, 8,99 mmol) y TEA (1,94 mmol, 13,9 mmol) en THF (6 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. Después de que la TLC indicó una reacción completa, se añadió TEA adicional (3,3 ml, 23,6 mmol) seguido de la adición del compuesto 28 (2,61 g, 13,7 mmol) como un sólido.
- 30 La mezcla heterogénea se calentó a 50 °C durante 2 horas con agitación vigorosa. Al finalizar, la mezcla de reacción se inactivó con 1 volumen de agua y se extrajo tres veces con EtOAc. La fase orgánica combinada se secó con salmuera, se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró. El compuesto 29 se obtuvo asumiendo un rendimiento del 100 % y la sustancia bruta se usó posteriormente sin purificación adicional.

- 35
- Al compuesto 29 (5,59 g, 8,97 mmol) disuelto en THF (37 ml) se le añadió agua (0,8 ml) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M, 8,07 ml, 16,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 28 °C durante la noche. A la mañana siguiente, el pH de la mezcla se ajustó a 9 usando bicarbonato de sodio y se extrajo tres veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron con salmuera, se filtraron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El compuesto 30 se aisló con un rendimiento del 82 % mediante separación en sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM que contenía TEA al 1 %.





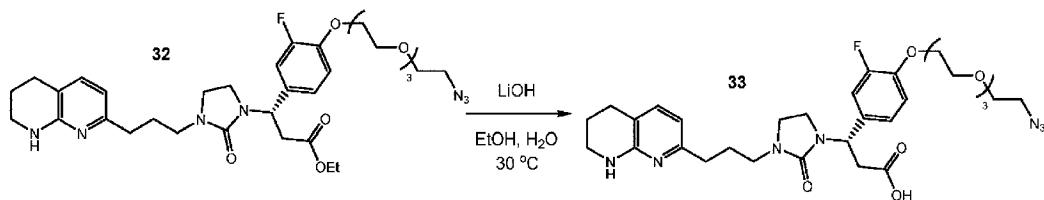
Al compuesto 30 (4,13 g, 7,39 mmol) disuelto en EtOH (30 ml) se cargó Degussa® paladio (10 % en peso, 3,15 g, 2,96 mmol) e hidrógeno a 50 psi. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la reacción se completó en un 64 %. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite® y se concentró. El residuo se disolvió en EtOH y se cargó con paladio (10 % en peso, 1,57 g, 1,48 mmol) e hidrógeno a 50 psi. Tras agitar durante 48 horas, la mezcla de reacción se calentó a 30 °C y se agitó durante 24 horas más. Una vez completada, la suspensión se filtró sobre Celite® y todas las sustancias volátiles se retiraron al vacío. El residuo se purificó sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM, proporcionando el compuesto 31 con un rendimiento del 72 %. <sup>1</sup>H RMN: 400 MHz DMSO-d<sub>6</sub> δ 9,88 (s, 1 H), 7,02 - 7,14 (m, 2 H), 6,86 - 6,93 (m, 2 H), 6,50 - 6,76 (m, 1 H), 6,31 (d, 1 H), 5,17 (t, 1 H), 4,00 (q, 2 H), 3,23 - 3,28 (m, 4 H), 2,79 - 3,18 (m, 7 H), 2,61 (t, 2 H), 2,41 (t, 2 H), 1,65 - 1,78 (m, 4 H), 1,09 (t, 3 H).



20

25

A una solución de PPh<sub>3</sub> (699 mg, 2,66 mmol) en THF (0,47 ml) a -10 °C se añadió gota a gota una solución de DEAD. La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se añadió a una mezcla pura del compuesto 31 (600 mg, 1,33 mmol) y HO-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>, (466 mg, 3,06 mmol) y se agitó durante la noche. Después, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM, proporcionando el compuesto 32 con un rendimiento del 50 %. <sup>1</sup>H RMN: 400 MHz DMSO-d<sub>6</sub> δ 7,10 - 7,19 (m, 2 H), 6,97 - 7,06 (m, 2 H), 6,18 - 6,31 (m, 2 H), 5,20 (t, 1 H), 4,13 - 4,16 (m, 1 H), 3,98 - 4,04 (m, 2 H), 3,71 - 3,80 (m, 2 H), 3,52 - 3,61 (m, 8 H), 3,38 - 3,37 (m, 5 H), 3,10 - 3,25 (m, 5 H), 2,79 - 3,08 (m, 5 H), 2,59 (t, 2 H), 2,31 - 2,42 (m, 2 H), 1,65 - 1,75 (m, 4 H), 1,10 (t, 3 H).



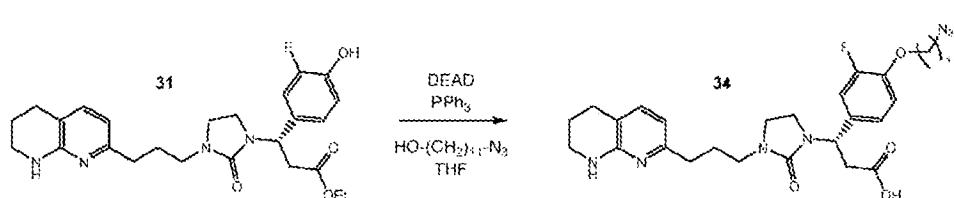
30

35

Al compuesto 32 (826 mg, 1,23 mmol) se le añadió EtOH (3 ml) y H<sub>2</sub>O (3 ml), seguido de LiOH (97 mg, 4,05 mmol). La mezcla se agitó a 30 °C durante la noche. Al finalizar, la mezcla se neutralizó a pH = 5 usando HCl acuoso 6 M y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa con una columna Phenomenex Gemini C18, 50 × 250 mm, 10 µm eluyendo con un gradiente de acetonitrilo en agua que contenía 0,1 %, proporcionando el compuesto 33 (estructura 2c) con 81 % de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN: 400 MHz D<sub>2</sub>O δ 7,30 (d, 1 H), 7,01 - 7,19 (m, 3 H), 6,45 (d, 1 H), 5,24 (t, 1 H), 4,14 - 4,32 (m, 2 H), 3,84 - 3,92 (m, 2 H), 3,59 - 3,77 (m, 10 H), 3,14 - 3,45 (m, 8 H), 1,02 - 3,12 (m, 1 H), 2,97 (d, 2 H), 2,85 (q, 1 H), 2,50 - 2,72 (m, 4 H), 1,68 - 1,94 (m, 4 H).

40

Síntesis de la estructura 2.1c (ácido (S)-3-(4-((11-azidoundecil)oxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanoico).

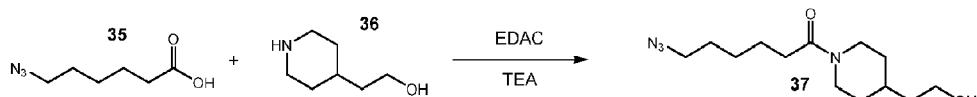


45

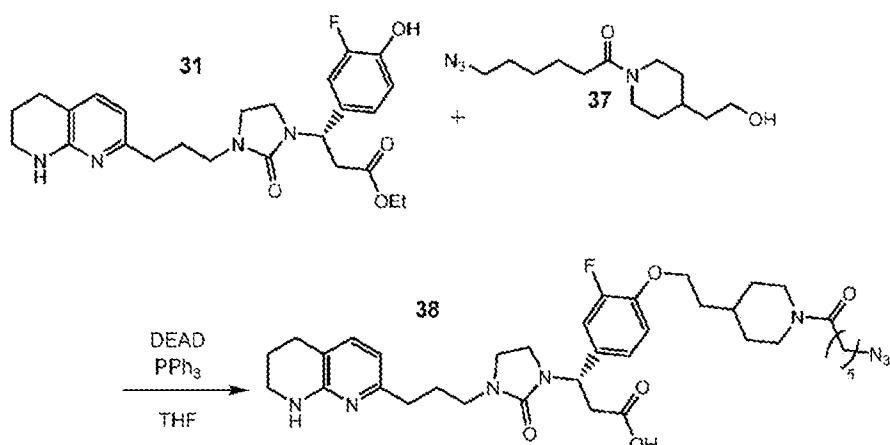
A una solución de PPh<sub>3</sub> en THF se añadió gota a gota una solución de DEAD a temperatura ambiente. La mezcla se transfirió a un vial que contenía la mezcla del compuesto 31 y OH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-N<sub>3</sub>, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Las sustancias volátiles se retiraron de la mezcla de reacción y la sustancia bruta se disolvió en EtOH. Se añadió LiOH como una solución en H<sub>2</sub>O, y se añadió agua/EtOH adicional hasta que la

- mezcla de reacción se volvió homogénea. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, la mezcla se acidificó a un pH de 3 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró y se purificó mediante HPLC de fase inversa (Phenomenex Gemini C18, 50 × 250 mm, 10 µm, TFA al 0,1 % en acetonitrilo/aqua, elución en gradiente).

Síntesis de la estructura 2.2c (ácido (S)-3-(4-(2-(1-(6-azidohexanoil)piperidin-4-il)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanoico).



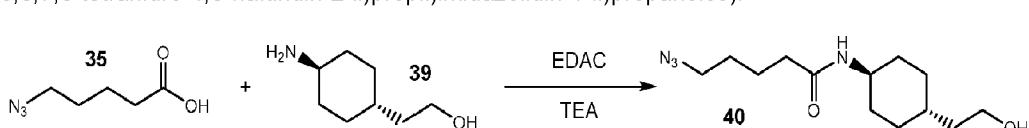
15 El compuesto 35 disuelto en DCM a 0 °C se trató con EDAC y se añadió acetonitrilo para ayudar en la solubilidad. Despues de 5 minutos, se añadieron TEA y el compuesto 36, se retiró el enfriamiento y se continuó agitando durante 2 horas. Al finalizar, se añadió cloruro de amonio saturado y la fase orgánica se separó, se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró. La sustancia bruta obtenida se utilizó posteriormente sin purificación adicional.



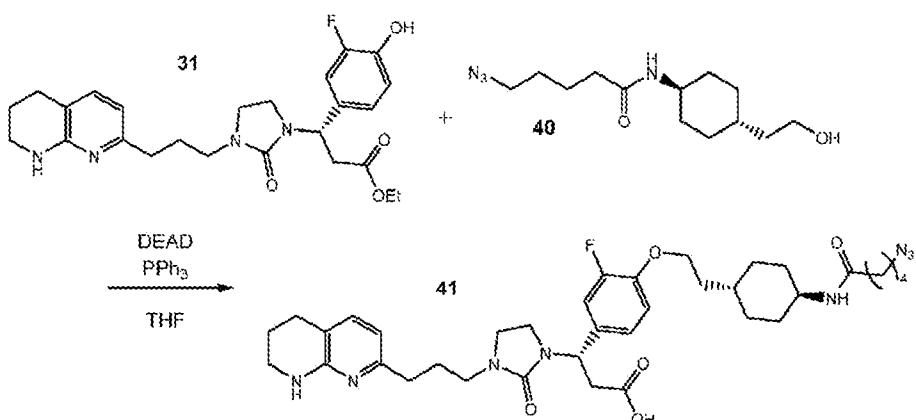
- 20 A una solución de  $\text{PPh}_3$  en THF se añadió gota a gota una solución de DEAD a temperatura ambiente con agitación vigorosa. La mezcla se transfirió a un vial que contenía una mezcla del compuesto 31 y el compuesto 37, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Las sustancias volátiles se retiraron de la mezcla de reacción y la sustancia bruta se disolvió en EtOH. Se añadió LiOH como una solución en  $\text{H}_2\text{O}$ , y se añadió agua adicional hasta que la mezcla de reacción se volvió homogénea. Despues de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, la mezcla se acidificó a un pH de 3 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , se concentró y se purificó mediante HPLC de fase inversa (Phenomenex Gemini C18, 50 × 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ , TFA al 0,1 % en acetonitrilo/agua, elución en gradiente), proporcionando el compuesto 38 (estructura 2.2c).

25

30 Síntesis de la estructura 2.3c (ácido (S)-3-(4-(2-((1r,4S)-4-(5-azidopentanamido)ciclohexil)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-

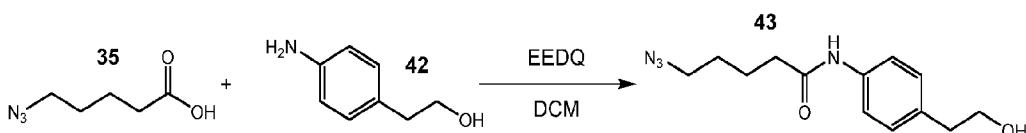


- 35 A la suspensión del compuesto 35 en DCM a 0 °C se le añadió EDAC como una solución en DCM. Despues de 5 minutos, se retiró el enfriamiento y se añadió el compuesto 39, seguido de la adición de TEA. La mezcla heterogénea se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la reacción se diluyó con DCM y el precipitado se disolvio. La mezcla se lavó dos veces con KHSO<sub>4</sub> al 5 % y una vez con salmuera. La fase orgánica se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo bruto que contenía el compuesto 40 se usó sin purificación adicional.  
40

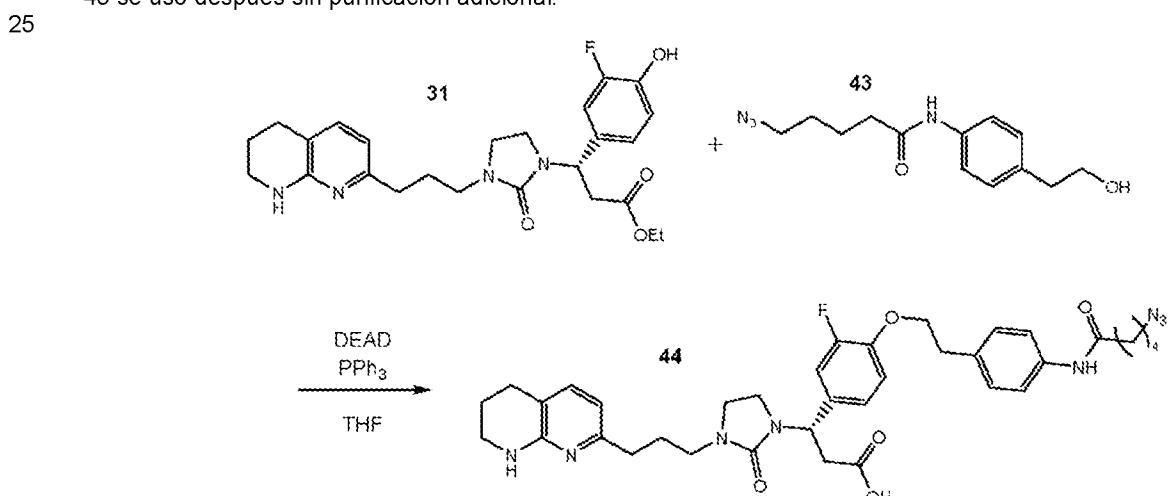


5 A una solución de PPh<sub>3</sub> en THF se añadió gota a gota una solución de DEAD a temperatura ambiente con agitación vigorosa. La mezcla se transfirió a un vial que contenía una mezcla del compuesto 31 y el compuesto 40, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Las sustancias volátiles se retiraron de la mezcla de reacción y la sustancia bruta se disolvió en EtOH. Se añadió LiOH como una solución en H<sub>2</sub>O, y se añadió agua adicional hasta que la mezcla de reacción se volvió homogénea. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, la mezcla se acidificó a un pH de 3 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró y se purificó mediante HPLC de fase inversa (Phenomenex Gemini C18, 50 × 250 mm, 10 µm, TFA al 0,1 % en acetonitriloagua, elución en gradiente), proporcionando el compuesto 41 (estructura 2.3c).

10 Síntesis de la estructura 2.4c (ácido (S)-3-(4-(4-azidopentanamido)fenetoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanoico).

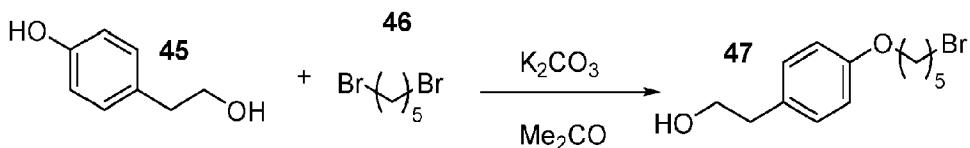


15 20 A una mezcla del compuesto 35 y el compuesto 42 en DCM se le añadió EEDQ y la solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con DCM, se lavó tres veces con HCl 1 M y se lavó una vez con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El compuesto 43 se usó después sin purificación adicional.

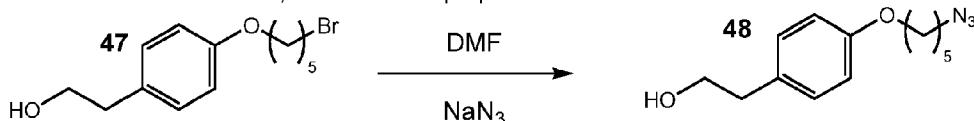


25 A una solución de PPh<sub>3</sub> en THF se añadió gota a gota una solución de DEAD a temperatura ambiente con agitación vigorosa. La mezcla se transfirió a un vial que contenía una mezcla del compuesto 31 y el compuesto 43, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Las sustancias volátiles se retiraron de la mezcla de reacción y la sustancia bruta se disolvió en EtOH. Se añadió LiOH como una solución en H<sub>2</sub>O, y se añadió agua adicional hasta que la mezcla de reacción se volvió homogénea. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, la mezcla se acidificó a un pH de 3 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró y se purificó mediante HPLC de fase inversa (Phenomenex Gemini C18, 50 × 250 mm, 10 µm, TFA al 0,1 % en acetonitriloagua, elución en gradiente), proporcionando el compuesto 44 (estructura 2.4c).

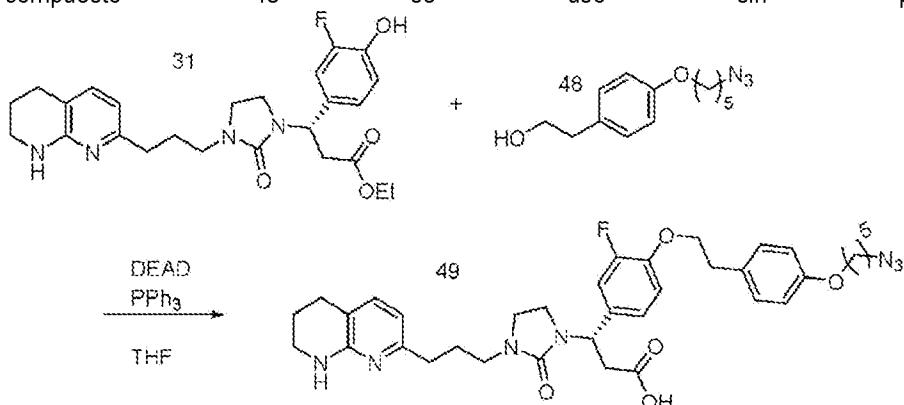
5 Síntesis de la estructura 2.5c ácido ((S)-3-(4-(4-((5-azidopentil)oxi)fenetoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanoico).



10 A una solución del compuesto 45 y el compuesto 46 en acetona se añadió carbonato potásico. La mezcla se calentó a 65 °C en un vial sellado como una suspensión con agitación vigorosa durante la noche bajo protección de N<sub>2</sub>. A continuación, la reacción se filtró, se concentró y se purificó sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos, proporcionando el compuesto 47.

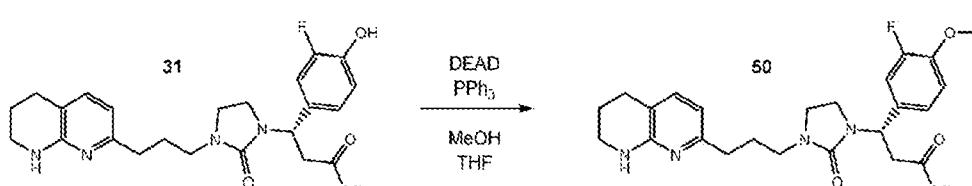


15 A una solución del compuesto 47 en DMF se le añadió azida de sodio y la mezcla se agitó a 80 °C en un vial sellado bajo protección de nitrógeno durante la noche. Al finalizar, se añadió 1 volumen de agua y el producto se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica separada se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró. La sustancia bruta del compuesto 48 se usó sin purificación adicional.



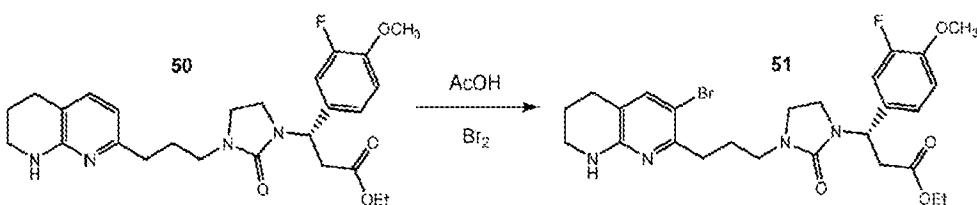
20 A una solución de PPh<sub>3</sub> en THF se añadió gota a gota una solución de DEAD a temperatura ambiente con agitación vigorosa. La mezcla se transfirió a un vial que contenía una mezcla del compuesto 31 y el compuesto 48, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Las sustancias volátiles se retiraron de la mezcla de reacción y la sustancia bruta se disolvió en EtOH. Se añadió LiOH como una solución en H<sub>2</sub>O, y se añadió agua adicional hasta que la mezcla de reacción se volvió homogénea. Despues de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, la mezcla se acidificó a un pH de 3 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró y se purificó mediante HPLC de fase inversa (Phenomenex Gemini C18, 50 × 250 mm, 10 µm, TFA al 0,1 % en acetonitriloagua, elución en gradiente), proporcionando el compuesto 49 (estructura 2.5c).

30 Síntesis de la estructura 2.6c (ácido (S)-3-(3-(3-(17-azido-3-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-2-azaheptadecil)-5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)-2-oxoimidazolidin-1-il)-3-(3-fluoro-4-metoxifénil)propanoico).



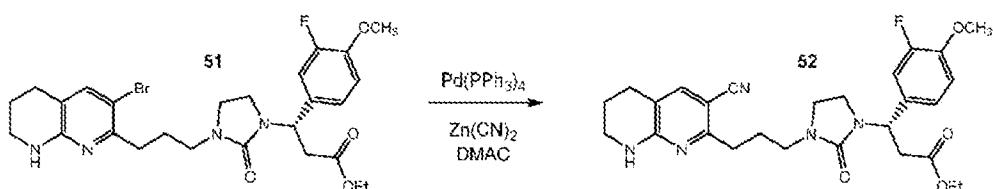
35 A una solución de PPh<sub>3</sub> en THF se añadió gota a gota una solución de DEAD a 0 °C. Despues de completar la adición, la mezcla se transfirió a un vial que contenía una mezcla pura del compuesto 31 y MeOH. El vial se tapó con N<sub>2</sub> y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Al completarse, todas las sustancias volátiles se retiraron y la sustancia bruta obtenida se purificó sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM, proporcionando el compuesto 50.

40



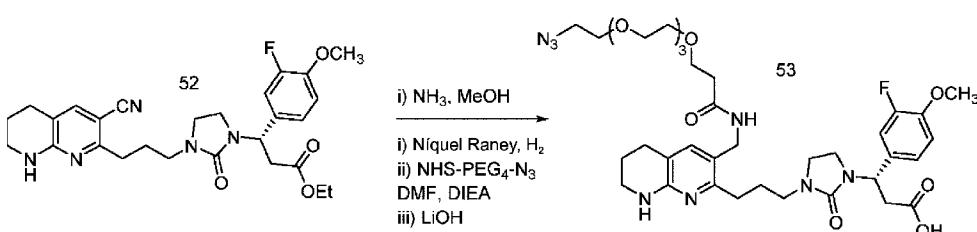
5 A una solución del compuesto 50 en AcOH se le añadió bromo y la mezcla se agitó durante 0,5 horas. Al finalizar, la reacción se diluyó con 5 volúmenes de acetato de etilo y 2,5 volúmenes de agua. La capa acuosa se neutralizó a pH 7 con bicarbonato de sodio acuoso saturado y la fase orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo dos veces más con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. La sustancia bruta obtenida del compuesto 51 se utilizó posteriormente sin purificación adicional.

10



15 Una solución del compuesto 51, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y Zn(CN)<sub>2</sub> en DMAC se desgasificó con nitrógeno durante 30 minutos. La mezcla se calentó a 128 °C en un vial sellado durante la noche. Al finalizar, la mezcla se diluyó con 5 volúmenes de EtOAc. La fase orgánica se separó, luego se lavó dos veces con agua, se lavó dos veces con salmuera y luego la fase orgánica se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó sobre sílice eluyendo con EtOAc al 100 %, proporcionando el compuesto 52.

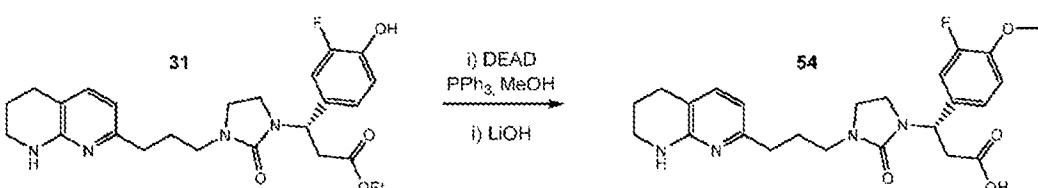
20



25 A una solución del compuesto 52 en MeOH se le añadió amoniaco, luego una suspensión de níquel Raney que se enjuagó previamente tres veces con metanol. Se cargó un matraz Parr® a 60 psi con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Al finalizar, la suspensión se filtró y se concentró. El residuo bruto obtenido se redisvolvió en DMF. Se añadieron DIEA y NHS-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> y la mezcla se agitó durante una hora. Tras la finalización, se retiraron todas las sustancias volátiles y el residuo bruto seredisvolvió en una mezcla de MeOH y THF. Se añadió LiOH en H<sub>2</sub>O y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. Al finalizar la reacción, el pH se ajustó a 3 con TFA y la mezcla se injectó directamente en HPLC de fase inversa semipreparativa (Phenomenex Gemini C18, 250 × 21,2 mm, 5 µm, TFA al 0,1 % en agua/ACN, elución en gradiente), proporcionando el compuesto 53 (estructura 2.6c).

30

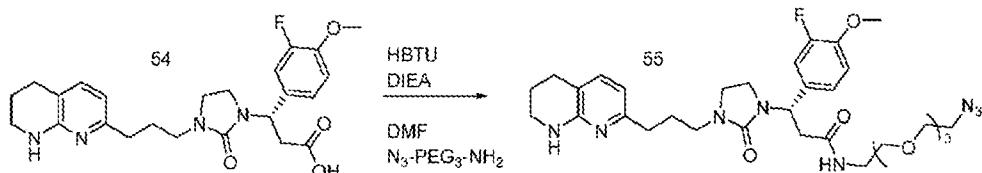
35 Síntesis de la estructura 2.7c ((S)-N-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)ethyl)-3-(3-fluoro-4-metoxifénil)-3-(2-oxo-3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanamida), estructura 2.8c, estructura 2.9c y estructura 2.10c.



40 Al compuesto 31 se le añadió secuencialmente THF, PPh<sub>3</sub> y una solución de DEAD gota a gota a 0 °C. La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla se enfrió a -20 °C durante 1 hora y se filtró para eliminar el óxido de trifenilfosfina. El filtrado se concentró y el intermedio de O-alquilación se aisló mediante purificación en sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos que contenían TEA al 1 %. El intermedio aislado se suspendió luego en una mezcla de THF y H<sub>2</sub>O, se trató con LiOH en H<sub>2</sub>O y se agitó a 35 °C durante 16 horas. Al finalizar, el pH se ajustó a 7 con HCl 2 M y se retiraron todas las sustancias volátiles. La sustancia bruta se suspendió en H<sub>2</sub>O; se añadió cloruro de sodio y el compuesto 54 se extrajo con acetato de etilo cinco veces. Las fases orgánicas

45

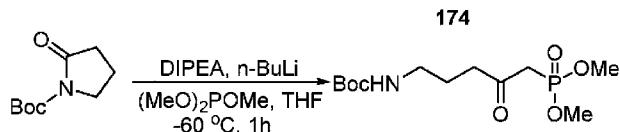
5 se combinaron, se filtraron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El compuesto 54 se usó posteriormente sin purificación adicional.



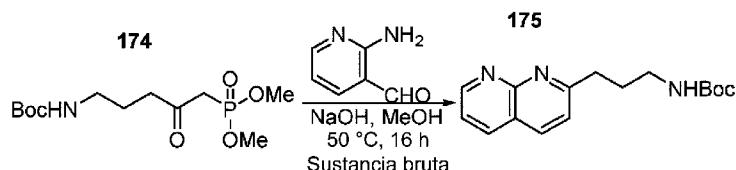
10 Una solución del compuesto 54 en DMF se trató con HBTU y se agitó durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron DIEA y N<sub>3</sub>-PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Una vez completado, el pH se ajustó a 3 con TFA y el compuesto 55 se aisló mediante inyección directa en HPLC de fase inversa semipreparativa (Phenomenex Gemini C18, 250 × 21,2 mm, 5 μm, TFA al 0,1 % en agua/ACN, elución en gradiente), proporcionando el compuesto 55.

15 Se utilizaron procedimientos similares para sintetizar los compuestos 2.8c, 2.9c y 2.10c, utilizando N<sub>3</sub>-PEG<sub>11</sub>-NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>-PEG<sub>23</sub>-NH<sub>2</sub> y N<sub>3</sub>-PEG<sub>35</sub>-NH<sub>2</sub>, respectivamente.

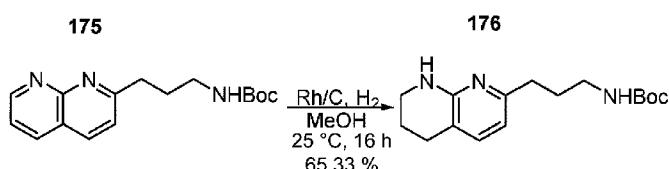
20 Síntesis de la estructura 2.11c (ácido (R)-3-(4-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanoico).



25 En un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 3 L purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocaron THF (1,50 L), DIPEA (150,00 ml, 716,000 mmol, 0,88 equiv.), n-BuLi (430,00 ml, 680,000 mmol, 0,84 equiv.) Esto fue seguido por la adición de fosfito de trimetilo (195,00 ml) a -60 °C y se agitó durante 1 h a -60 °C. A esto se le añadió 2-oxopirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo (150,00 g, 809,835 mmol, 1,00 equiv.) a -60 °C. La solución resultante se agitó durante 1 h a -60 °C en un baño de nitrógeno líquido. A continuación, la reacción se inactivó mediante la adición de 350 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) y se diluyó con 1,5 L de H<sub>2</sub>O. La solución resultante se extrajo con 2x1 L de acetato de etilo. La mezcla resultante se lavó con 1x1 L de H<sub>2</sub>O, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. Esto dio como resultado 200 g (sustancia bruta) de N-[5-(dimetoxifosforil)-4-oxopentil]carbamato de terc-butilo como un aceite amarillo.



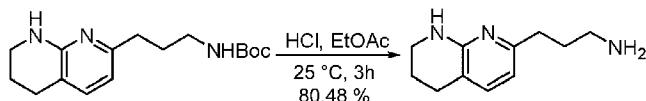
35 En un matraz de fondo redondo de 3 L, se colocó N-[5-(dimetoxifosforil)-4-oxopentil]carbamato de terc-butilo (200,00 g, 1500,00 mmol, 1,50 equiv.), MeOH (1,50 L), 2-aminopiridin-3-carbaldehído (53,00 g, 1000,00 mmol, 1,00 equiv.), NaOH (50,00 g, 1500,00 mmol, 1,50 equiv.). La solución resultante se agitó durante 16 h a 50 °C en un baño de aceite. El valor de pH de la solución se ajustó a 8 con NaHCO<sub>3</sub> (ac). La mezcla resultante se concentró. A continuación, la reacción se inactivó mediante la adición de 1,5 L de agua y se extrajo con 2x1,5 L de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. Esto dio como resultado 160 g (sustancia bruta) de N-[3-(1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamato de terc-butilo como un aceite amarillo.



45 En un matraz de fondo redondo de 5 L, se colocó N-[3-(1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamato de terc-butilo (160,00 g, 556,787 mmol, 1,00 equiv.), MeOH (2,00 L), Rh/C (140,00 g, 1,360 mmol), H<sub>2</sub> (40 Psi). La solución resultante se agitó durante 16 h a 25 °C. Los sólidos se separaron por filtración. La mezcla resultante se concentró. Esto dio como resultado 106 g (65,33 %) de N-[3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamato de terc-butilo como un sólido amarillo.

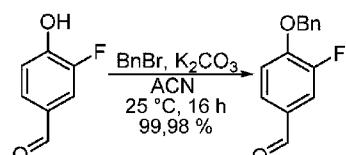
5

176



En un matraz de fondo redondo de 1 L, se colocó N-[3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamato de terc-butilo (106,00 g, 363,767 mmol, 1,00 equiv.), EtOAc (500,00 ml), HCl en EtOAc (4M, 400,00 ml). La solución resultante se agitó durante 3 h a 25 °C. La solución resultante se diluyó con 1 L de H<sub>2</sub>O. Se empleó NaOH (ac.) para ajustar el pH a 11. La solución resultante se extrajo con 2x1 L de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhídrico y se concentraron al vacío. Esto dio como resultado 56 g (80,48 %) de 3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propan-1-amina como un sólido amarillo.

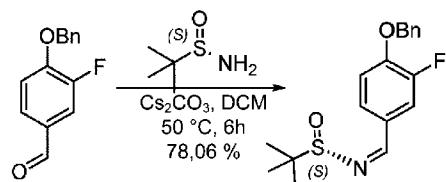
178



En un matraz de fondo redondo de 2 L, se colocó 3-fluoro-4-hidroxibenzaldehído (140,00 g, 999,194 mmol, 1,00 equiv.), ACN (1000 ml), (bromometil)benceno (205,08 g, 1199,039 mmol, 1,20 equiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (414,28 g, 2997,581 mmol, 3,00 equiv.). La solución resultante se agitó durante 16 h a 25 °C. Los sólidos se separaron por filtración. La mezcla resultante se concentró. Esto dio como resultado 230 g (99,98 %) de 4-(benciloxi)-3-fluorobenzaldehído en forma de un sólido blanco.

178

179

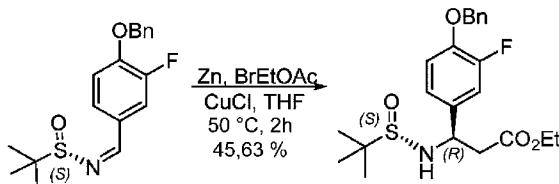


En un matraz de fondo redondo de 3 L, se colocó 4-(benciloxi)-3-fluorobenzaldehído (230,00 g, 998,966 mmol, 1,00 equiv.), DCM (1600 ml), (S)-2-metilpropano-2-sulfonamida (145,29 g, 1198,762 mmol, 1,20 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (650,97 g, 1997,933 mmol, 2.00 equiv.). La solución resultante se agitó durante 6 h a 50 °C en un baño de aceite. Los sólidos se separaron por filtración. La mezcla resultante se concentró. Esto dio como resultado 260 g (78,06 %) de (S)-N-[(4-(benciloxi)-3-fluorofenil)methyliden]-2-metilpropano-2-sulfonamida como un sólido blanco.

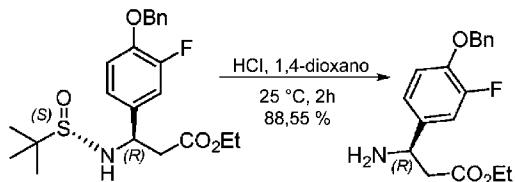
En un matraz de fondo redondo de 3 L, purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocaron THF (2,0 L), Zn (1,02 kg, 15595,945 mmol, 20,00 equiv.), CuCl (115,80 g, 1169,696 mmol, 1,50 equiv.), 2-bromoacetato de etilo (325,57 g, 1949,498 mmol, 2,50 equiv.), (S)-N-[(4-(benciloxi)-3-fluorofenil)methyliden]-2-metilpropano-2-sulfonamida (260,00 g, 779,797 mmol, 1,00 equiv.). La solución resultante se agitó durante 30 minutos a 0 °C en un baño de agua/hielo. La solución resultante se dejó reaccionar, con agitación, durante 2 h adicionales mientras la temperatura se mantenía a 50 °C en un baño de aceite. Los sólidos se separaron por filtración. La mezcla resultante se concentró. A continuación, la reacción se inactivó mediante la adición de 2 L de agua y se extrajo con 2x2 L de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhídrico y se concentraron al vacío. Esto dio como resultado 150 g (45,63 %) de (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[(S)-2-metilpropano-2-sulfonil]amino]propanoato de etilo como un aceite amarillo.

179

180

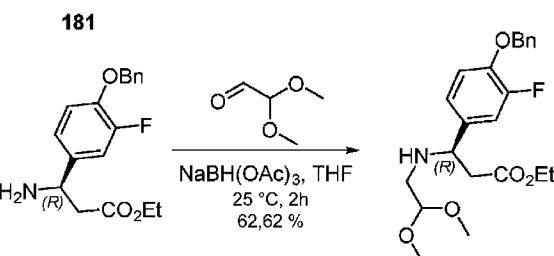


En un matraz de fondo redondo de 3 L, purgado y mantenido con una atmósfera inerte de nitrógeno, se colocaron THF (2,0 L), Zn (1,02 kg, 15595,945 mmol, 20,00 equiv.), CuCl (115,80 g, 1169,696 mmol, 1,50 equiv.), 2-bromoacetato de etilo (325,57 g, 1949,498 mmol, 2,50 equiv.), (S)-N-[(4-(benciloxi)-3-fluorofenil)methyliden]-2-metilpropano-2-sulfonamida (260,00 g, 779,797 mmol, 1,00 equiv.). La solución resultante se agitó durante 30 minutos a 0 °C en un baño de agua/hielo. La solución resultante se dejó reaccionar, con agitación, durante 2 h adicionales mientras la temperatura se mantenía a 50 °C en un baño de aceite. Los sólidos se separaron por filtración. La mezcla resultante se concentró. A continuación, la reacción se inactivó mediante la adición de 2 L de agua y se extrajo con 2x2 L de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhídrico y se concentraron al vacío. Esto dio como resultado 150 g (45,63 %) de (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[(S)-2-metilpropano-2-sulfonil]amino]propanoato de etilo como un aceite amarillo.

**180****181**

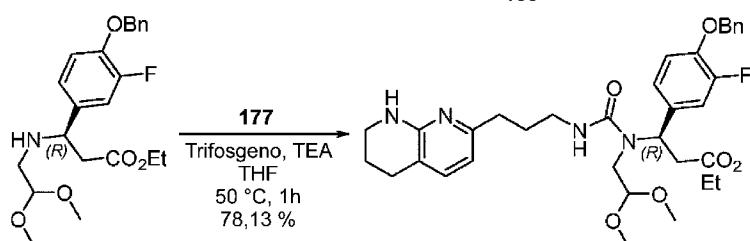
5

En un matraz de fondo redondo de 1 L, se colocó (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[(S)-2-metilpropano-2-sulfinil]amino]propanoato de etilo (150,00 g, 355,847 mmol, 1,00 equiv.), HCl en 1,4-dioxano (400,00 ml, 4M). La solución resultante se agitó durante 2 h a 25 °C. La mezcla resultante se concentró. A continuación, la reacción se inactivó mediante la adición de 1 L de agua. Se empleó NaHCO<sub>3</sub> (ac.) para ajustar el pH a 8. La solución resultante se extrajo con 2 x 1 L de acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. Esto dio como resultado 100 g (88,55 %) de (3R)-3-amino-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]propanoato de etilo como un aceite amarillo.

**182**

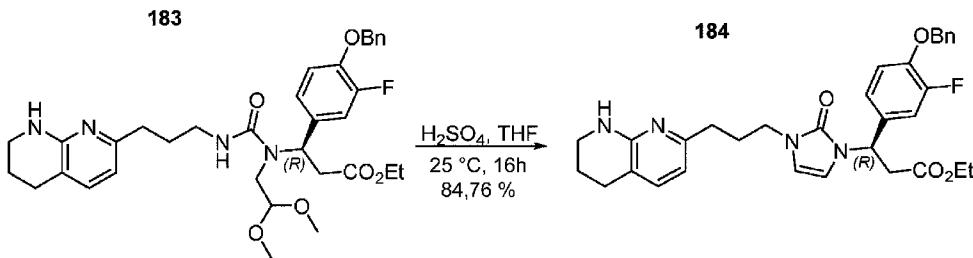
15

En un matraz de fondo redondo de 2 L, se colocó (3R)-3-amino-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]propanoato de etilo (100,00 g, 315,100 mmol, 1,00 equiv.), THF (1,00 L), 2,2-dimetoxiacetaldehído (49,21 g, 472,696 mmol, 1,50 equiv.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (133,57 g, 630,199 mmol, 2,00 equiv.). La solución resultante se agitó durante 2 h a 25 °C. A continuación, la reacción se inactivó mediante la adición de 1 L de agua. La solución resultante se extrajo con 2x1 L de acetato de etilo, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. Esto dio como resultado 80 g (62,62 %) de (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[(2,2-dimetoxietil)amino]propanoato de etilo como un aceite amarillo.

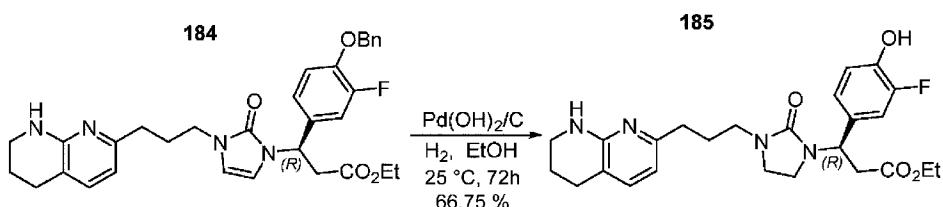
**182****183**

25

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 2 L, se colocó trifosgeno (22,25 g, 74,975 mmol, 0,38 equiv.), THF (500 ml), (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[(2,2-dimetoxietil)amino]propanoato de etilo (80,00 g, 197,304 mmol, 1,00 equiv.), TEA (29,95 g, 295,956 mmol, 1,50 equiv.), 3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propan-1-amina (Compuesto 177, 33,97 g, 177,573 mmol, 0,90 equiv.). La solución resultante se agitó durante 1 h a 50 °C en un baño de aceite. A continuación, la reacción se inactivó mediante la adición de 1 L de agua. Se empleó NaHCO<sub>3</sub> (ac.) para ajustar el pH a 8. La solución resultante se extrajo con 2 x 1 L de acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. Esto dio como resultado 96 g (78,13 %) de (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[(2,2-dimetoxietil)][[3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamool]amino]propanoato de etilo como un aceite bruto amarillo.



En un matraz de fondo redondo de 1000 ml, se colocó (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[(2,2-dimetoxietil)([3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamoi])amino]propanoato de etilo (96,00 g, 154,158 mmol, 1,00 equiv.) en THF (500,00 ml), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (180,00 ml, 2M). La solución resultante se agitó durante 16 h a 25 °C. Se empleó NaOH (1 M) para ajustar el pH a 8. La solución resultante se extrajo con 2 x 1 L de diclorometano, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo se aplicó a una columna de gel de sílice con diclorometano/metanol (50/1). Las fracciones recogidas se combinaron y se concentraron. Esto dio como resultado 73 g (84,76 %) de (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[2-oxo-3-[3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il]propanoato de etilo como un aceite amarillo.

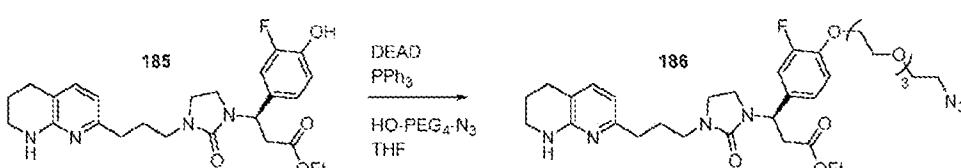


En un matraz de fondo redondo de 3 L, se colocó (3R)-3-[4-(benciloxi)-3-fluorofenil]-3-[2-oxo-3-[3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il]propanoato de etilo (73,00 g, 130,671 mmol, 1,00 equiv.), EtOH (1,50 L), Pd(OH)<sub>2</sub>/C (60,00 g, 427,259 mmol, 3,27 equiv.), Hz (50 atm). La solución resultante se agitó durante 72 h a 25 °C. Los sólidos se separaron por filtración. El residuo se aplicó a una columna de gel de sílice con diclorometano/metanol (9/1). Las fracciones recogidas se combinaron y se concentraron. Esto dio como resultado 41,0415 g (66,75 %) de (3R)-3-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-3-[2-oxo-3-[3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]imidazolidin-1-il]propanoato de etilo como un aceite amarillo.

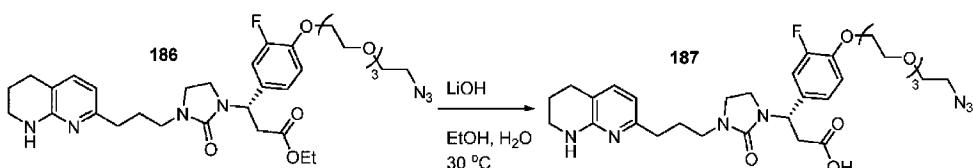
25 LOMAS TELA AFB 350-3 WMB-A 171

Rotación óptica  $[\alpha]_{D}^{20.0} = +37.5^\circ$  ( $C=1.0$  g/100 ml en MeOH)

30 H-RMN: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, *ppm*) δ 9.84 (s, 1H), 7.07 - 7.00 (m, 2H), 6.95 - 6.850 (m, 2H), 6.24 (d, 2H), 5.18 (t, 1H), 4.06 - 3.96 (m, 2H), 3.32 - 2.75 (m, 10H), 2.60 (t, 2H), 2.37 (t, 2H), 1.77 - 1.67 (m, 4H), 1.10 (t, 3H).



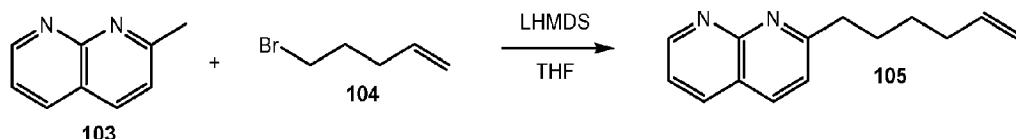
35 A una solución de PPh<sub>3</sub> en THF a -10 °C se añadió gota a gota una solución de DEAD. La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se añadió a una mezcla pura del compuesto 185 y HO-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>, y se agitó durante la noche. Después, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM, proporcionando el compuesto 186.



Al compuesto 186 se le añadió EtOH y HzO, seguido de LiOH. La mezcla se agitó a 30 °C durante la noche. Al finalizar, la mezcla se neutralizó a pH = 5 usando HCl acuoso 6 M y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa con una columna Phenomenex Gemini C18, 50 × 250 mm, 10 µm eluyendo con un gradiente de acetona en agua que contenía 0.1 %, proporcionando el compuesto 187 (estructura 2.11c).

5

Síntesis de la estructura 28c (Compuesto 118a) estructura 29c (Compuesto 118b), estructura 31c (Compuesto 119a) y estructura 30c (Compuesto 119b).



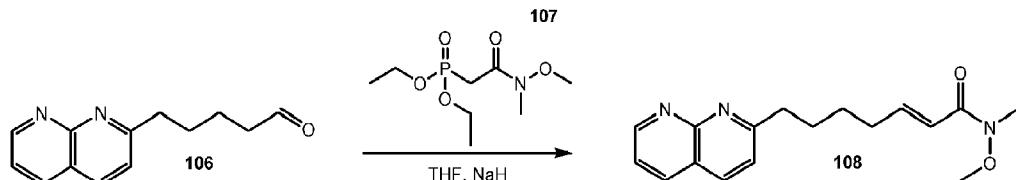
10

A una solución de LHMDS (1,0 M en THF, 95 ml, 95 mmol) y THF (60 ml) se le añadió una solución del compuesto 103 (2-metil-[1,8]naftiridina (12,5 g, 86,7 mmol)) en THF (180 ml) gota a gota a -78 °C. Después de agitar durante 30 minutos, se añadió gota a gota una solución del compuesto 104 (5-bromo-1-penteno (19,4 g, 130 mmol)) en THF (120 ml) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se calentó a 0 °C y se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl (100 ml) y agua desionizada (100 ml), luego se extrajo con acetato de etilo (2 × 400 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró y el compuesto 105 se aisló mediante CombiFlash® eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 50-100 % en hexanos. Rendimiento del compuesto 105: 7,93 g (43 %).

20

A una solución del compuesto 105 (2,50 g, 11,8 mmol) en acetona (67,5 ml), agua (7,5 ml) y 2,6 lutidina (2,74 ml, 23,6 mmol) se le añadió N-óxido de 4-metilmorfolina (2,07 g, 17,7 mmol) y tetróxido de osmio (2,5 % en peso en t-butanol, 2,40 g, 0,24 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 75 minutos, se añadió (diacetoxiyodo)benceno (5,69 g, 17,7 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas, luego se inactivó con solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 × 100 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró y el compuesto 106 se aisló mediante CombiFlash® eluyendo con un gradiente de metanol al 0-5 % en acetato de etilo. Rendimiento del compuesto 106: 1,12 g (44 %).

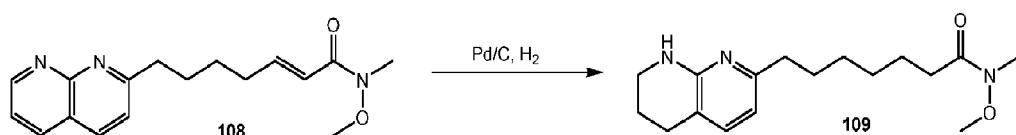
30



35

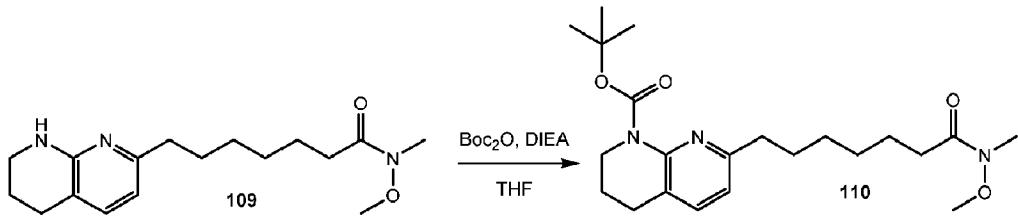
A una suspensión de hidruro de sodio (dispersión al 60 % en aceite mineral, 0,185 g, 4,64 mmol) en THF (9 ml) se le añadió una solución del compuesto 107 ((N-metoxi-N-metilcarbamoylmetil)fosfonato de dietilo) (1,06 g, 4,43 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C. Después de agitar durante 30 minutos, se añadió gota a gota una solución del compuesto 106 (0,903 g, 4,21 mmol) en THF (9 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a 0 °C, luego se inactivó con solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 × 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó dos veces con solución acuosa semisaturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. Rendimiento del compuesto 108: 1,40 g (se asumió un rendimiento del 100 % y se usó en la etapa posterior sin purificación adicional).

40

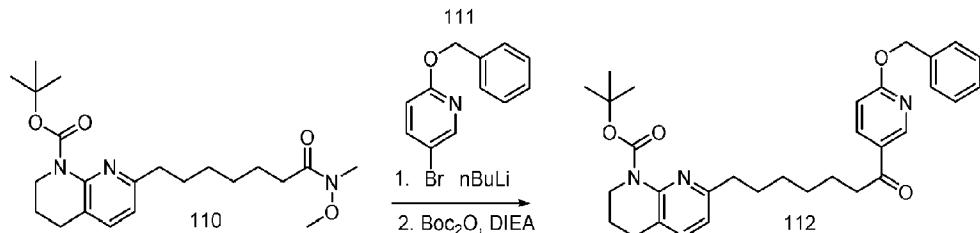


45

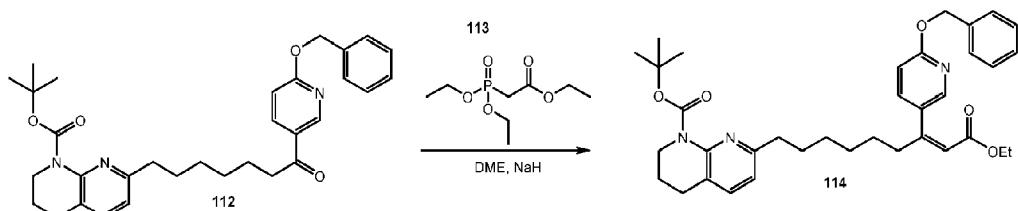
A una solución del compuesto 108 (1,31 g, 4,38 mmol) en acetato de etilo (20 ml) se le añadió Pd/C (10 % de carga, 0,466 g, 0,44 mmol). El recipiente de reacción se presurizó con Hz a 50 PSI. Después de agitar durante 3,5 horas, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite® y se aclaró con metanol. El filtrado se concentró y el compuesto 109 se aisló mediante CombiFlash® eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 50-100 % en hexanos que contenían trietilamina al 1 %. Rendimiento del compuesto 109: 0,833 g (62 %).



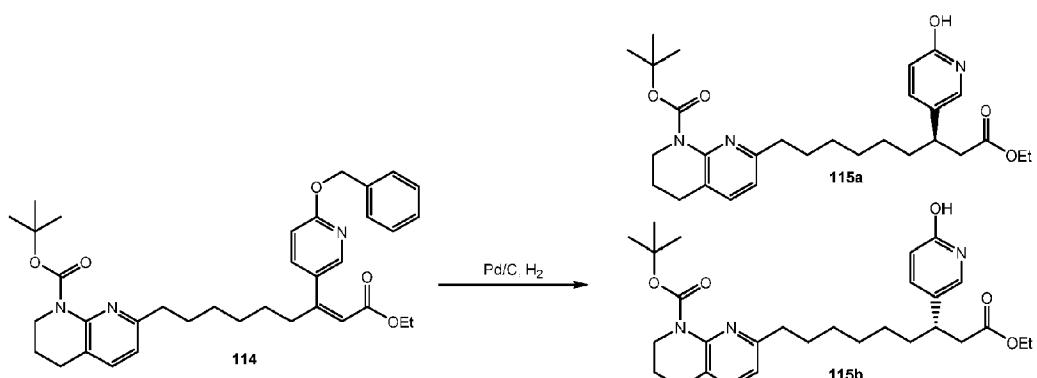
A una solución del compuesto 109 (0,833 g, 2,73 mmol) en THF (10 ml) se le añadió DIEA (0,590 ml, 3,41 mmol) y dicarbonato de di-terc-butilo (0,744 g, 3,41 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 5 horas. La reacción fue incompleta basada en LC/MS y se añadieron porciones adicionales de DIEA (0,590 ml, 3,41 mmol) y dicarbonato de di-terc-butilo (0,744 g, 3,41 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 16 horas adicionales. La mezcla de reacción se concentró y el compuesto 110 se aisló mediante CombiFlash® eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 50-100 % en hexanos. Rendimiento del compuesto 110: 0,934 g (84 %).



A una solución de n-butil litio (2,5 M en hexanos, 0,70 ml, 1,8 mmol) y THF (1,5 ml) se añadió el compuesto 111 (5-bromo-2-(fenilmetoxi)-piridina) (0,465 g, 1,8 mmol) como una solución en THF (0,8 ml) gota a gota durante 3 minutos a -78 °C. A continuación se añadió el compuesto 110 (0,535 g, 1,3 mmol) como una solución en THF (1 ml). Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se calentó a 0 °C, se inactivó con solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl (10 ml) y se acidificó adicionalmente con HCl acuoso 6 M a un pH de 7. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. A una solución de la sustancia bruta en THF (8 ml) se le añadió DIEA (0,94 ml, 5,4 mmol) y dicarbonato de di-terc-butilo (1,18 g, 5,4 mmol). La mezcla se agitó a 40 °C durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y el compuesto 112 se aisló mediante CombiFlash® eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-40 % en hexanos. Rendimiento del compuesto 112: 471 mg (50 %).



A una suspensión de hidruro de sodio (dispersión al 60 % en aceite mineral, 0,106 g, 2,65 mmol) en dimetoxietano (2 ml) se le añadió el compuesto 113 (fosfonoacetato de trietilo) (0,593 g, 2,65 mmol) como una solución en dimetoxietano (1 ml) a 0 °C. Después de agitar durante 20 minutos, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se añadió una solución del compuesto 112 (0,467 g, 0,88 mmol) en dimetoxietano (2 ml). La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 4 horas. La reacción se inactivó con solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl (10 ml) y el producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 ml). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró y el compuesto 114 se aisló como una mezcla 1:1 de isómeros cis:trans mediante CombiFlash® eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-30 % en hexanos. Rendimiento del compuesto 114: 392 mg (74 %.).

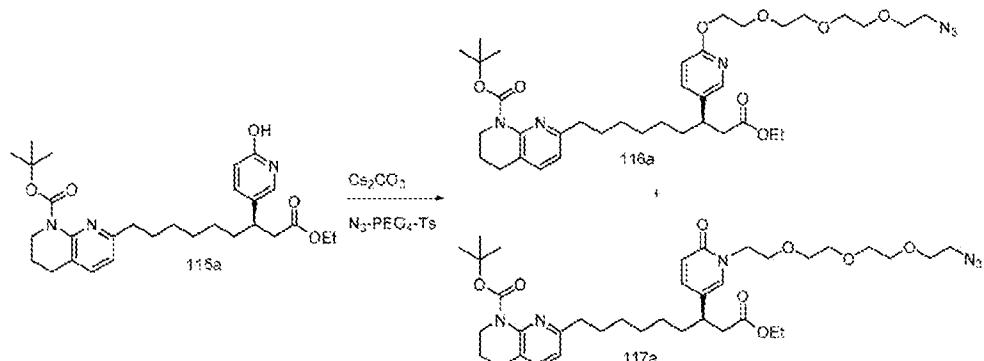


5

A una solución del compuesto 114 (390 mg, 0,65 mmol) en etanol (6 ml) se le añadió Pd/C (10 % de carga, 69 mg, 0,07 mmol). El recipiente de reacción se presurizó con H<sub>2</sub> a 50 PSI. Después de agitar durante 4 horas, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite® y se aclaró con metanol. El filtrado se concentró y el compuesto 115 se aisló como una mezcla racémica mediante CombiFlash® eluyendo con un gradiente de metanol al 0-10 % en DCM. Rendimiento del compuesto 115: 95 mg (29 %). Se utilizó HPLC semipreparativa quirial (columna Chiralpak® AD de 250 × 21 mm, 5 µm, 90/10 hexanos/EtOH, 40 ml/min) para aislar 42 mg del primer isómero *R* de elución (*R*<sub>T</sub> = 12-14 m, >99 % ee, compuesto 115a) y 40 mg del segundo isómero *S* de elución (*R*<sub>T</sub> = 15-18 m, >98 % ee, compuesto 115b). La identidad de los isómeros *R* y *S* se asignó en función del orden de elución de un compuesto estructuralmente similar informado por Coleman et al. 47 J. Med. Chem. 4834 (2004).

20

Estructuras 28c (ácido (R)-3-(6-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)piridin-3-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico) y 31c (ácido (R)-3-(1-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-6-oxo-1,6-dihidropiridin-3-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico)



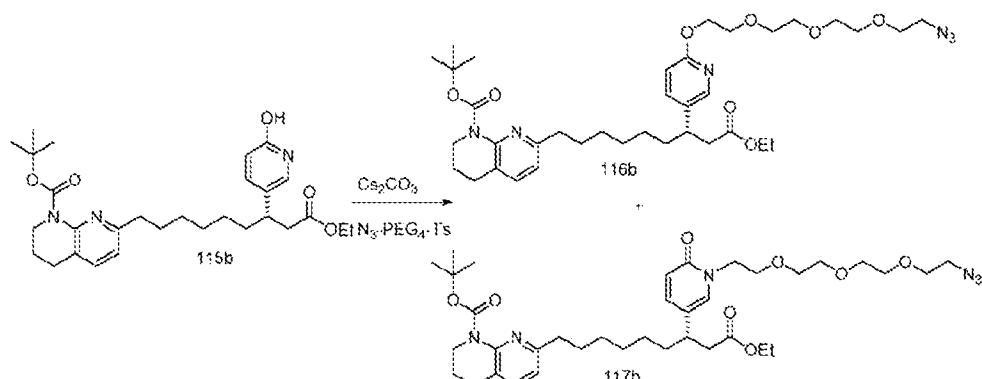
A una solución del compuesto 115a (41 mg, 0,08 mmol) y N<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-OTs (61 mg, 0,16 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadió carbonato de cesio (53 mg, 0,16 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (1 ml) y luego se extrajo con acetato de etilo (3 x 3 ml). La fase orgánica se concentró a presión reducida. La mezcla bruta de regioisómeros *N*-y *O*-alquilados se usó posteriormente sin purificación adicional.

30

A una solución de los compuestos 116a y 117a (58 mg, 0,08 mmol, mezcla 4:6 de 9a:10a) en THF (1,0 ml) y agua desionizada (1,0 ml) se le añadió hidróxido de litio (6 mg, 0,25 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después a 35 °C durante 2 horas. Se añadió una porción adicional de hidróxido de litio

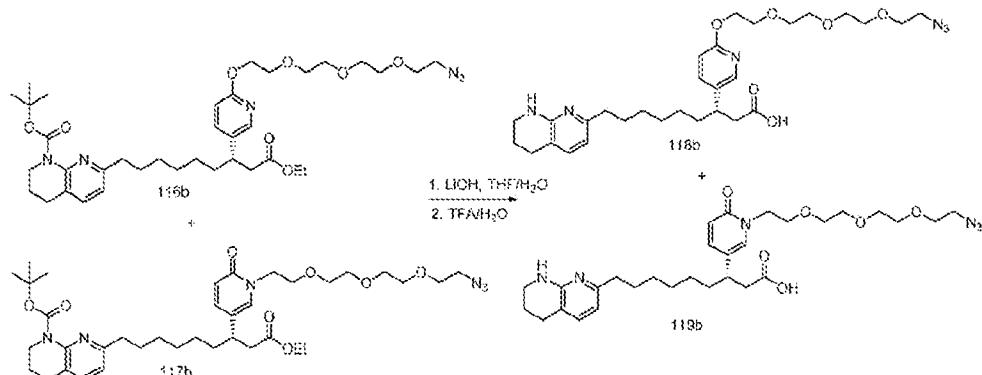
5 (4 mg, 0,16 mmol) y la temperatura de reacción se aumentó a 40 °C. Tras agitar durante 3 horas, se añadió una porción final de hidróxido de litio (4 mg, 0,25 mmol, 16 mg en total, 0,66 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se acidificó a un pH de 7 con HCl acuoso 6 N y se concentró a presión reducida. Los regiosímeros, compuestos 118a y 119a, se separaron mediante CombiFlash® eluyendo con un gradiente de metanol al 0-5 % en DCM que contenía ácido acético al 0,5 %. El compuesto 118a se purificó adicionalmente mediante HPLC de fase inversa (Thermo Scientific™ Aquasil™ C18, 250 × 21,2 mm, 5 µm, 20 ml/min, TFA al 0,1 % en agua/ACN, elución en gradiente), proporcionando 13 mg del compuesto 118a (estructura 28c). El compuesto 119a se purificó en las mismas condiciones, proporcionando 16 mg del compuesto 119a (estructura 31c).

10 Estructuras 29c (ácido (S)-3-(6-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)piridin-3-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico) y 30c (ácido (S)-3-(1-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-6-oxo-1,6-dihidropiridin-3-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico)



15 20 A una solución del compuesto 115b (40 mg, 0,08 mmol) y N<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-OTs (58 mg, 0,16 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadió carbonato de cesio (51 mg, 0,16 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se inactivó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (1 ml) y luego se extrajo con acetato de etilo (3 x 3 ml). La fase orgánica se concentró a presión reducida. La mezcla bruta de regiosímeros N- y O-alquilados se usó posteriormente sin purificación adicional.

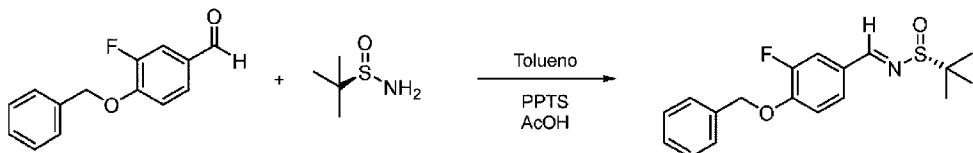
25



30 A una solución de los compuestos 116b y 117b (56 mg, 0,08 mmol, mezcla 4:6 de 9a:10a) en THF (0,75 ml) y agua desionizada (0,75 ml) se le añadió hidróxido de litio (6 mg, 0,25 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 45 °C durante 2,5 horas. Se añadió una porción adicional de hidróxido de litio (6 mg, 0,25 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2,5 horas. La temperatura de reacción se redujo a 35 °C y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se acidificó a pH = 7 con HCl acuoso 6 N y se concentró a presión reducida. Los regiosímeros, compuestos 118b y 119b, se separaron mediante CombiFlash eluyendo con un gradiente de metanol al 0-5 % en DCM que contenía ácido acético al 0,5 %. El compuesto 118b se purificó adicionalmente mediante HPLC de fase inversa (Thermo Scientific™ Aquasil™ C18, 250 × 21,2 mm, 5 µm, 20 ml/min, TFA al 0,1 % en agua/ACN, elución en gradiente), proporcionando 14 mg del compuesto 118b (estructura 29c). El compuesto 119b se purificó en las mismas condiciones, produciendo 18 mg del compuesto 119b (estructura 30c).

35 40 Síntesis de la estructura 32c (ácido (R)-3-(4-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(N-metil-5-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)pentanamido)propanoico)

120                    121                    122



5 Al compuesto 120 (2,75 g, 11,94 mmol) en tolueno (80 ml) sobre tamices 3 Å se le añadió el compuesto 121 (5,79 g, 47,78 mmol), seguido de PPT (300 mg, 1,19 mmol) y luego AcOH (683 uL, 11,94 mmol). La reacción se llevó a refluro durante la noche. Una vez completada, la reacción se inactivó mediante la adición de bicarbonato de sodio saturado.

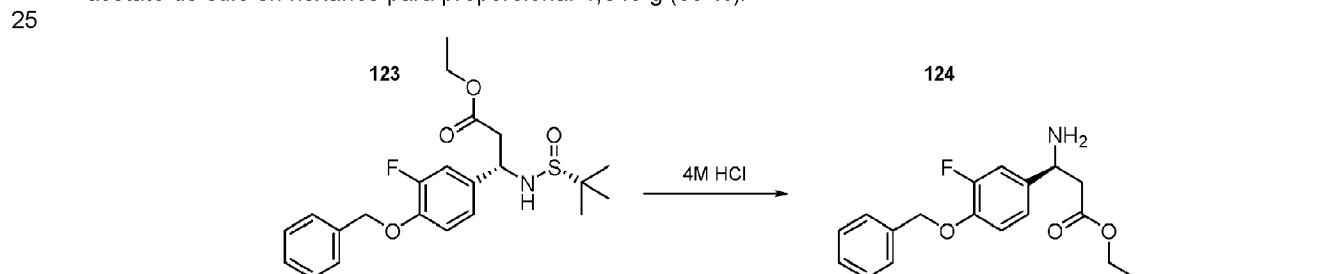
10 10 La capa orgánica se diluyó con 2 volúmenes de acetato de etilo, se separó y se filtró sobre sulfato de sodio. El producto se aisló sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo (0-30 %) en hexano para proporcionar 2,054 g (54 %).

122

123



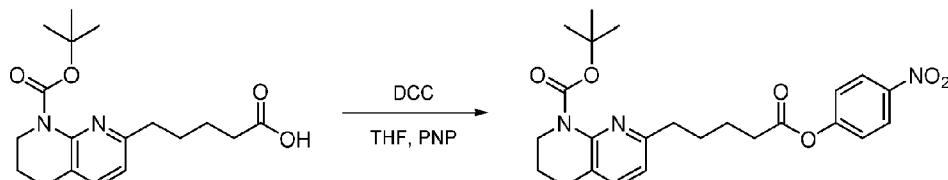
15 A DIA (2,85 ml, 20,33 mmol) en THF (15 ml) a -78 °C se le añadió gota a gota una solución 2,5M de n-BuLi (7,76 ml, 19,41 mmol). La agitación se continuó durante 5 minutos a -78 °C y se añadió acetato de etilo (1,81 ml, 18,48 mmol) gota a gota. La agitación se continuó durante 10 minutos adicionales a -78 °C y se añadió gota a gota una solución de triisopropóxido de cloro titanio (9,27 ml, 38,381 mmol) en THF (10 ml). La agitación continuó durante 15 minutos adicionales a -78 °C y se añadió gota a gota una solución del compuesto 122 (2,054 g, 6,16 mmol) en THF (10 ml). La agitación continuó durante 1,5 horas a -78 °C. Al finalizar, la reacción se inactivó mediante la adición de bicarbonato de amonio saturado. La suspensión se diluyó con 6 volúmenes de acetato de etilo y la capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto se aisló sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos para proporcionar 1,043 g (53 %).



30 Al compuesto 123 (1,043 g, 2,47 mmol) agitando en MeOH (3 ml) se le añadió una solución de HCl 4M en dioxano (3,09 ml, 12,37 mmol). Una vez completada la desprotección, la solución se diluyó con agua (8 ml) y se lavó dos veces con éter dietílico (6 ml). La capa acuosa se ajustó posteriormente a un pH de 11 con hidróxido de sodio. El precipitado se extrajo con acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron, obteniéndose 0,616 g (78,5 %) del producto 124 que se usó sin purificación adicional.

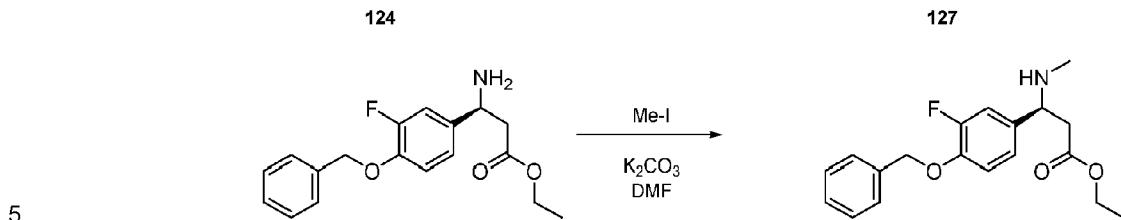
125

126

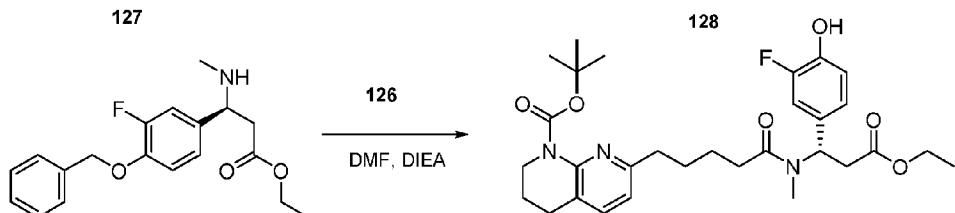


35 35 Al compuesto 125 (92,1 mg, 0,275 mmol) en THF (1,5 ml) a 0 °C se le añadió DCC (68,1 mg, 0,331 mmol). Después de 5 minutos, se añadió PNP (106,1 mg, 0,331 mmol), se retiró el baño de hielo y se continuó agitando durante 1 hora. Al finalizar, la suspensión se enfrió a -20 °C durante 1 hora y el precipitado se retiró por filtración. El sobrenadante se concentró para proporcionar 129 mg (103 %) de sustancia bruta 126 que posteriormente se utilizó sin purificación adicional.

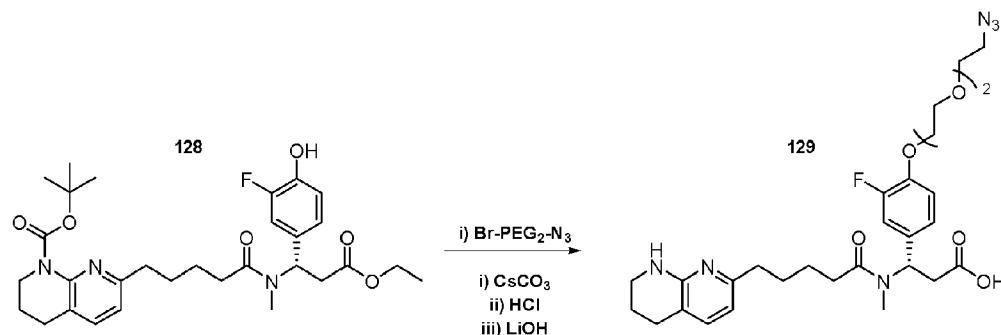
40



Una mezcla que contenía el compuesto 124 (148,6 mg, 0,468 mmol) y carbonato de potasio (129 mg, 0,937 mmol) en DMF (2 ml) se trató con yoduro de metilo (66,5 mg, 0,468 mmol) y se agitó a 50 °C durante 3 horas. Una vez completada la alquilación, todas las sustancias volátiles se retiraron y el producto se aisló sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos, cada uno tamponado con TEA al 1 %, para proporcionar 94,6 mg (61 %).

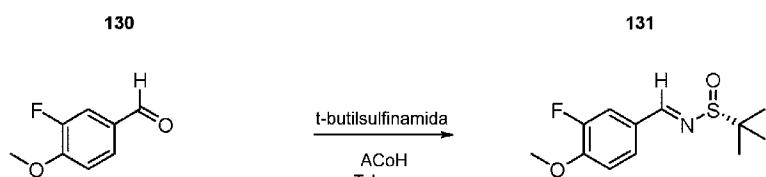


Al compuesto 127 (94,5 mg, 0,285 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió DIEA (149  $\mu$ L, 0,856 mmol) seguido del compuesto 126 (129,9 mg, 0,285 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 hora a 80 °C. Al finalizar, todas las sustancias volátiles se retiraron y la sustancia bruta se disolvió en MeOH, se trató con paladio sobre carbono al 10 % (20 mg) y el matraz se cargó con 60 PSI de hidrógeno. Al finalizar, la suspensión se filtró. El sobrenadante se concentró y el producto bruto obtenido se utilizó posteriormente sin purificación adicional.



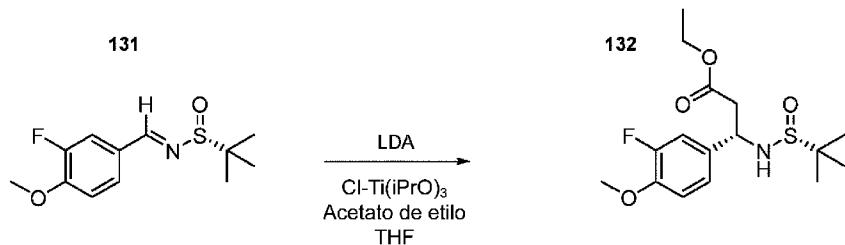
Una mezcla que contenía el compuesto 128 (159 mg, 0,285 mmol), Bromo-PEGz-Azida (74,7 mg, 0,314 mmol) y carbonato de cesio (204 mg, 0,627 mmol) en DMF (2 ml) se calentó a 60 °C durante 2 horas. Al finalizar, todas las sustancias volátiles se retiraron y la sustancia bruta se trató con HCl 4 M en dioxano (0,5 ml, 2 mmol) y se calentó a 40 °C durante 3 horas. Al finalizar, se retiraron todas las sustancias volátiles. La sustancia bruta se suspendió en una mezcla de THF (1 ml), MeOH (1,5 ml) y H<sub>2</sub>O (1,5 ml), se trató con hidróxido de litio (83,5 mg, 3,48 mmol) y se calentó a 40 °C durante 16 horas. Al finalizar, el pH se ajustó a 3 con TFA y el producto se aisló por separación en una columna Phenomenex® Gemini® C18 (21,2x250 mm, 5 micrómetros) eluyendo con un gradiente de acetonitrilo en agua que contenía TFA al 0,1 % para proporcionar 33,1 mg (20 %).

Síntesis de la estructura 33c (ácido (R)-1-azido-13-(3-fluoro-4-metoxifénil)-12-(5-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)pentanoil)-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-oico)

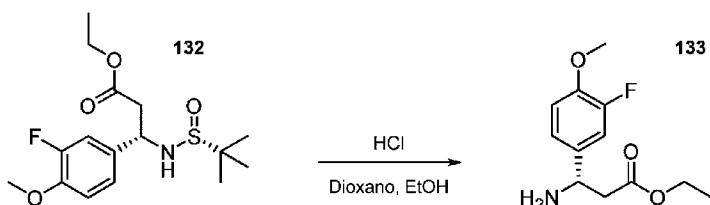


35 Una mezcla que contenía el compuesto 130 (1,5 g, 9,73 mmol), (R) t-butil sulfinamida (2,36 g, 19,46 mmol) y AcOH (0,14 ml) en tolueno (45 ml) se sometió a reflujo en un matraz equipado con una trampa Dean-Stark durante 16 horas. Una vez completada, la reacción se inactivó mediante la adición de bicarbonato de sodio saturado. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto se aisló mediante separación sobre silice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos para proporcionar 1,714 g (68,4 %).

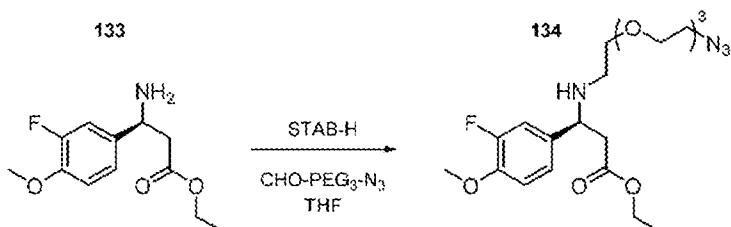
5



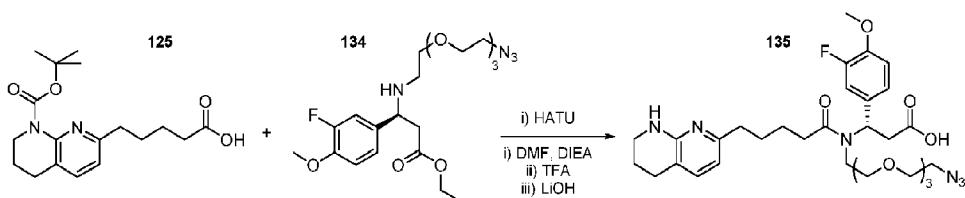
A DIA (3,056 ml, 21,80 mmol) en THF (18 ml) a -78 °C se le añadió gota a gota una solución 2,5M de n-BuLi (8,324 ml, 20,81 mmol). La agitación se continuó durante 5 minutos a -78 °C y se añadió gota a gota acetato de etilo (1,94 ml, 19,82 mmol). La agitación se continuó durante 10 minutos adicionales a -78 °C y se añadió gota a gota una solución de triisopropóxido de cloro titanio (9,94 ml, 41,62 mmol) en THF (10 ml). La agitación continuó durante 15 minutos adicionales a -78 °C y se añadió gota a gota una solución del compuesto 131 (1,70 g, 6,61 mmol) en THF (12 ml). La agitación continuó durante 1,5 horas a -78 °C. Al finalizar, la reacción se inactivó mediante la adición de bicarbonato de amonio saturado. La suspensión se diluyó con 7 volúmenes de acetato de etilo y la capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto se aisló sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos para proporcionar 0,984 g (43 %).



20 Al compuesto 132 (0,975 g, 2,82 mmol) en EtOH (6 ml) a 0 °C se le añadió HCl 4 M (2,12 ml, 8,47 mmol) en dioxano y se agitó durante 30 minutos. Una vez completada, la reacción se diluyó con agua (15 ml) y se lavó con éter dietílico. La capa orgánica se separó y el pH de la capa acuosa se ajustó a 12 con hidróxido de sodio. La capa acuosa se lavó con 5 volúmenes de acetato de etilo y la capa orgánica se separó, se filtró sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto se aisló mediante separación sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos que contenían TEA al 1 % para proporcionar 0,434 g (64 %).



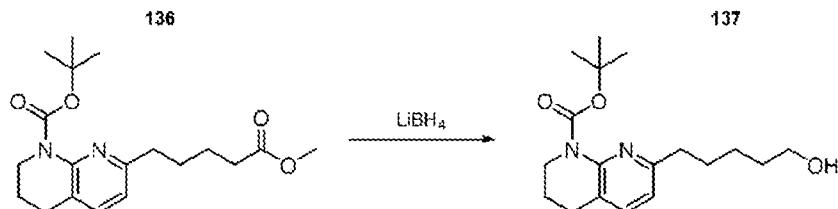
A una mezcla del compuesto 133 (0,120 g, 0,497 mmol) y PEG (0,151 g, 0,696 mmol) en THF (2 ml) sobre tamices moleculares de 3 Å se le añadió STAB-H (0,253 g, 1,19 mmol) y la suspensión se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Una vez completada, la reacción se inactivó mediante la adición de bicarbonato de sodio saturado y la sustancia bruta se extrajo con tres porciones de acetato de etilo. Los extractos orgánicos separados se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. La sustancia bruta obtenida se utilizó posteriormente sin purificación adicional.



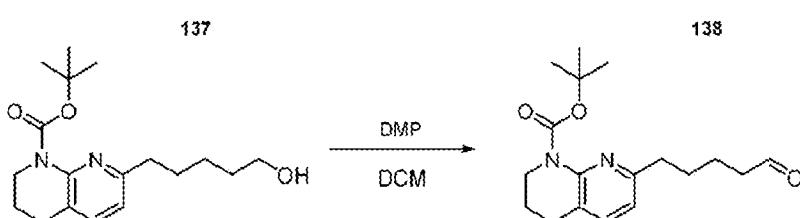
40 El compuesto 134 (0,200 g, 0,597 mmol) en DMF (2 ml) se trató con HATU (0,227 g, 0,597 mmol) y se agitó durante 5 minutos. Al éster activado se le añadió DIEA (0,259 ml, 1,49 mmol) seguido del compuesto 125 (0,220 g, 0,497 mmol) en DMF (1 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 1 hora. Todas las sustancias volátiles se retiraron y la sustancia bruta resultante se trató con TFA puro (3,8 ml) y se agitó durante 3 horas a 40 °C. Una vez completada la eliminación de BOC, todas las sustancias volátiles se retiraron y la sustancia bruta se suspendió en una mezcla de

- 5 THF (4 ml), agua (8 ml) y MeOH (8 ml). La mezcla resultante se trató con LiOH (71,6 mg, 2,98 mmol) y se calentó a 40 °C durante 16 horas. Al finalizar, el pH se ajustó a 3 con TFA y el producto se aisló por separación en una columna Phenomenex® Gemini® c18 (21,2x250 mm, 5 micrómetros) eluyendo con un gradiente de acetonitrilo en agua que contenía TFA al 0,1 % para proporcionar 56,2 mg (18 %, 3 etapas).

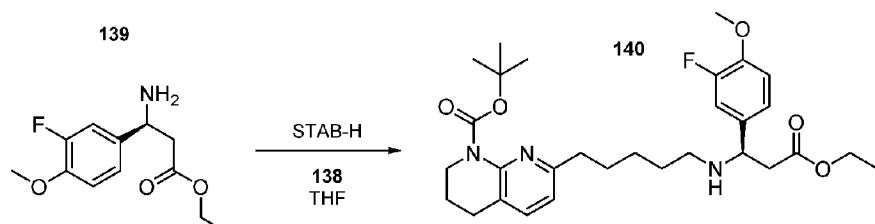
10 Síntesis de la estructura 34c (ácido (S)-1-azido-13-(3-fluoro-4-metoxifenil)-12-(5-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)pentil)-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-oico)



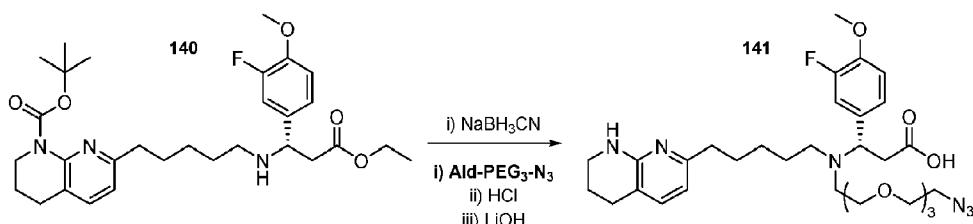
- 15 El compuesto 136 (0,500 g, 1,45 mmol) en una mezcla de THF (9,0 ml) y MeOH (0,5 ml) a 0 °C se trató con borohidruro de litio (94,5 mg, 4,34 mmol). Se retiró el enfriamiento y se continuó agitando hasta que cesó el desprendimiento de gas. La mezcla de reacción se diluyó con 5 volúmenes de EtOAc. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de amonio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto se aisló mediante elución sobre sílice usando un gradiente de acetato de etilo en hexanos para proporcionar 309 mg (67 %).



- A una solución que contenía el compuesto 137 (0,305 g, 0,952 mmol) en DCM (9 ml) a 0 °C se le añadió reactivo de Martin en varias porciones. Se añadieron varias gotas de agua, se retiró el enfriamiento y la reacción se agitó durante 3 horas. Al finalizar, la mezcla se lavó con bicarbonato de sodio saturado y luego con tiosulfato de sodio saturado. La fase orgánica separada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto 138 se separó sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM para proporcionar 140 mg (46 %).



- 30 A una mezcla que contenía el compuesto 1 (85,2 mg, 0,353 mmol) y 138 (134,9 mg, 0,424 mmol) en THF (2,5 ml)  
 sobre tamices moleculares de 3 Å se le añadió STAB-H (0,150 g, 0,706 mmol) y la suspensión resultante se calentó a  
 40 °C durante 16 horas. Al finalizar, la reacción se diluyó con 5 volúmenes de acetato de etilo y se trató con bicarbonato  
 de sodio saturado. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto se  
 35 aisló mediante separación sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM que contenía TEA al 1 % para  
 proporcionar 64 mg (33 %).

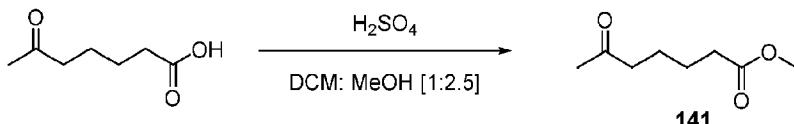


- 40 A una mezcla que contenía el compuesto 140 (60 mg, 0,110 mmol), Ald-PEG 3-N<sub>3</sub> (71,9 mg, 0,331 mmol) y AcOH (3  $\mu$ L, 0,0276 mmol) en MeOH (1 ml) sobre tamices moleculares de 3 Å se le añadió cianoborohidruro de sodio (28,9 mg, 0,276 mmol) y la reacción se agitó a 40 °C durante 3 horas. Una vez completada, la mezcla se enfrió a 0 °C,

5 se añadió agua (0,15 ml) y la solución se acidificó a un pH de 7 usando HCl (4M) en dioxano. Todo el metanol se retiró posteriormente, se añadió HCl 4 M (0,138 ml, 0,552 mmol) en dioxano y la mezcla se agitó a 40 °C durante 2 horas. Una vez completada la eliminación de BOC, todas las sustancias volátiles se retiraron y la sustancia bruta se suspendió en una mezcla de THF (1 ml), agua (2 ml) y MeOH (2 ml) y se trató con hidróxido de litio (26,5 mg, 1,104 mmol). Una vez completada la eliminación del éster, el pH se ajustó a 3 mediante la adición de TFA y el producto se aisló mediante separación en una columna C18 Phenomenex® (21,2x250 mm) eluyendo con un gradiente de acetonitrilo en agua que contenía TFA al 0,1 % para proporcionar 16,4 mg (24 %, 3 etapas).

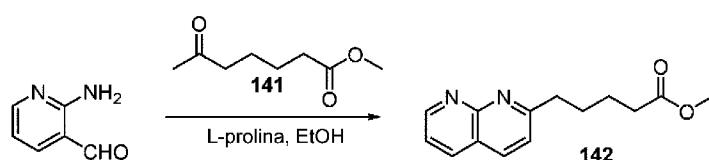
Síntesis de la estructura 36c (ácido (S)-3-(4-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico)

15



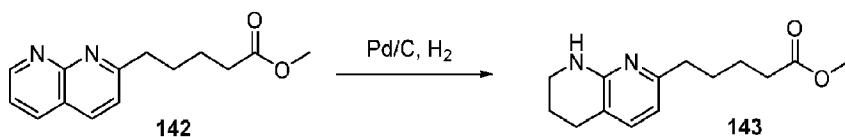
A una solución de ácido 6-oxoheptanoico (9,74 g, 68 mmol) en DCM (30 ml) y MeOH (75 ml) se le añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (0,18 ml, 3,4 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se sometió a refljo durante la noche. A continuación, la mezcla de reacción se concentró hasta obtener un aceite, se redissolvió en DCM (150 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. (2 × 40 ml) y salmuera (40 ml). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento del compuesto 141: 10,2 g (95 %). <sup>1</sup>H RMN(400 MHz, DMSO-d6): δ 3,58 (s, 3H), 2,43 (t, 2H), 2,29 (t, 2H), 1,46 (m, 4H).

25



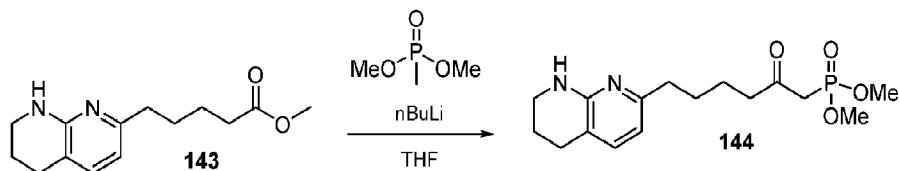
A una solución del compuesto 141 (10,2 g, 65 mmol) y 2-amino-3-formilpiridina (7,89 g, 65 mmol) en EtOH (80 ml) se le añadió L-prolina (3,72 g, 32 mmol). La mezcla de reacción se sometió a refljo durante la noche. Despues, la mezcla de reacción se concentró, se disolvió en EtOAc (50 ml) y se lavó con agua (3 × 30 ml). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de EtOAc en DCM (10-100 %). Rendimiento del compuesto 142: 6,08 g (39 %). Masa calculada para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 245,13, hallado: 245,21.

35



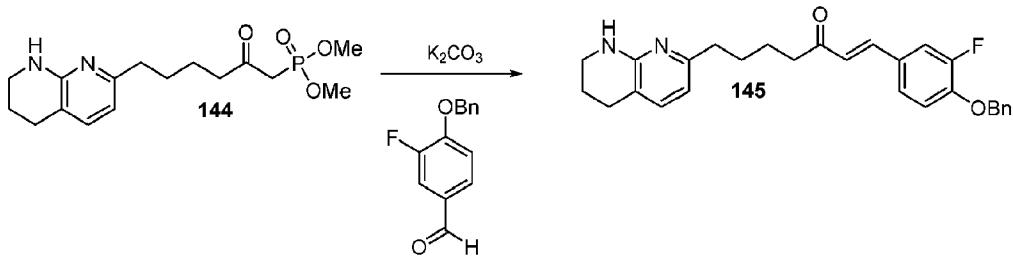
40

A una solución del compuesto 142 (6,08 g, 24,9 mmol) en MeOH (50 ml) se le añadió Pd/C (10 % de carga, tipo Degussa, 1,99 g, 1,87 mmol). El matraz de reacción se cargó con nitrógeno, se evacuó y se llenó con nitrógeno tres veces. Este proceso se repitió con hidrógeno, y el recipiente de reacción se cargó finalmente con hidrógeno (1 atm) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite®, la almohadilla se enjuagó con MeOH y el filtrado se concentró. El producto, compuesto 143, se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional asumiendo un rendimiento del 100 %. Masa calculada para C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 249,16, hallado: 249,08.



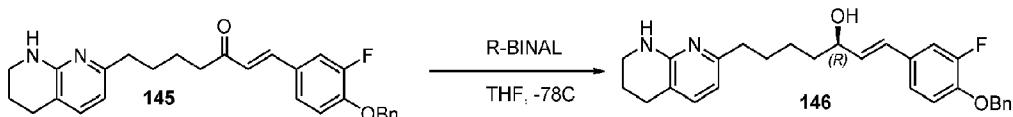
45

A una solución de metilfosfonato de dimetilo (12,3 g, 100 mmol) en THF anhidro (120 ml) se le añadió una solución de n-BuLi (2,5 M en hexanos, 40 ml, 100 mmol) mediante una bomba de jeringa durante 1 h a -78 °C. Se añadió una solución del compuesto 143 (6,175 g, 24,9 mmol) en THF (40 ml) a la mezcla de reacción durante 45 m a -78 °C. Despues de agitar durante 20 m a -78 °C, la mezcla de reacción se inactivó con solución de NH<sub>4</sub>Cl sat. ac. (200 ml), se calentó a t y se extrajo con EtOAc (400 ml). La capa orgánica se lavó con agua (200 ml) y salmuera (200 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento del compuesto 144: 7,86 g (93 %). Masa calculada para C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P [M+H]<sup>+</sup>: 341,17, hallado: 341,17.



Una suspensión de 3-fluoro-4-(fenilmetoxi)-benzaldehído (0,38 g, 1,65 mmol), compuesto 144 (0,67 g, 1,98 mmol) y carbonato de potasio anhídrico (0,547 g, 3,96 mmol) en THF (13,5 ml) se sometió a refluxo durante la noche. Se añadieron 3-fluoro-4-(fenilmetoxi)-benzaldehído (0,19 g, 0,83 mmol) y carbonato de potasio (0,23 g, 1,65 mmol) adicionales y la mezcla de reacción se sometió a refluxo durante 4 h adicionales. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con agua (30 ml) y salmuera (30 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de MeOH en DCM (0-10 %). Rendimiento del compuesto 145: 446 mg (61 %). Masa calculada para  $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{FN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 445,23, hallado: 445,41.

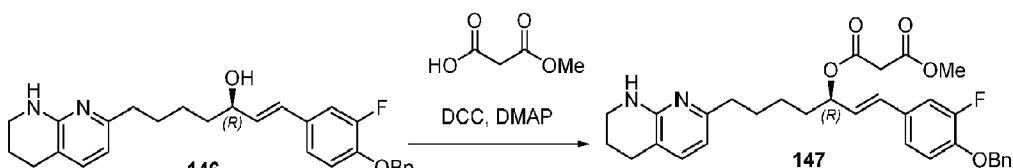
15



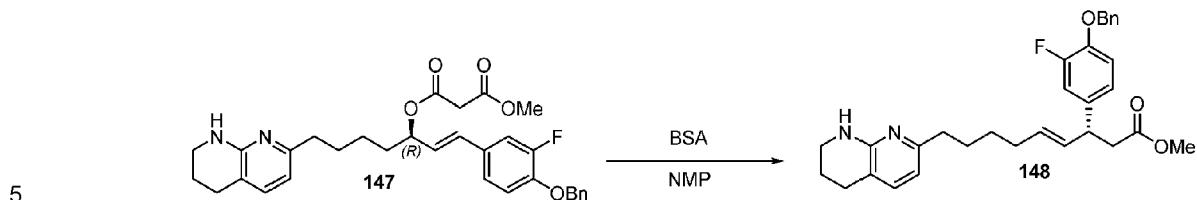
Preparación de R-BINAL: A una suspensión de LAH (0,396 g, 10,4 mmol, 0,98 eq) THF seco (34 ml) se le añadió EtOH (0,492 g, 10,65 mmol, 1,00 eq) como una solución en THF (3,2 ml) durante 10 m mientras se mantenía una temperatura interna < 35 °C. Después de envejecer durante 30 m, se añadió R-BINOL (3,05 g, 10,65 mmol, 1,00 eq) como una solución en THF (10 ml), manteniendo una temperatura interna < 35 °C (aprox. 10 minutos). Después de agitar durante 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo seco/acetona a -78 °C.

El compuesto 145 (1,18 g, 2,65 mmol) se secó azeotrópicamente con tolueno anhídrico (50 ml) y se disolvió en THF anhídrico (12 ml). La solución del compuesto 145 se añadió gota a gota a la solución de R-BINAL mediante una bomba de jeringa durante 45 m a -78 °C. Después de 1,5 h, el recipiente de reacción se transfirió a un depósito muy grande, se llenó con hielo seco/acetona y se cubrió con papel de aluminio. La mezcla de reacción se agitó ON a -78 °C. La mayor parte de la reducción se produjo dentro de las primeras 1,5 h con solo una pequeña cantidad de conversión adicional durante la noche. La reacción se inactivó mediante la adición de solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat. ac. (150 ml) y se calentó a temperatura ambiente. La mezcla se acidificó adicionalmente a pH = 7 usando HCl 6 N y luego se extrajo con EtOAc (2 × 250 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (125 ml) y salmuera (125 ml). La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de MeOH en DCM (0-5 %). Rendimiento del compuesto 146: 634 mg (53 %). La pureza quiral se determinó mediante HPLC quirala analítica, columna Chiraldak AD-H de 4,6 × 250 mm, 5 micrómetros, EtOH, 0, 1 % de, dietilamina isocrática, 1,75 ml/min. El primer isómero R eluyente tenía una pureza del 86 % en área, lo que corresponde al 72 % ee. El compuesto 6 se purificó adicionalmente mediante HPLC semipreparativa quirala (CHIRALPAK AD-H 21,2 × 250 mm, 5 micrómetros, EtOH, 0,1 % de dietilamina, 20 ml/min). Rendimiento final del compuesto 146: 445 mg (98 % ee). Masa calculada para  $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{FN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 447,25, hallado: 447,30.

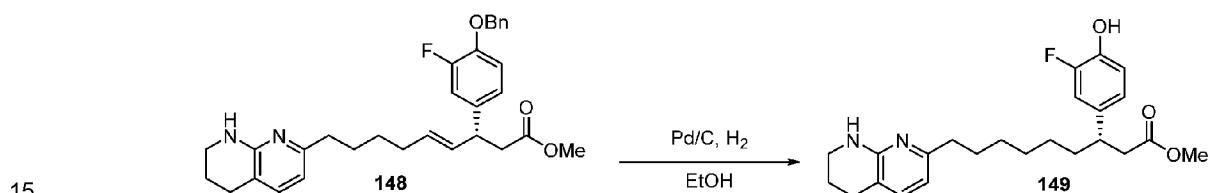
40



A una solución del compuesto 146 (0,325 g, 0,73 mmol) y éster monometílico del ácido malónico (0,103 g, 0,87 mmol) en DCM (3 ml) se añadió una solución de DMAP (9 mg, 0,073 mmol) en DCM. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió DCC (0,180 g, 0,87 mmol). El baño de refrigeración se retiró y la reacción se agitó a TA. La mezcla de reacción se diluyó después con DCM (10 ml) y se filtró. El filtrado se concentró y se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria, eluyendo con un gradiente de MeOH (0-5 %) en DCM. Rendimiento del compuesto 147: 142 mg (37 %). Masa calculada para  $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{FN}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 547,26, hallado: 547,58.



A una solución del compuesto 147 (0,232 g, 0,42 mmol) en NMP (0,5 ml) se le añadió *N*,*O*-bis(trimetilsililo)acetamida (0,229 g, 1,12 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a 60 °C durante 30 m. Se añadió salmuera (58  $\mu$ L) en dos porciones durante 5 m. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 3 h y, a continuación, a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (12 ml) y se lavó con agua (3 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (12 ml). La capa orgánica combinada se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de MeOH en DCM. Rendimiento del compuesto 148: 140 mg (66 %). Masa calculada para  $C_{31}H_{35}FN_2O_3 [M+H]^+$ : 503,27, hallado: 503,29.



15

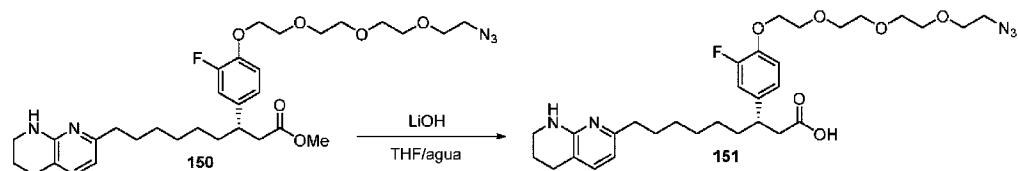
A una solución del compuesto 148 (0,169 g, 0,34 mmol) en EtOH (3 ml) se añadió una suspensión de Pd/C (10 % de carga, 36 mg, 0,034 mmol) en EtOH (1 ml). El recipiente de reacción se presurizó y se purgó con hidrógeno tres veces. El recipiente de reacción se represurizó a 55 psi durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH (5 ml) y se filtró. El filtrado se concentró y el producto, el compuesto 149, se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional, suponiendo un rendimiento del 100 %. Masa calculada para  $C_{24}H_{31}FN_2O_3 [M+H]^+$ : 415,24, hallado: 415,07.

20

25

30

A una solución del compuesto 149 (139 mg, 0,34 mmol) y tosilato de azido-PEG<sub>4</sub> (0,188 mg, 0,50 mmol) en DMF (2,5 ml) se le añadió carbonato de cesio (164 mg, 0,50 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 1 h y a continuación se inactivó con solución de NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. (3 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 5 ml). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Masa calculada para  $C_{32}H_{46}FN_5O_6 [M+H]^+$ : 616,35, hallado: 616,90.

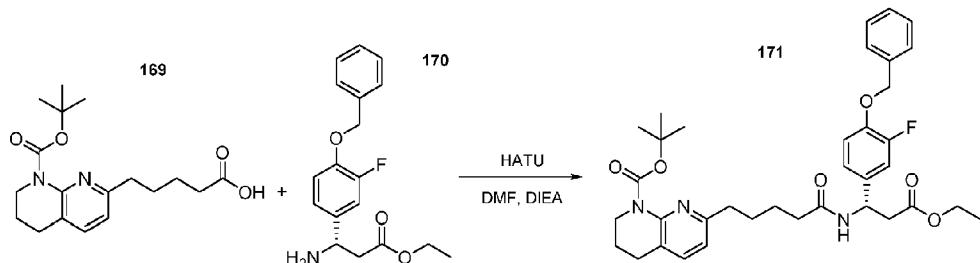


35

40

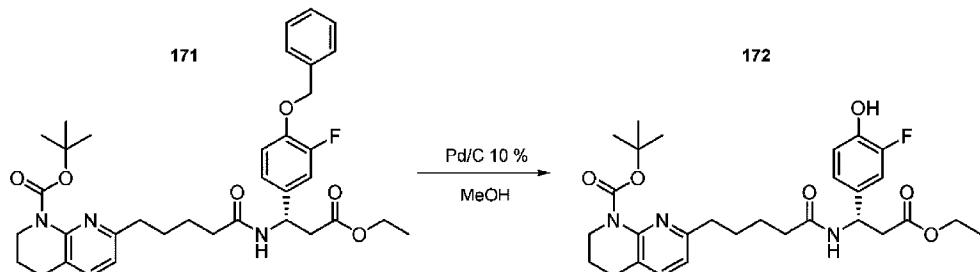
A una solución del compuesto 150 (0,207 mg, 0,34 mmol) en THF (1,5 ml) y agua (1,5 ml) se añadió hidróxido de litio (0,040 g, 1,68 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante la noche. A la mañana siguiente, la mezcla de reacción se acidificó con HCl 6 N a pH = 7 y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en ACN al 35 % en HzO, TFA al 0,1 % y se purificó mediante RP-HPLC (Thermo Aquasil C18, 250 × 21 mm, 5  $\mu$ m, 20 ml/min, gradiente de ACN en HzO que contenía TFA al 0,1 %). Rendimiento del compuesto 151 (SM 36): 125 mg (52 % en 3 etapas). Masa calculada para  $C_{31}H_{44}FN_5O_6 [M+H]^+$ : 602,34, hallado: 602,85.

- 5 Síntesis de la estructura 37c (ácido (S)-3-(4-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(5-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)pentanamido)propanoico)

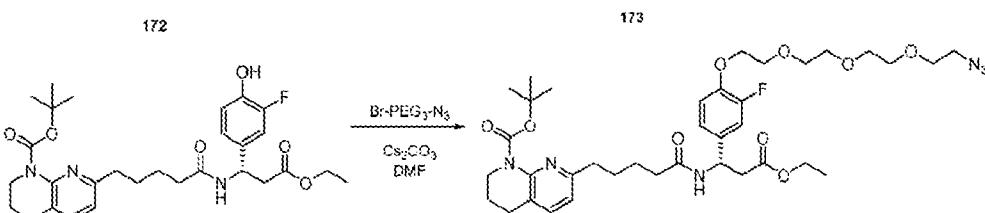


- 10 El compuesto 169 (90 mg, 0,268 mmol) en DMF (1,5 ml) se trató con HATU (112 mg, 0,295 mmol) y se agitó durante 5 minutos. Posteriormente se añadió una mezcla que contenía el compuesto 170 (94 mg, 0,295 mmol) y DIPEA (0,154 ml, 0,884 mmol) en DMF (0,5) y se continuó agitando durante 1 hora. Al completarse, se retiraron todas las sustancias volátiles y el compuesto 171 se aisló mediante separación sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM, proporcionando 123 mg (72 %).

15

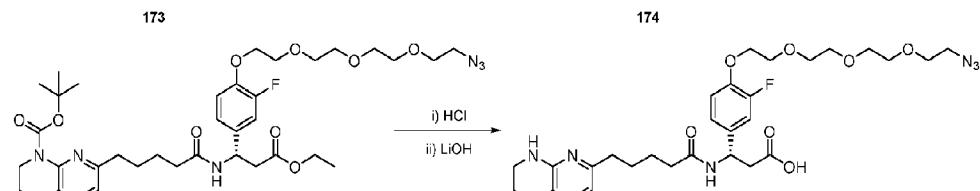


- 20 Se cargó una suspensión que contenía paladio sobre carbono al 10 % (21 mg, 0,0194 mmol) y el compuesto 171 (123 mg, 0,194 mmol) en MeOH (2 ml) con hidrógeno a 60 PSI y se agitó durante 1 hora. Una vez completada, la suspensión se filtró sobre Celite® y se concentró para proporcionar 88 mg (83 %) de sustancia bruta que se usó posteriormente sin purificación adicional.



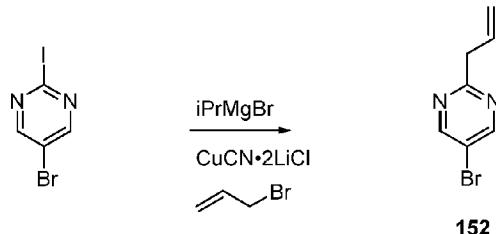
- 25 Una suspensión que contenía el compuesto 172 (87 mg, 0,160 mmol), Br-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (50 mg, 0,176 mmol) y carbonato de cesio (115 mg, 0,352 mmol) en DMF (1 ml) se calentó a 60 °C y se agitó durante 2 horas. Al completarse, se retiraron todas las sustancias volátiles y el compuesto 173 se aisló mediante separación sobre sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM, proporcionando 91 mg (76 %).

30

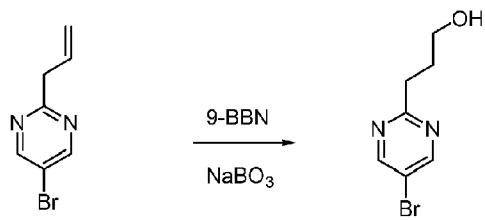


- 35 El compuesto 173 (50 mg, 0,067 mmol) en dioxano (0,5 ml) se trató con una solución de HCl 4M (0,671 mmol, 0,168 ml) en dioxano y se agitó a 40 °C durante 3 horas. Al finalizar, se retiraron todas las sustancias volátiles. La sustancia bruta se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O (0,4 ml), THF (0,2 ml) y MeOH (0,4 ml), se trató con LiOH (8 mg, 0,356 mmol) y se agitó a 40 °C durante 16 horas. Al finalizar, el pH se ajustó a 3 con TFA y el producto se aisló por separación en una columna Phenomenx Gemini C18 (21,2x250 mm, 5 micrómetros) eluyendo con un gradiente de acetona en agua que contenía TFA al 0,1 % para proporcionar 25 mg (60 %, 2 etapas).

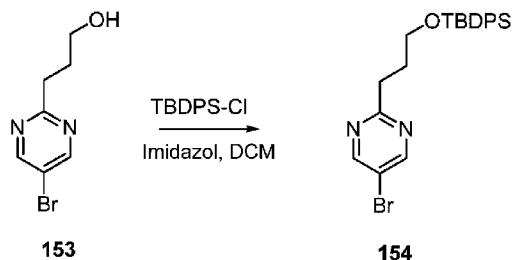
- 5 Síntesis de la estructura 38c (ácido (S)-3-(2-(3-((2-(2-azidoetoxi)etoxi)amino)-3-oxopropil)pirimidin-5-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico) y la estructura 39c (ácido (S)-3-(2-(1-azido-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azahexadecan-16-il)pirimidin-5-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico)



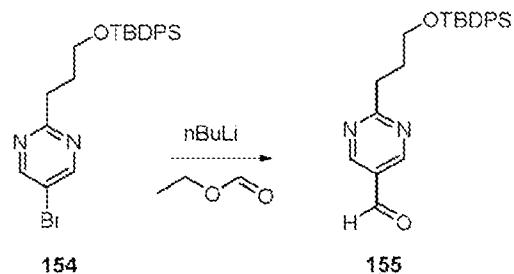
- 10 A una solución de 5-bromo-2-yodo-pirimidina (8,00 g, 28,1 mmol) en THF anhídrico (95 ml) se le añadió una solución de i-PrMgBr en THF (0,75 M, 56 ml, 42,0 mmol) a -78 °C mientras se mantenía una temperatura interna < -70 °C (aprox. 15 m). La solución resultante se agitó a continuación durante 15 minutos antes de añadir una solución de CuCN•2LiCl en THF (1 M, 31 ml, 31,0 mmol) y a continuación bromuro de alilo (5,10 g, 42 mmol) como una solución en THF (10 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se inactivó con MeOH (40 ml) y se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de EtOAc en hexanos (0-20 %). Rendimiento del compuesto 152: 4,13 g (74 %). Masa calculada para  $C_7H_7BrN_2 [M+H]^+$ : 198,99, hallado: 199,05.
- 15



- 20 A una solución del compuesto 152 (7,70 g, 38,7 mmol) en THF (115 ml) se le añadió una solución de 9-BBN en THF (0,5 M, 131 ml, 65,8 mmol) a 0 °C durante 30 m. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. A la mezcla de reacción se le añadió una suspensión de  $NaHCO_3$  (48,7 g, 580 mmol) en agua (100 ml) seguido de una suspensión de  $NaBO_3$  monohidratado (46,3 g, 464 mmol) en agua (100 ml) a 0 °C. El baño de enfriamiento se retiró y la mezcla se agitó vigorosamente durante 1 h. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (200 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera (100 ml). La capa de salmuera se extrajo de nuevo con EtOAc (100 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se filtró y se concentró para proporcionar ~15 g de aceite amarillo bruto. La sustancia bruta se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de EtOAc en hexanos (50-100 %). Rendimiento del compuesto 153: 3,44 g (41 %). Masa calculada para  $C_7H_9BrN_2O [M+H]^+$ : 217,00, hallado: 216,97.
- 25
- 30



- 35 A una solución del compuesto 153 (3,44 g, 15,8 mmol) en DCM (40 ml) se añadió imidazol (1,73 g, 25,4 mmol) y una solución de TBPDSCl (5,23 g, 19,0 mmol) en DCM (12 ml) a 0 °C. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (75 ml) y se lavó con agua (50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de EtOAc (0-8 %) en hexanos. Rendimiento del compuesto 154: 5,56 g (77 %). Masa calculada para  $C_{23}H_{27}BrN_2OSi [M+H]^+$ : 455,12, hallado: 455,44.
- 40

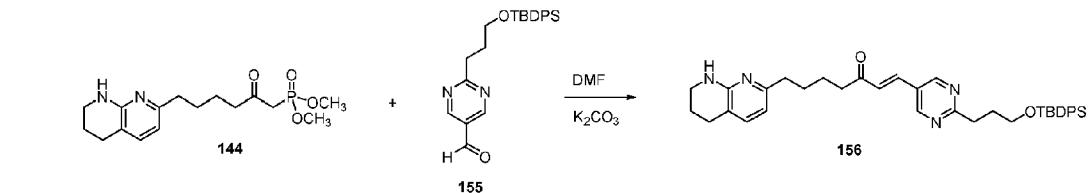


5

A una solución del compuesto 154 (6,07 g, 13,3 mmol) en THF (150 ml) a ~75 °C se le añadió una solución de nBuLi en THF (2,5 M, 5,6 ml, 14,0 mmol) gota a gota, manteniendo una temperatura interna <~70 °C (aprox. 10 m). Después de 3 m, se añadió gota a gota una solución de formiato de etilo (1,04 g, 1,13 ml, 14,0 mmol) en THF (5 ml), manteniendo una temperatura interna <-70 °C. La mezcla se agitó a -78 °C durante 20 m y luego se inactivó con HCl en dioxano (4 M, 3,67 ml, 14,7 mmol) que se diluyó adicionalmente con THF (5 ml), manteniendo una temperatura interna <-65 °C. El baño de enfriamiento se retiró, y la reacción se calentó a temperatura ambiente y se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de EtOAc en hexanos (0-20 %). Rendimiento del compuesto 155: 1,79 g (33 %).  $^1\text{H}$  RMN(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10,09 (s, 1H), 9,06 (s, 2H), 7,64 (m, 4H), 7,38 (m, 6H), 3,77 (t, 2H), 3,20 (t, 2H), 2,17 (q, 2H), 1,03 (s, 9H).

10

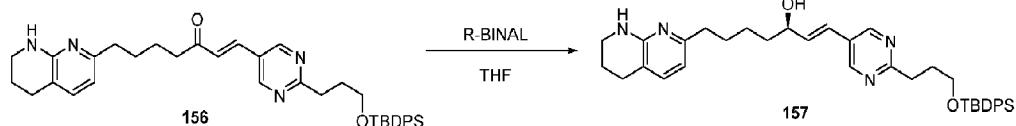
15



20

25

A una solución del compuesto 144 (1,68 g, 4,15 mmol) y el compuesto 155 (1,70 g, 4,98 mmol) en THF (25 ml) se le añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,861 g, 6,23 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 2,5 h y luego a 50 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con agua (50 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de EtOAc (0-100 %) en hexanos que contenían trietilamina al 1 %. Rendimiento del compuesto 156: 2,04 g (79 %). Masa calculada para  $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_2\text{Si} [\text{M}+\text{H}]^+$ : 619,35, hallado: 619,69.



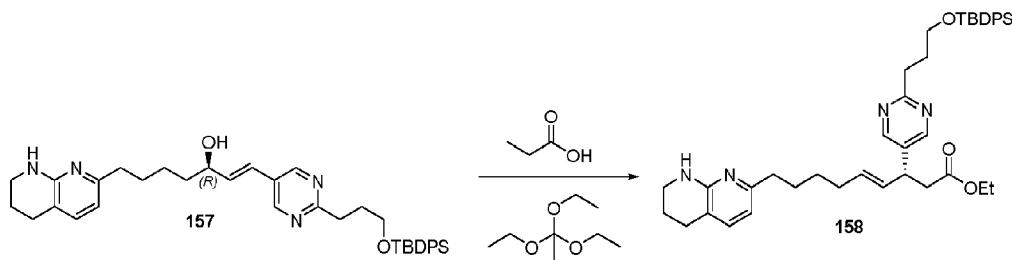
30

35

40

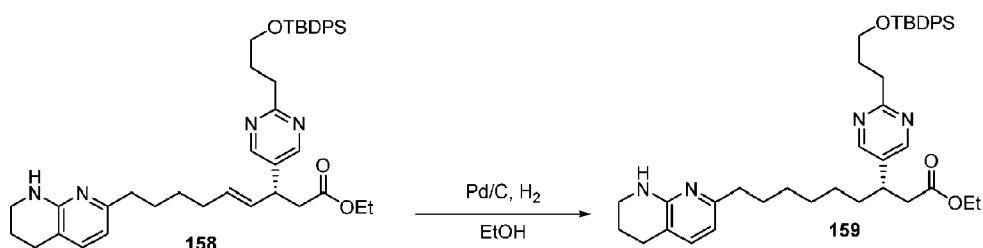
Preparación de R-BINAL: LAH (1,169 g, 30,8 mmol) se suspendió en THF seco (90 ml). A la suspensión se le añadió EtOH como una solución en THF (6 M, 5,2 ml, 31,4 mmol) manteniendo  $T_{\text{int}} < 40$  °C. La mezcla se envejeció a 35 °C durante 40 m y después se enfrió a 30 °C. Se añadió una solución de R-(BINOL) (9,00 g, 31,4 mmol) en THF (45 ml), manteniendo  $T_{\text{int}} < 40$  °C. La mezcla se envejeció a 50 °C durante 1 h, se enfrió a temperatura ambiente, luego se calentó a 50 °C y se añadió TMEDA (14,1 ml, 11,0 g, 94,3 mmol). La mezcla se envejeció a 50 °C durante 1 h, se enfrió a temperatura ambiente y luego se usó con el compuesto 156.

A una solución de R-BINAL (~0,2 M, 110 ml, 22,0 mmol) en THF se le añadió una solución del compuesto 16 (1,16 g, 1,88 mmol) en THF (12 ml) a -78 °C durante 5 m. Después de 30 m, la mezcla de reacción se inactivó con solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat. ac., se calentó a t, y el producto se extrajo con EtOAc (3 x 125 ml). La capa orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de MeOH (0-5 %) en EtOAc que contenía trietilamina al 1 %. Rendimiento del compuesto 157: 0,96 g (82 %). La pureza quiral se determinó mediante HPLC quiral analítica, columna Chiraldak AD-H 4,6 × 250 mm, 5 micrómetros, 25 % de EtOH, 75 % de hexanos, 0,1 % de dietilamina isocrática, 2 ml/min). El segundo isómero R que eluyó fue ~95 % de área puro, correspondiente a -90 % de ee. Masa calculada para  $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_2\text{Si} [\text{M}+\text{H}]^+$ : 621,36, hallado: 621,71.



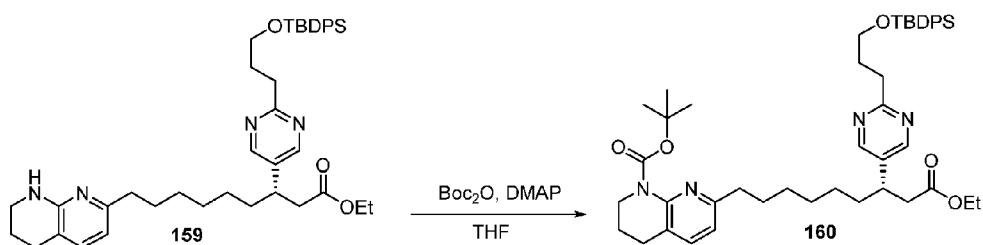
5

A una solución del compuesto 157 (0,925 g, 1,49 mmol) en trietilortoacetato (9,25 ml) se le añadió una solución de ácido propiónico en trimetilortoacetato (0,15 M, 0,55 ml, 0,08 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 140 °C en un vial sellado durante 1,5 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria, eluyendo con un gradiente de EtOAc (0-50 %) en hexanos que contenían trietilamina al 1 %. Rendimiento del compuesto 158: 0,898 g (87 %). Masa calculada para  $C_{42}H_{54}N_4O_3Si$  [M+H]<sup>+</sup>: 691,41, hallado: 691,93.



15

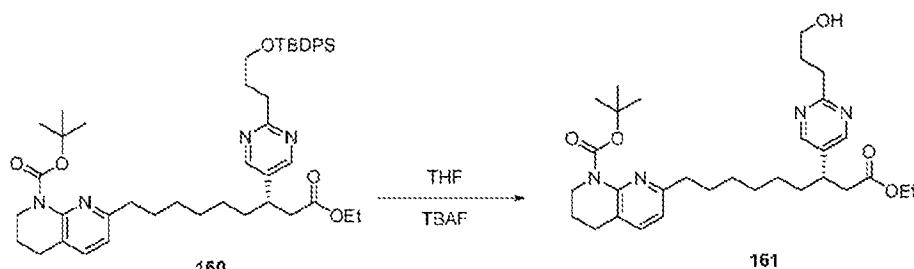
A una solución del compuesto 158 (0,893 g, 1,30 mmol) en EtOH (10 ml) se añadió una suspensión de Pd/C (grado de carga: 10 % en peso, 0,138 g, 0,13 mmol) en EtOH (4 ml). La mezcla de reacción se cargó a 50 psi Hz y se agitó durante 4,5 h. La mezcla de reacción se filtró, se concentró y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento del compuesto 159: 0,885 g (99 %). Masa calculada para  $C_{42}H_{56}N_4O_3Si$  [M+H]<sup>+</sup>: 693,42, hallado: 693,82.



20

25

Se añadió una solución de anhídrido de Boc (0,836 g, 3,83 mmol) en THF (2,5 ml) al compuesto 159 (0,885 g, 1,28 mmol) seguido de una solución de DMAP (20 mg/ml en THF, 155  $\mu$ L, 0,0031 g, 0,026 mmol). La mezcla se calentó a 60 °C durante 6 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria, eluyendo con un gradiente de EtOAc (0-50 %) en hexanos. Rendimiento del compuesto 160: 0,721 g (71 %). Masa calculada para  $C_{47}H_{64}N_4O_5Si$  [M+H]<sup>+</sup>: 793,47. hallado: 794,28.



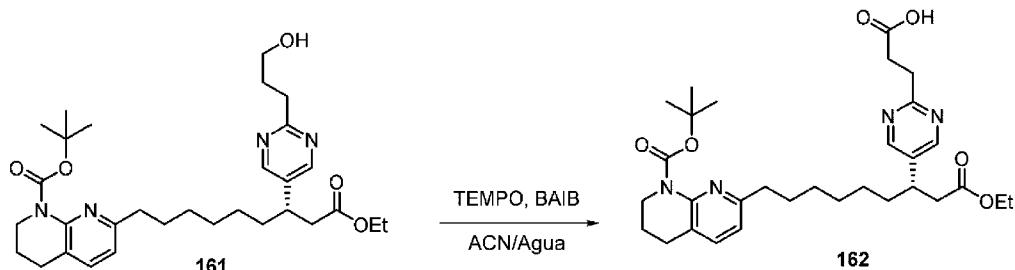
30

30

35

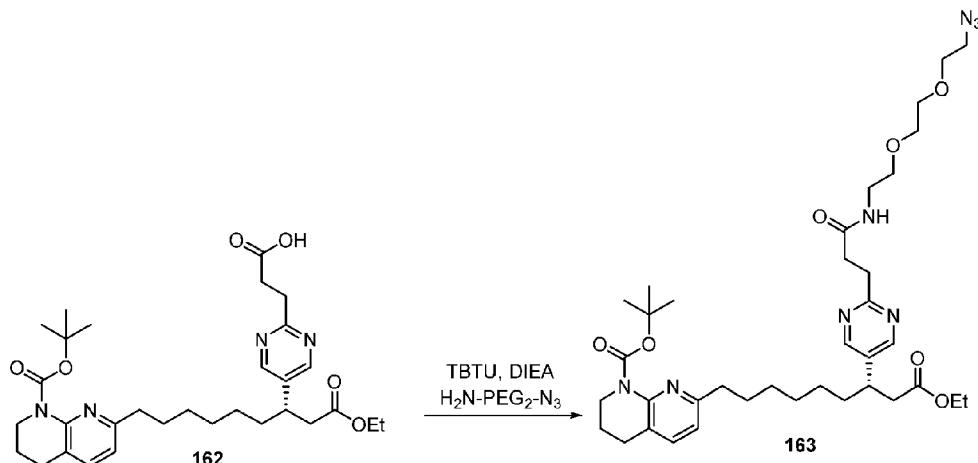
A una solución del compuesto 160 (0,621 g, 0,783 mmol) en THF (6 ml) se añadió una solución de TBAF en THF (1 M, 1,2 ml, 1,2 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (30 ml) y se lavó con solución de NH<sub>4</sub>Cl sat. ac. (2 × 10 ml). La capa orgánica se concentró. El residuo se purificó mediante CombiFlash usando gel de sílice como fase estacionaria y se eluyó con un gradiente de EtOAc (50-100 %) en hexanos. Rendimiento del compuesto 21: 0,362 g (83 %). La pureza quiral se determinó mediante HPLC quiral analítica, columna Chiralpak AD-H 4,6 × 250 mm, 5 micrómetros, 20 % de EtOH, 80 % de hexanos, 0,1 % de dietilamina, isocrática, 1,5 ml/min. El segundo isómero R que eluyó fue 93 % puro, correspondiente a 86 % ee. El Compuesto 161 se purificó adicionalmente mediante HPLC semipreparativa quiral (Chiralpak AD-H 21,2 × 250 mm, 5

- 5 micrómetros, 20 % de EtOH, 80 % de hexanos, 0,1 % de dietilamina 60 ml/min). Rendimiento final del compuesto 161: 308 mg (99 % ee). Masa calculada para  $C_{31}H_{46}N_4O_5 [M+H]^+$ : 555,36, hallado: 555,72.

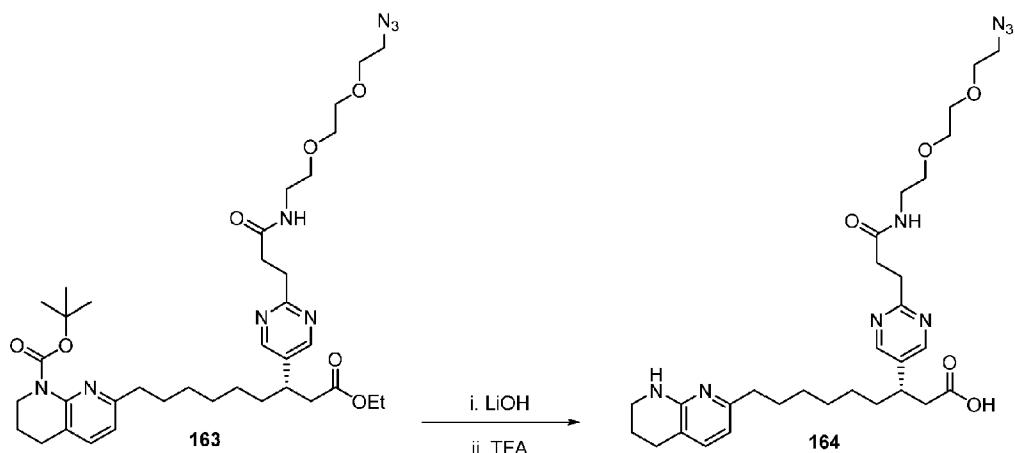


- 10 A una solución del compuesto 161 (0,030 g, 0,054 mmol) en ACN (0,30 ml) se le añadió BAIB (0,042 g, 0,130 mmol) y TEMPO (2,5 mg, 0,016 mmol) seguido de agua (0,30 ml) a temperatura ambiente. Después de 2 h, la mezcla de reacción se concentró. El residuo se purificó por RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18 21,2 × 250 mm, 5 micrómetros, agua TFA al 0,1 %/ACN, gradiente de ACN 30-80 %). Rendimiento del compuesto 162: 0,030 g (97 %). Masa calculada para  $C_{31}H_{44}N_4O_6 [M+H]^+$ : 569,34, hallado: 569,68.

15

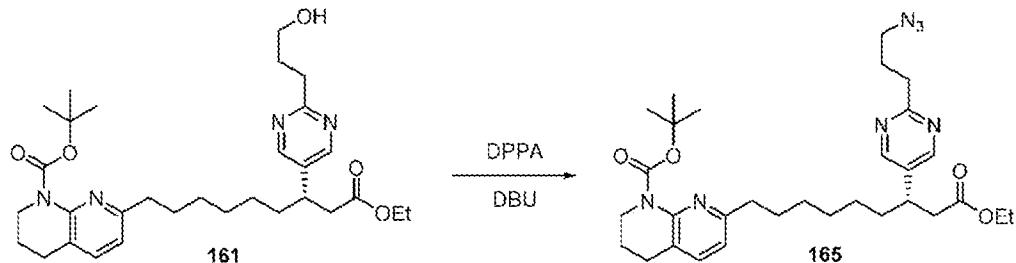


- 20 A una solución del compuesto 162 (33 mg, 0,058 mmol) y amino-PEGz-azida (15 mg, 0,087 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadió TBTU (32 mg, 0,099 mmol) y a continuación DIEA (35 µL, 26 mg, 0,203 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 30 m. La mezcla de reacción se concentró y el producto, el compuesto 163, se usó en la siguiente etapa sin purificación. Masa calculada para  $C_{37}H_{56}N_8O_7 [M+H]^+$ : 725,44, hallado: 725,77.

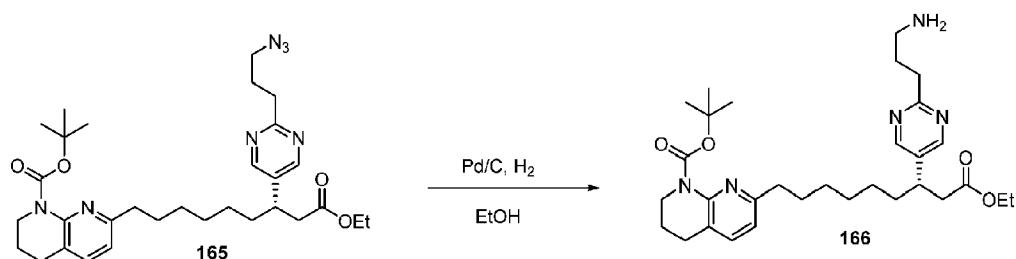


- 25 A una solución del compuesto 163 (42 mg, 0,058 mmol) en THF (0,30 ml) se le añadió una solución 1 M de LiOH (0,174 ml, 0,174 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 1 h. Se añadió una porción adicional de LiOH (0,174 ml, 0,174 mmol). Después de 3 h, la reacción se detuvo y se añadió una porción adicional de LiOH (0,174 ml, 0,174 mmol). La reacción se agitó durante 2 h adicionales (9 eq. de LiOH, 5 h en total). La mezcla de reacción se neutralizó a pH = 5 usando HCl 3 N y se concentró. El residuo se disolvió en TFA:agua [95:5] y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante RP-
- 30

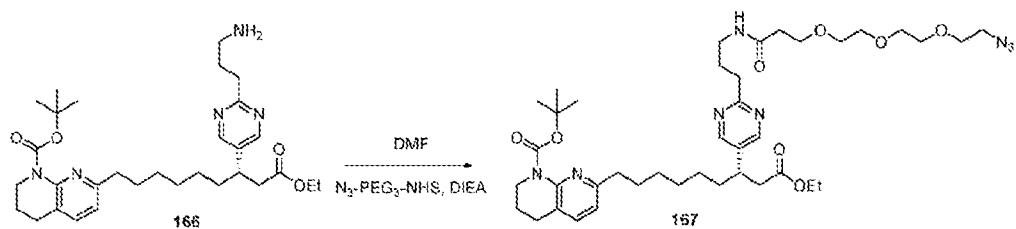
- 5 HPLC (Phenomenex Gemini C18 21,2 × 250 mm, 5 micrómetros, agua/ACN que contenía TFA al 0,1 %, gradiente de ACN al 20-50 %). Rendimiento del compuesto 164 (**estructura 38c**): 23 mg (66 %). Masa calculada para  $C_{30}H_{44}N_8O_5$  [M+H]<sup>+</sup>: 597,35, hallado: 597,85.



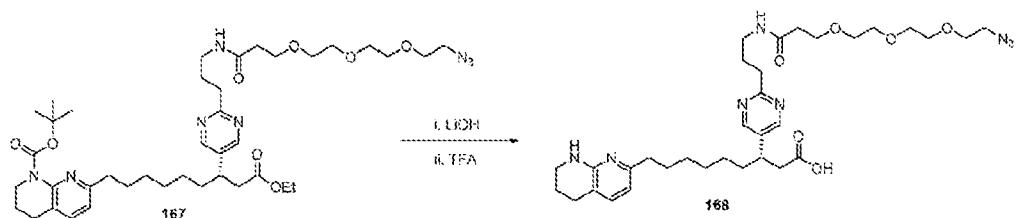
- A una solución del compuesto 161 (30 mg, 0,054 mmol) en THF (150 µL) se le añadió difenilfosforilazida (35 µL, 45 mg, 0,162 mmol) seguido de DBU (12 µL, 12 mg, 0,081 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a tasa y se agitó durante la noche. A la mañana siguiente, la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 7 h. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18 21,2 × 250 mm, 5 micrómetros, agua TFA al 0,1 %/ACN, gradiente de ACN 32-60 %). Rendimiento del compuesto 165: 14 mg (44 %). Masa calculada para  $C_{31}H_{45}N_7O_4 [M+H]^+$ : 580,36, hallado: 580,66.



- 20 A una solución del compuesto 165 (18 mg, 0,031 mmol) en EtOH (100  $\mu$ L) se le añadió una suspensión de Pd/C (10 % de carga, 3,3 mg, 0,003 mmol) en EtOH (170  $\mu$ L). El recipiente de reacción se cargó con Hz, luego se evacuó tres veces y luego se cargó con Hz (1 atm). Después de 30 min, la mezcla de reacción se filtró, se concentró y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento del compuesto 166: 17 mg (99 %). Masa calculada para  $C_{31}H_{47}N_5O_4 [M+H]^+$ : 554,37, hallado: 554,73.



- A una solución del compuesto 166 (17 mg, 0,031 mmol) y éster azido-PEG 3-NHS (14 mg, 0,040 mmol) en DMF (170  $\mu$ L) se le añadió DIEA (16  $\mu$ L, 12 mg, 0,092 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, se concentró y luego se usó en la siguiente etapa sin purificación. Masa calculada para  $C_{40}H_{62}N_8O_8 [M+H]^+$ : 783,48, hallado: 783,84.



- 35 A una solución del compuesto 167 (24 mg, 0,031 mmol) en THF (180  $\mu$ L) se le añadió una solución 1 M de LiOH (153  $\mu$ L, 0,153 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C. Después de 1 h, se añadió una porción adicional de LiOH (153  $\mu$ L, 0,153 mmol, 5 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a 40 °C y después a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se neutralizó a pH = 5 usando HCl 3 N y se concentró. El residuo se disolvió en TFA:agua [95:5] y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró

5 y el residuo se purificó mediante RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18 21,2 × 250 mm, 5 micrómetros, agua/ACN que contenía TFA al 0,1 %, gradiente de ACN al 15-45 %). Rendimiento del compuesto 168 (**estructura 39c**): 9,8 mg (49 %). Masa calculada para  $C_{33}H_{50}N_8O_6 [M+H]^+$ : 655,40, hallado: 656,01.

10 Ejemplo 2. Síntesis de ligandos dirigidos a integrinas tridentados, agentes de ARNi y conjugación de ligandos dirigidos a integrinas con moléculas de carga (agentes de ARNi).

15 Los ligandos dirigidos a integrinas se pueden conjugar con uno o más agentes de ARNi útiles para inhibir la expresión de uno o más genes dirigidos en células que expresan integrinas. Los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria facilitan la administración de los agentes de ARNi a las células y/o tejidos diana. En el Ejemplo 1 anterior se ha descrito la síntesis de determinados ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria. A continuación se describen los procedimientos generales para la síntesis de determinados conjugados de ligando y agentes de ARNi dirigidos a integrinas que se ilustran en los Ejemplos no limitativos expuestos en la presente memoria.

20 A. *Síntesis de agentes de ARNi.* Los agentes de ARNi se pueden sintetizar usando métodos generalmente conocidos en la técnica. Para la síntesis de los agentes de ARNi ilustrados en los Ejemplos expuestos en la presente memoria, las cadenas de sentido y antisentido de los agentes de ARNi se sintetizaron según la tecnología de fosforamidita en fase sólida utilizada en la síntesis de oligonucleótidos. Dependiendo de la escala, se utilizó un MerMade96E® (Bioautomatización), un MerMade12® (Bioautomatización) o un OP Pilot 100 (GE Healthcare). Las síntesis se realizaron en un soporte sólido hecho de vidrio de poro controlado (CPG, 500 Å o 600 Å, obtenido de Prime Synthesis, Aston, PA, EE. UU.). Todas las fosforamiditas de ARN y ARN modificadas en posición 2' se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, EE. UU.). Específicamente, se usaron las siguientes 2'-O-metilfosforamiditas: (5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-(benzoyl)-2'-O-metil-adenosin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-(acetil)-2'-O-metil-citidin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil-amino)fosforamidita, (5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-(isobutiril)-2'-O-metil-guanosin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidita, y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-metil-uridin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidita. Las 2'-desoxi-2'-fluorofosforamiditas portaban los mismos grupos protectores que las 2'-O-metil RNA amiditas. Las 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-inosin-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamiditas se adquirieron de Glen Research (Virginia). Las (3'-O-dimetoxitritil-2'-desoxirribosa-5'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamiditas abásicas invertidas se adquirieron de ChemGenes (Wilmington, MA, EE. UU.). Se usaron las siguientes fosforamiditas UNA: 5'-(4,4'-Dimetoxitritil)-N6-(benzoyl)-2',3'-seco-adenosina, 2'-benzoyl-3'-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, 5'-(4,4'-Dimetoxitritil)-N-acetil-2',3'-seco-citosina, 2'-benzoyl-3'-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, 5'-(4,4'-Dimetoxitritil)-N-isobutiril-2',3'-seco-guanosina, 2'-benzoyl-3'-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, y 5'-(4,4'-Dimetoxitritil)-2',3'-seco-uridina, 2'-benzoyl-3'-(2-cianoetil)-(N,N-diiso-propil)]-fosforamidita. Las fosforamiditas de enlace amino de TFA también se adquirieron comercialmente (ThermoFisher).

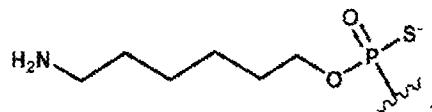
40 En algunos ejemplos, los ligandos dirigidos a integrinas descritos en la presente memoria se conjugan con los agentes de ARNi mediante la unión de los componentes a un esqueleto que incluye un grupo tri-alquino, o a un nucleótido modificado que comprende un grupo propargilo como se muestra en la Tabla B, anterior. En algunos ejemplos, el grupo tri-alquino se añade usando una fosforamidita que contiene tri-alquino, que se puede añadir en el extremo 5' terminal de la cadena de sentido de un agente de ARNi. Cuando se usaron en relación con los agentes de ARNi presentados en determinados Ejemplos de la presente memoria, las fosforamiditas que contenían tri-alquino se disolvieron en diclorometano anhídrico o acetonitrilo anhídrico (50 mM), mientras que todas las demás amiditas se disolvieron en acetonitrilo anhídrico (50 mM) y se añadieron tamices moleculares (3 Å). Se utilizó 5-benciltio-1H-tetrazol (BTT, 250 mM en acetonitrilo) o 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT, 250 mM en acetonitrilo) como solución activadora. Los tiempos de acoplamiento fueron de 10 min (ARN), 90 s (2' O-Me) y 60 s (2' F). Para introducir enlaces fosforotioato, se empleó una solución 100 mM de 3-fenil-1,2,4-ditiazolin-5-ona (POS, obtenida de PolyOrg, Inc., Leominster, MA, EE.UU.) en acetonitrilo anhídrico.

55 Alternativamente, cuando los ligandos dirigidos a integrinas se conjugan con los agentes de ARNi mediante un esqueleto trialquino, en lugar de utilizar un enfoque de fosforamidita, los compuestos que contienen trialquinos se pueden introducir de forma postsintética (véase, por ejemplo, la sección E, más adelante). Cuando se usa en relación con los agentes de ARNi presentados en determinados Ejemplos expuestos en la presente memoria, cuando se une un grupo tri-alquino post-sintéticamente al extremo 5' de la cadena de sentido, el nucleótido del extremo 5' de la cadena de sentido se funcionalizó con un nucleótido que incluía una amina primaria en el extremo 5' para facilitar la unión al esqueleto que contiene tri-alquino. La fosforamidita de enlace amino de TFA se disolvió en acetonitrilo anhídrico (50 mM) y se añadieron tamices moleculares (3 Å). Se utilizó 5-benciltio-1H-tetrazol (BTT, 250 mM en acetonitrilo) o 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT, 250 mM en acetonitrilo) como solución activadora. Los tiempos de acoplamiento fueron de 10 min (ARN), 90 s (2' O-Me) y 60 s (2' F). Para introducir enlaces fosforotioato, se empleó una solución 100 mM de 3-fenil-1,2,4-ditiazolin-5-ona (POS, obtenida de PolyOrg, Inc., Leominster, MA, EE.UU.) en acetonitrilo anhídrico.

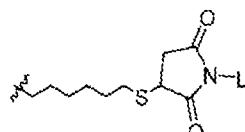
60 65 En los ejemplos expuestos en la presente memoria, a continuación se muestra la secuencia de nucleótidos modificada para las dobles cadenas sintetizadas:

Dúplex AD04545:

- 5 Secuencia de cadena antisentido modificada (5' → 3): usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (id. de sec. n.º 1)  
 Secuencia de cadena de sentido modificada (5'→3): (NH2 C6)scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa(invAb) (id. de sec. n.º 2)
- 10 Dúplex AD04546:  
 Secuencia de cadena antisentido modificada (5' → 3): usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (id. de sec. n.º 3)  
 Secuencia de cadena de sentido modificada (5'→3):
- 15 (NH2-C6)scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa(invAb)(C6-S-Mal-X) (id. de sec. n.º 4)  
 Dúplex AD05971:  
 Secuencia de cadena antisentido modificada (5' → 3): usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (id. de sec. n.º 5)
- 20 Secuencia de cadena de sentido modificada (5'→3):  
 NH2-C6)scsaacguaaCfGfAfuuuAlkaAlkugAlkaaAlksa(invAb)(resto diácido C6-S-Mal-C18) (id. de sec. n.º 6)
- 25 Para las secuencias de nucleótidos modificadas indicadas anteriormente, a, c, g y u representan 2'-O-metiladenosina, citidina, guanosina o uridina, respectivamente; Af, Cf, Gf y Uf representan 2'-fluoroadenosina, citidina, guanosina o uridina, respectivamente; aAlk, cAlk, gAlk y uAlk representan 2'-O-propargiladenosina, citidina, guanosina o uridina, respectivamente; (invAb) representa un residuo abásico invertido (desoxirribonucleótido abásico invertido); s representa un enlace fosforotioato; (NH2-C6)s representa:



30 y (C6-S-Mal-L) representa:



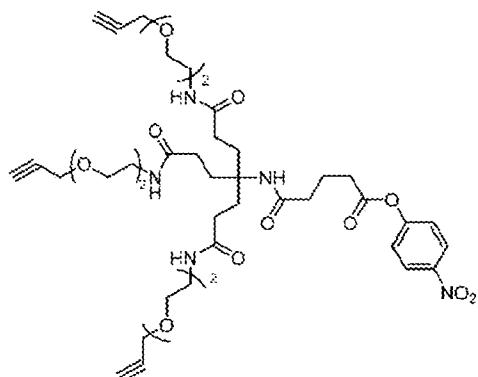
35 en donde L es una cadena de PEG, o etilo, como se indica más adelante en los ejemplos. Para las realizaciones de la presente memoria, al observar la cadena 5' → 3' respectiva, las entidades abásicas invertidas se insertan de manera que la posición 3' de la desoxirribosa esté enlazada en el extremo 3' del monómero anterior en la cadena respectiva.

40 *B. Escisión y desprotección del oligómero unido al soporte.* Después de finalizar la síntesis en fase sólida, el soporte sólido se trató con una solución en volumen 1:1 de metilamina al 40 % en peso en agua y solución de hidróxido de amonio del 28 % al 31 % (Aldrich) durante 1,5 horas a 30 °C. La solución se evaporó y el residuo sólido se reconstituyó en agua (véase más adelante).

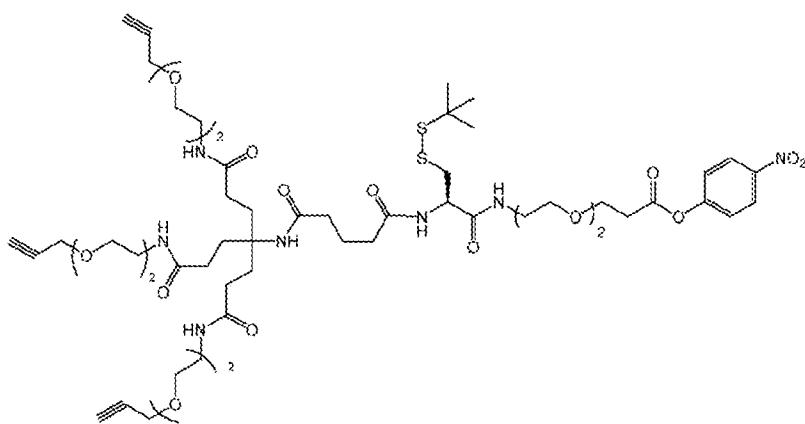
45 *C. Purificación.* Los oligómeros brutos se purificaron mediante HPLC de intercambio aniónico usando una columna TSKgel SuperQ-5PW de 13 µm y un sistema Shimadzu LC-8. El tampón A era Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 9,0 y contenía acetonitrilo al 20 % y el tampón B era el mismo que el tampón A con la adición de cloruro de sodio 1,5 M. Se registraron trazas de UV a 260 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y a continuación se sometieron a HPLC de exclusión por tamaño usando una columna GE Healthcare XK 16/40 rellena con Sephadex G-25 fine con un tampón de migración de bicarbonato de amonio 100 mM, pH 6,7 y acetonitrilo al 20 % o agua filtrada.

55 *D. Hibridación (o «annealing»).* Las cadenas complementarias se mezclaron combinando soluciones de ARN equimolar (de sentido y antisentido) en 1 × PBS (solución salina tamponada con fosfato, 1 ×, Corning, Cellgro) para formar los agentes de ARNi. Algunos agentes de ARNi se liofilizaron y se almacenaron entre -15 y -25 °C. La concentración de doble cadena se determinó midiendo la absorbancia de la solución en un espectrómetro UV-Vis en 1× PBS. A continuación, la absorbancia de la solución a 260 nm se multiplicó por un factor de conversión y el factor de dilución para determinar la concentración de doble cadena. El factor de conversión utilizado fue de 0,037 mg/(ml·cm) o, alternativamente para algunos experimentos, se calculó un factor de conversión a partir de un coeficiente de extinción determinado experimentalmente.

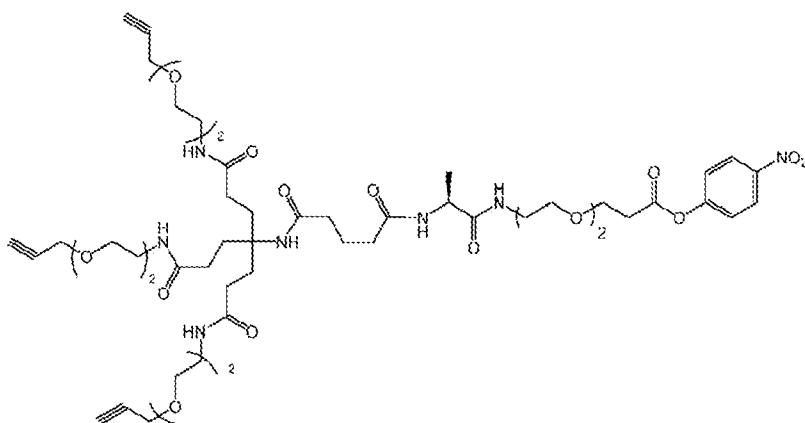
- 5 E. Conjugación del esqueleto de trialquino. Ya sea antes o después de la hibridación, la cadena de sentido funcionalizada con amina en 5' o 3' de un agente de ARNi se puede conjugar con un esqueleto de trialquino. Los ejemplos de estructuras de esqueleto de trialquino que se pueden usar para formar los constructos descritas en la presente memoria incluyen las siguientes:



10



;



;

15

A continuación se describe la conjugación del esqueleto de trialquino con la doble cadena hibridada: La doble cadena funcionalizada con amina se disolvió en DMSO al 90 % /HzO al 10 %, a -50-70 mg/ml. Se añadieron 40 eq de trietilamina, seguidos de 3 eq de trialquino-PNP. Una vez completado, el conjugado se precipitó dos veces en un sistema disolvente de 1x solución salina tamponada con fosfato/acetonitrilo (relación 1:14) y se secó.

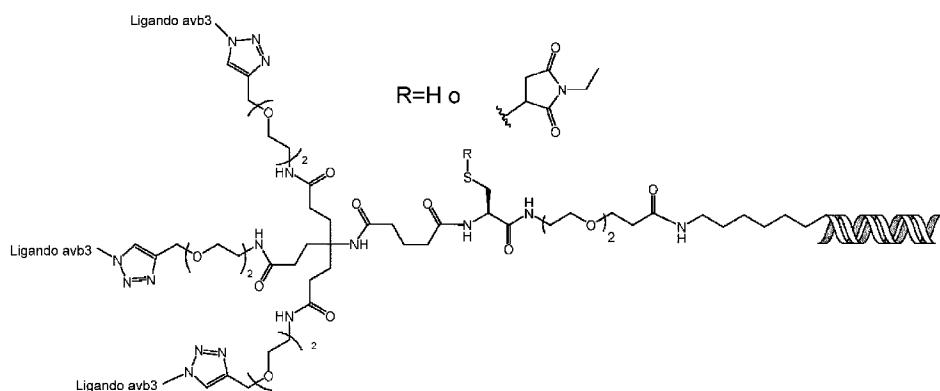
20

F. Conjugación de ligandos dirigidos a integrinas. Ya sea antes o después de la hibridación, la cadena de sentido funcionalizada con alquino tridentado en 5' o 3' se conjuga con los ligandos dirigidos a integrinas. El siguiente ejemplo describe la conjugación de ligandos dirigidos a integrinas  $\alpha\beta3/5$  con la doble cadena hibridada: Se prepararon soluciones madre de Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA) 0,5 M, 0,5 M de sulfato de Cu (II) pentahidrato ( $Cu(II)SO_4 \cdot 5 H_2O$ ) y solución 2 M de ascorbato de sodio en agua desionizada. Se preparó una solución de 75 mg/ml en DMSO del ligando dirigido a integrina. En un tubo de centrifuga de 1,5 ml que contiene doble cadena funcionalizada con tri-alquino (3 mg, 75  $\mu$ L, 40 mg/ml en agua desionizada, ~15.000 g/mol), se añaden 25  $\mu$ L de tampón Hepes 1M pH 8,5. Después de agitar con vórtex, se añadieron 35  $\mu$ L de DMSO y la solución se agita con vórtex. Se añadió

- 5 ligando dirigido a integrina a la reacción (6 eq/doble cadena, 2 eq/alquino, ~15  $\mu$ L) y la solución se agita con vórtex. Usando papel de pH, se comprobó el pH y se confirmó que era un pH ~ 8. En un tubo de centrífuga de 1,5 ml separado, se mezclaron 50  $\mu$ L de THPTA 0,5 M con 10  $\mu$ L de Cu(II)SO<sub>4</sub> · 5 HzO 0,5 M, se agitaron en vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Después de 5 min, se añadió solución de THPTA/Cu (7,2  $\mu$ L, 6 eq 5:1 THPTA:Cu) al vial de reacción y se agitó en vórtex. Inmediatamente después, se añadió ascorbato 2 M (5  $\mu$ L, 50 eq por doble cadena, 16,7 por alquino) al vial de reacción y se agitó con vórtex. Una vez completada la reacción (de forma típica se completa en 0,5-1 h), la reacción se purificó inmediatamente mediante cromatografía de intercambio aniónico no desnaturalizante.

10

15 *G. Funcionalización del grupo tiol en el enlazador de cisteína.* En algunas realizaciones, se puede utilizar un enlazador de cisteína para facilitar la conjugación de los ligandos dirigidos a integrinas con el agente de ARNi. Ya sea antes o después de la hibridación, la cadena de sentido funcionalizada con alquino-Cys(Stbu)-PEG<sub>2</sub> tridenteado en 5' o 3' se funcionaliza con un resto que contiene maleimida, o se puede reducir y dejar como el tiol libre, como se muestra en la siguiente estructura:



- El siguiente ejemplo describe la modificación de la doble cadena tri-alquino-Cys(Stbu)-PEG<sub>2</sub> con N-etilmaleimida: Se disolvió la doble cadena tri-alquino-Cys(Stbu)-PEG<sub>2</sub> (35 mg) en 500 µL de HzO desionizada. Se añadió tampón HEPES (1 M, pH 8,5, 82 µL) a la reacción y la solución se agitó en vórtex. Se añadió una solución de ditiotreitol 1 M (DTT, 100 eq, 236 µL) y la solución se colocó en un agitador vórtex durante 3 h. Después de la confirmación de la reducción del disulfuro mediante RP-HPLC desnaturalizante, el conjugado se precipitó tres veces en un sistema disolvente de 1x solución salina tamponada con fosfato/acetonitrilo (relación 1:14). El sedimento precipitado se reconstituyó en 0,5 ml de HEPES 0,1 M, pH 6,5, y se añadió N-etil maleimida (3 mg, 10 eq.) a la solución, y se colocó en un mezclador vórtex durante ~15 min. Después de completar la reacción, el conjugado se precipitó tres veces en un sistema disolvente de 1x solución salina tamponada con fosfato/acetonitrilo (relación 1:14), se desaló y se secó.

Ejemplo 3. Actividad de unión de ligandos dirigidos a integrinas.

Como se informa en la siguiente Tabla 1, se obtuvieron datos de unión de IC<sub>50</sub> para los ligandos dirigidos a integrinas de las estructuras 1c, 2c y 3c, así como un péptido mimético de RGD:

Tabla 1. Actividad de unión IC<sub>50</sub>.

Grupo	IC50 (nM)		
	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$
Estructura 1c	0,3	0,6	5,3
Estructura 2c	0,3	5,6	8,9
Estructura 3c	0,8	1,8	81
Péptido mimético RGD	1,6	2,5	81

- 40 Como se muestra en la Tabla 1 anterior, las estructuras 1, 2 y 3 mostraron una unión potente a la integrina  $\alpha v\beta 3$  y a la integrina  $\alpha v\beta 5$ , y las estructuras 2 y 3, por ejemplo, mostraron una particular preferencia por la unión a la integrina  $\alpha v\beta 3$  ( $IC_{50} = 0,3$  nM y 0,8 nM, respectivamente). Además, cada una de las estructuras 1, 2 y 3 mostró una actividad de unión ligeramente aumentada a la integrina  $\alpha v\beta 3$  en comparación con un péptido mimético de RGD (véase, por ejemplo, las estructuras de ligando mimético de RGD descritas en la patente US-9.487.556). Además, aunque se ha demostrado que el ligando mimético del RGD tiene actividad de unión, los ligandos dirigidos a integrinas de la presente descripción tienen una mayor estabilidad, tanto con respecto a la estabilidad sérica *in vivo* como a la estabilidad química *ex vivo*, en comparación con dichos ligandos miméticos del RGD basados en péptidos.

5 Ejemplo 4. Modelo de ratón portador de un tumor renal (xenoinjerto ortotópico).

Creación de células A498 de carcinoma de células renales claras (ccRCC) que expresan SEAP.

10 Se preparó un vector de expresión pCR3.1 que expresaba la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) de gen reportero bajo el promotor CMV mediante clonación direccional de la secuencia codificante de SEAP amplificada por PCR a partir del vector básico pSEAP2 de Clontech. Se añadieron sitios de restricción convenientes a los cebadores utilizados para amplificar la secuencia codificante de SEAP para la clonación en el vector pCR3.1 (Invitrogen). El constructo pCR3-SEAP resultante se usó para crear una línea celular A498 ccRCC que expresa SEAP. En resumen, el plásmido pCR3-SEAP se transfeció en células A498 ccRCC mediante electroporación siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los transfectantes estables se seleccionaron por resistencia a G418. Los clones A498-SEAP seleccionados se evaluaron para determinar la expresión de SEAP y la estabilidad de la integración.

15 Implantación de células A498 de carcinoma de células renales claras (ccRCC) que expresan SEAP.

20 20 Se anestesiaron ratones nude atípicos hembra con isoflourano ~3 % y se colocaron en la posición de decúbito lateral derecho. Se hizo una pequeña incisión longitudinalmente abdominal de 0,5-1 cm en el flanco izquierdo. Usando un bastoncillo de algodón húmedo, el riñón izquierdo se levantó del peritoneo y se stabilizó suavemente. Justo antes de la inyección, se llenó una jeringa de 1,0 ml con la mezcla de células/Matrigel y se conectó un catéter con aguja de calibre 27 a la punta de la jeringa. La jeringa llena se conectó entonces a una bomba de jeringa (Harvard Apparatus, modelo PHD2000) y se preparó para retirar el aire. La punta de un catéter de aguja de calibre 27 conectado a una jeringa se insertó justo debajo de la cápsula renal cerca del polo caudal y la punta de la aguja se hizo avanzar cuidadosamente cranealmente a lo largo de la cápsula de 3-4 mm. Se inyectó lentamente una alícuota de 10 µl de mezcla 2:1 (vol:vol) de células/Matrigel® que contenía aproximadamente 300.000 células en el parénquima renal usando una bomba de jeringa. La aguja se dejó en el riñón durante 15-20 segundos para garantizar que la inyección se hubiera completado. A continuación, se retiró la aguja del riñón y se colocó un bastoncillo de algodón sobre el sitio de la inyección durante 30 segundos para evitar la fuga de células o la hemorragia. A continuación, se volvió a colocar suavemente el riñón en el abdomen y se cerró la pared abdominal. El suero se recogió cada 7-14 días después de la implantación para monitorizar el crecimiento del tumor utilizando un kit de ensayo SEAP comercial. Para la mayoría de los estudios, los ratones con tumores se utilizaron 5-6 semanas después de la implantación, cuando las medidas del tumor fueron normalmente de alrededor de 4-8 mm.

25 30 35 Determinación de la expresión de ARNm de HIF2.

40 Para los estudios descritos en los Ejemplos de la presente memoria, los ratones se sacrificaron el día identificado después de la inyección y se aisló el ARN total del tumor renal usando el reactivo Trizol siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los niveles relativos de ARNm del HIF2α se determinaron mediante RT-qPCR como se describe a continuación y se compararon con los ratones tratados únicamente con tampón de administración (glucosa isotónica).

45 50 55 En preparación para la PCR cuantitativa, se aisló el ARN total de muestras de tejido homogeneizadas en TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) siguiendo el protocolo del fabricante. Se transcribieron de forma inversa aproximadamente 500 ng de ARN utilizando el kit de transcripción inversa de ADNC de alta capacidad (Life Technologies). Para la expresión de Hif2α (EPAS1) humana (tumoral), se usaron ensayos de expresión génica TaqMan prefabricados para Hif2α humana (n.º de catálogo 4331182) y CyCA (PPIA) n.º de catálogo: 4326316E) en reacciones bplex por triplicado usando TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) o VeriQuest Probe Master Mix (Affymetrix). La PCR cuantitativa se realizó mediante el uso de un sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast o StepOnePlus (Life Technologies). Se utilizó el método  $\Delta\Delta C_T$  para calcular la expresión génica relativa.

Ejemplo 5. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrina conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa (EPAS1) en ratones portadores de tumor renal.

55 60 65 Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi incluyeron una cadena antisentido que tenía una secuencia de nucleobases al menos parcialmente complementaria al gen HIF-2 alfa (Hif2α o EPAS1). EPAS1 es un miembro de la familia de genes HIF (factor inducible por hipoxia) y codifica la mitad de un factor de transcripción involucrado en la inducción de genes regulados por oxígeno, y que se induce a medida que disminuyen los niveles de oxígeno (una afección conocida como hipoxia), y se sabe que se sobreexpresa con frecuencia en células de carcinoma renal de células claras. Los agentes de ARNi de Hif2α se diseñaron para ser capaces de degradar o inhibir la traducción de transcripciones de ARN mensajero (ARNm) de Hif2α de una manera específica de secuencia, inhibiendo así la expresión de un gen EPAS1. Los agentes de ARNi del Hif2α estaban compuestos por nucleótidos modificados y más de un enlace no fosfodiéster.

70 El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

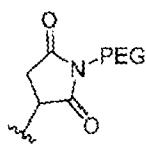
5 Tabla 2. Grupos de dosificación de ratones portadores de tumor renal en el Ejemplo 5.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Glucosa isotónica (dextrosa al 5 % en agua (d5w)) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
2	7,5 mg/kg de agente de ARNi de Hif2α (AD04546) conjugado con un resto PEG de 40 kilodalton (kDa) (sin ligando dirigido a integrina unido), formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
3	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando basado en un péptido mimético del RGD y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
4	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina de estructura 1a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
5	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
6	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con cuatro ligandos de estructura 2a dirigidos a la integrina (es decir, un grupo que se puede dirigir a diana tetracentrada) y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
7	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04545) conjugado con un grupo que contenía cuatro ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2a (es decir, un grupo que se puede dirigir a diana tetracentrada) (sin un resto PEG), formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
8	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 20 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

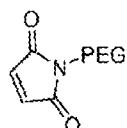
10 Los agentes de ARNi en el Ejemplo 5 se sintetizaron con secuencias de nucleótidos dirigidas al gen Hif2α humano e incluyeron un grupo reactivo de amina funcionalizado ( $\text{NH}_2\text{-C}_6$ ) en el extremo 5' terminal de la cadena de sentido para facilitar la conjugación con los ligandos dirigidos a integrina (o, para el grupo 3, con el ligando basado en péptido mimético de RGD). Las secuencias modificadas de los agentes de ARNi se han mostrado anteriormente en el Ejemplo 2. Para los grupos 4 y 5, se conjugó un único ligando dirigido a integrina (denominado en la presente memoria ligando “monodentado”) con el agente de ARNi mediante un enlazador de éster DBCO-PEGGS-NHS (BroadPharm), que se conjugó con la amina primaria terminal en el extremo 5' terminal de la cadena de sentido. Los respectivos ligandos dirigidos a integrina se sintetizaron con un grupo reactivo azida (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1), que se conjuguó a continuación con el componente DBCO del enlazador.

15 Los agentes de ARNi se sintetizaron con un modulador de la FC denominado “resto PEG de 20 kDa” o “resto PEG de 40 kDa” que tiene la estructura:

20

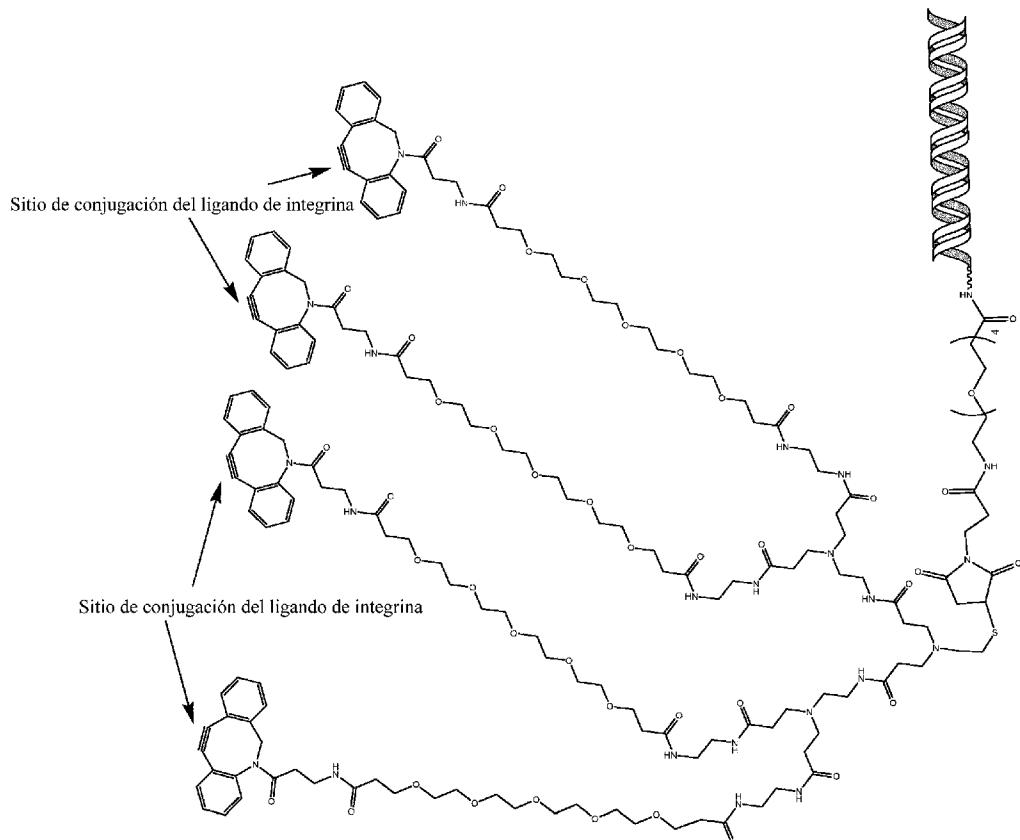


25 en donde  $\xi$  indica el punto de unión al agente de ARNi en el grupo C6-S como se indica en AD04546 (véase el Ejemplo 2), y PEG indica una cadena de PEG de 20 kDa o 40 kDa. El modulador de la FC se conjuguó con el extremo 3' de la cadena de sentido reduciendo el grupo C6-SS-C6, como se muestra en la Tabla A, que se sometió a continuación a adición de Michael con el siguiente compuesto:



30 en donde PEG indica una cadena de PEG de 20 kDa o 40 kDa.

- 5 Para los grupos 6 y 7, se conjugaron cuatro ligandos dirigidos a integrinas a través de un esqueleto tetradentado que incluía un núcleo de cistamina PAMAM-G1 funcionalizado con DBCO que tenía una estructura general representada por lo siguiente:



- 10 Como se indica en la Tabla 2 anterior, en algunos grupos, se unió un resto PEG de 40 kDa o 20 kDa para que sirviera como un potenciador de la FC para aumentar el tiempo de circulación del conjugado de producto fármaco. El resto PEG de 40 kDa o 20 kDa se unió usando un reactivo de la fórmula:
- 15 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2 $\alpha$  humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PP1A) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.
- 20

Tabla 3. Expresión media relativa del ARNm de huHIF2 $\alpha$  en el momento del sacrificio en el Ejemplo 5.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2 $\alpha$	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	1,000	0,069	0,074
<b>Grupo 2</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi) (sin ligando, PEG de 40 kDa)	0,563	0,016	0,017
<b>Grupo 3</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando basado en péptido mimético RGD, PEG de 40 kDa)	0,400	0,087	0,112
<b>Grupo 4</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina de la estructura 1a, PEG de 40 kDa)	0,390	0,027	0,029
<b>Grupo 5</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina de la estructura 2a, PEG de 40 kDa)	0,308	0,061	0,077
<b>Grupo 6</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y grupo que se puede dirigir a diana tetradentado de ligando dirigido a integrina de la estructura 2a, PEG de 40 kDa)	0,289	0,069	0,091

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 7</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y grupo que se puede dirigir a diana tetradentado de ligando dirigido a integrina de la estructura 2a)	0,589	0,050	0,054
<b>Grupo 8</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina de la estructura 2a, PEG de 20 kDa)	0,647	0,098	0,115

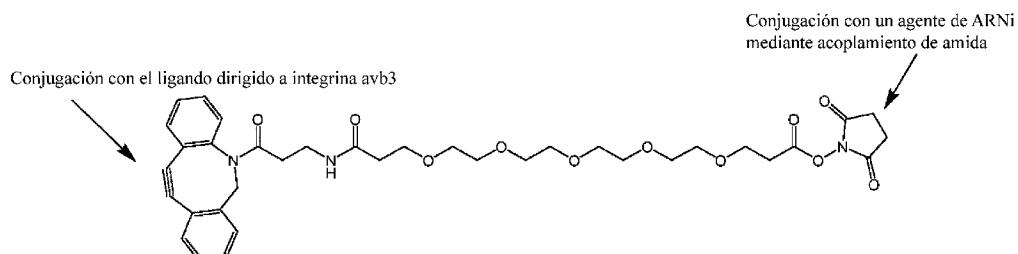
- Como se muestra en la Tabla 3 anterior, cada uno de los agentes de ARNi de Hif2a mostró una reducción en la expresión del ARNm en ratones en comparación con el control. La inclusión de un resto PEG de 40 kDa como potenciador de la FC generalmente mejoró la inhibición de la expresión del gen diana. Además, una comparación de los grupos 3, 4 y 5 mostró que el ligando dirigido a integrina de la estructura 1a descrito en la presente memoria era comparable a un ligando basado en un péptido mimético de RGD que tiene afinidad conocida por el  $\alpha v \beta 3$ , y el ligando de la estructura 2a mostró una mejora de casi un 10 % en el bloqueo con respecto al ligando mimético del RGD. Por ejemplo, el grupo 3 (mimético de RGD) tuvo un bloqueo de aproximadamente el 60 % (0,400); El grupo 4 (estructura 1a) tuvo un bloqueo de aproximadamente el 61 % (0,390); y el grupo 5 (estructura 2a) tuvo un bloqueo de aproximadamente el 69 % (0,308).
- Es importante destacar que los datos también mostraron dependencia del ligando, ya que la inclusión de un ligando dirigido a integrina descrito en la presente memoria mostró una mejora en comparación con el mismo constructo sin ligando. Por ejemplo, el grupo 6 (estructura 2a del ligando dirigido a integrina tridentado) presentó aproximadamente 72 % de bloqueo (0,289), en comparación con el grupo 2 (sin ligando dirigido a integrina), que presentó solo aproximadamente 44 % de bloqueo (0,563).
- Además, el grupo 6 mostró una pequeña mejora sobre el grupo 5, lo que indica una ligera preferencia por un ligando multidentado sobre un ligando monodentado; sin embargo, ambas formas fueron activas y administraron el agente de ARNi al riñón (como se muestra por la inhibición de la expresión génica por el agente de ARNi).
- Ejemplo 6. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumor renal.
- Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2α (*EPAS1*).
- El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

Tabla 4. Grupos de dosificación de ratones portadores de tumor renal en el Ejemplo 6.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Glucosa isotónica (d5w) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
2	30 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando basado en un péptido mimético del RGD y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
3	15 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando basado en un péptido mimético del RGD y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
4	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando basado en un péptido mimético del RGD y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
5	30 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
6	15 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

- 5 Los agentes de ARNi se sintetizaron con secuencias de nucleótidos dirigidas al gen Hif2 $\alpha$  humano e incluyeron un grupo reactivo de amina funcionalizado ( $\text{NH}_2\text{-C}_6$ ) en el extremo 5' terminal de la cadena de sentido para facilitar la conjugación con los ligandos dirigidos a integrinas (o, para los grupos 2, 3 y 4, con el péptido mimético de RGD). Para los grupos 5 y 6, se conjuguó un único ligando dirigido a integrina (ligando "monodentado") con el agente de ARNi mediante el siguiente éster de DBCO-PEGs-NHS:

10



- 15 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2 $\alpha$  humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.

20 Tabla 5. Expresión media relativa del ARNm de Hif2 $\alpha$  humano en el momento del sacrificio en el Ejemplo 6.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2 $\alpha$	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	1,000	0,072	0,078
<b>Grupo 2</b> (30 mg/kg de agente de ARNi y ligando basado en péptido RGD, PEG de 40 kDa)	0,300	0,041	0,047
<b>Grupo 3</b> (15 mg/kg de agente de ARNi y ligando basado en péptido RGD, PEG de 40 kDa)	0,330	0,080	0,106
<b>Grupo 4</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando basado en péptido RGD, PEG de 40 kDa)	0,446	0,068	0,080
<b>Grupo 5</b> (30 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina de la estructura 2a, PEG de 40 kDa)	0,198	0,007	0,007
<b>Grupo 6</b> (15 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina de la estructura 2a, PEG de 40 kDa)	0,271	0,012	0,012

- 25 Como se muestra en la Tabla 5 anterior, cada uno de los agentes de ARNi del Hif2 $\alpha$  mostró una reducción en la expresión del ARNm en comparación con el control. Además, los grupos 5 y 6, que contenían el ligando dirigido a la integrina de la estructura 2a descrita en la presente memoria, mostraron una mejora en el bloqueo del ARNm de Hif2 $\alpha$  en comparación con los ligandos basados en péptidos miméticos de RGD de los grupos 2 y 3. (por ejemplo, comparar el grupo 6 (aproximadamente 73 % de bloqueo a 15 mg/kg de agente de ARNi (0,271)) con el grupo 3 (aproximadamente 67 % de bloqueo a 15 mg/kg de agente de ARNi (0,330)).

30 Ejemplo 7. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumor renal.35 Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2 $\alpha$  (EPAS1).

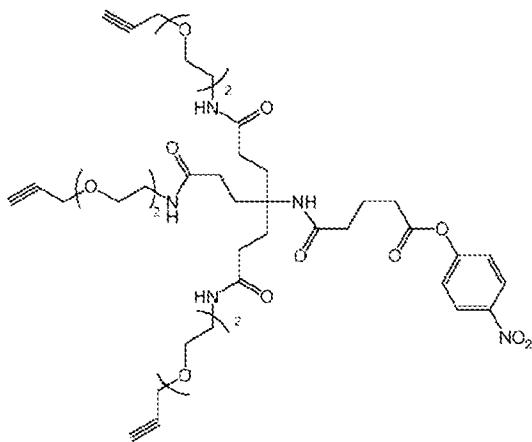
40 El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

Tabla 6. Grupos de dosificación de ratones portadores de tumor renal en el Ejemplo 7.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
2	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
3	30 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
4	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2.8a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
5	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2.9a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
6	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2.10a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
7	7,5 mg/kg de agente de ARNi del Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2.10a y que incluye además una N-etilmaleimida unida a un tiol en 3' de la cadena de sentido, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
8	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina monodentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

5 Los agentes de ARNi se sintetizaron con secuencias de nucleótidos dirigidas a dirigirse al gen Hif2α humano e incluyeron un grupo reactivo de amina funcionalizado ( $\text{NH}_2\text{-C}_6$ ) en el extremo 5' terminal de la cadena de sentido para facilitar la conjugación con los ligandos dirigidos a integrinas. Para los grupos 2 a 7, se usó el siguiente compuesto para funcionalizar el conjugado con esqueletos tridentados:

10



15 Para el grupo 8, se utilizó un éster de alquino-PEG<sub>4</sub>-NHS para unir el ligando dirigido a integrina monodentado a la amina 5' en la cadena de sentido. Como se expone en la presente memoria, los grupos 4 a 7 usaron ligandos dirigidos a integrinas con longitudes de PEG variadas.

20 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2α humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.

Tabla 7. Expresión media relativa del ARNm de Hif2α en el momento del sacrificio en el Ejemplo 7.

25

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	1,000	0,078	0,085
<b>Grupo 2</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, PEG de 40 kDa)	0,361	0,025	0,026
<b>Grupo 3</b> (30 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, PEG de 40 kDa)	0,259	0,024	0,026
<b>Grupo 4</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.8a, PEG de 40 kDa)	0,428	0,062	0,073
<b>Grupo 5</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.9a, PEG de 40 kDa)	0,481	0,014	0,014
<b>Grupo 6</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.10a, PEG de 40 kDa)	0,419	0,040	0,044
<b>Grupo 7</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.10a, N-etil-maleimida)	0,627	0,054	0,060
<b>Grupo 8</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi, ligando dirigido a integrina monodentado de la estructura 2a, PEG de 40 kDa)	0,537	0,041	0,045

Como se muestra en la Tabla 7 anterior, cada uno de los agentes de ARNi del Hif2α mostró una reducción en la expresión del ARNm en ratones en comparación con el control. Por ejemplo, el grupo 2, que incluía una dosis de 7,5 mg/kg de agente de ARNi conjugado con el ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a (que incluye un grupo PEG<sub>4</sub>) mostró aproximadamente un 64 % de bloqueo de Hif2α (0,361). Además, si bien los constructos que aumentaron la longitud del grupo de PEG hasta PEG<sub>36</sub> (por ejemplo, los grupos 6 y 7) mostraron todos bloqueo, no se observó ningún beneficio en comparación con el grupo de PEG<sub>4</sub> que está presente en la estructura 2a.

Ejemplo 8. Estudio de respuesta a la dosis de la administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumores renales.

Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2α (EPAS1).

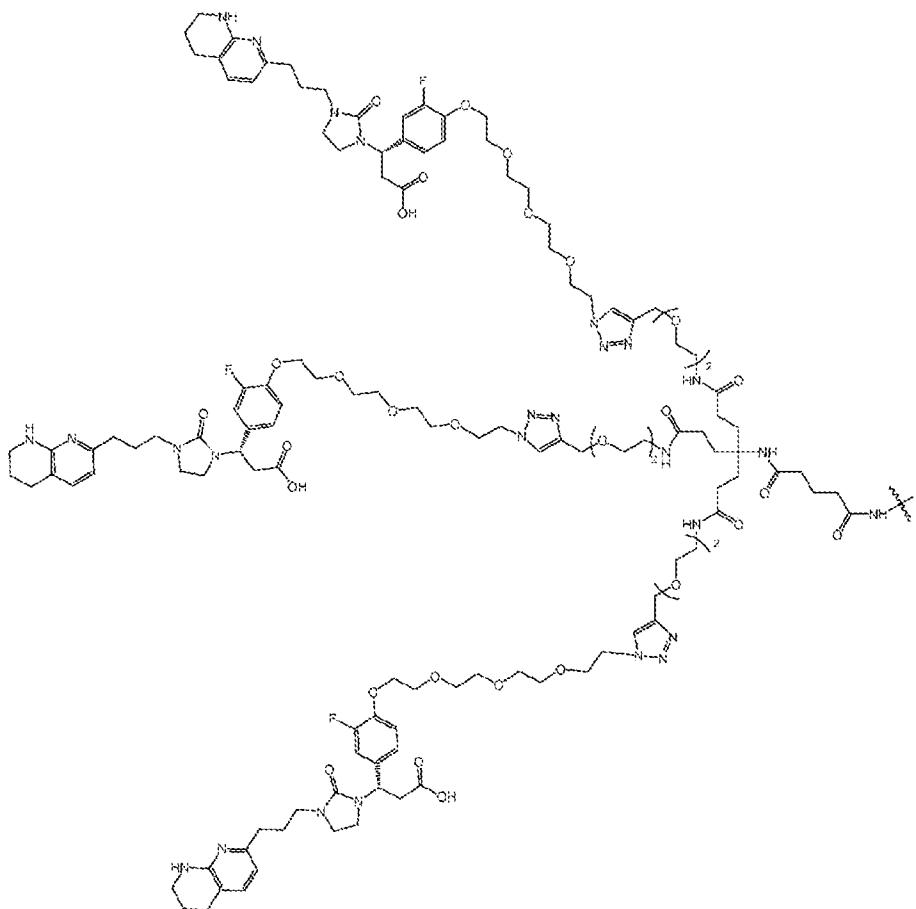
El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

Tabla 8. Grupos de dosificación de ratones portadores de tumor renal en el Ejemplo 8.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
2	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
3	10 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
4	20 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
5	30 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

Los agentes de ARNi se sintetizaron con secuencias de nucleótidos dirigidas a dirigirse al gen Hif2α humano e incluyeron un grupo reactivo de amina funcionalizado (NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) en el extremo 5' terminal de la cadena de sentido para

- 5 facilitar la conjugación con los ligandos dirigidos a integrinas. Cada uno de los grupos tenía ligandos de integrina tridentados de estructura 2a, como se representa mediante la siguiente estructura:



- 10 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2 $\alpha$  humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.
- 15

Tabla 9. Expresión media relativa del ARNm de Hif2 $\alpha$  humano en el momento del sacrificio en el Ejemplo 8.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2 $\alpha$	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	1,000	0,131	0,150
<b>Grupo 2</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi)	0,313	0,027	0,030
<b>Grupo 3</b> (10 mg/kg de agente de ARNi)	0,349	0,033	0,036
<b>Grupo 4</b> (20 mg/kg de agente de ARNi)	0,216	0,040	0,050
<b>Grupo 5</b> (30 mg/kg de agente de ARNi)	0,203	0,035	0,042

- 20 Como se muestra en la Tabla 9 anterior, los agentes de ARNi del Hif2 $\alpha$  conjugados con el ligando dirigido a integrina de estructura 2a descritos en la presente memoria mostraron una reducción en la expresión de ARNm en ratones en comparación con el control en todos los niveles de dosificación.

- 25 Ejemplo 9. Duración del bloqueo de agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa conjugados con ligandos dirigidos a integrina en ratones portadores de tumor renal.

Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados

5 habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2α (*EPAS1*).

10 El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

Tabla 10. Grupos de dosificación de ratones en el Ejemplo 9.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
<b>1</b>	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi) ratones sacrificados el día 5	Inyección única el día 1
<b>1A</b>	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi) ratones sacrificados el día 22	Inyección única el día 1
<b>2</b>	20 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica; ratones sacrificados el día 5	Inyección única el día 1
<b>3</b>	20 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica; ratones sacrificados el día 8.	Inyección única el día 1
<b>4</b>	20 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica; ratones sacrificados el día 15.	Inyección única el día 1
<b>5</b>	20 mg/kg de agente de ARNi Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica; ratones sacrificados el día 22.	Inyección única el día 1

15 Los ratones de los grupos 1 y 2 se sacrificaron el día 5 después de la inyección; los ratones del grupo 3 fueron sacrificados el día 8 después de la inyección; los ratones del grupo 4 fueron sacrificados el día 15 después de la inyección; y los ratones de los grupos 1A y 5 fueron sacrificados el día 22 después de la inyección.

20 Para los grupos de control del vehículo, se administraron dosis a dos ratones en el grupo 1 y a tres ratones en el grupo 1A. Para los grupos que contenían el agente de ARNi y el ligando dirigido a la integrina (es decir, los grupos 2, 3, 4 y 5) se administraron cuatro (4) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n = 4). El ARN total se aisló del tumor renal según los procedimientos expuestos en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2α humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.

25 Tabla 11. Expresión media relativa del ARNm de Hif2α humano en el momento del sacrificio en el Ejemplo 9.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica; día 5 sacrificio)	0,741	0,028	0,029
<b>Grupo 1A</b> (glucosa isotónica; día 22 sacrificio)	1,000	0,066	0,070
<b>Grupo 2</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a, PEG de 40 kDa; día 5 sacrificio)	0,262	0,028	0,031
<b>Grupo 3</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, PEG de 40 kDa; día 5 sacrificio)	0,202	0,021	0,023
<b>Grupo 4</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, PEG de 40 kDa; día 8 sacrificio)	0,233	0,034	0,039
<b>Grupo 5</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, PEG de 40 kDa; día 15 sacrificio)	0,299	0,017	0,018

5 Como se muestra en la Tabla 11 anterior, los agentes de ARNi del Hif2 $\alpha$  continuaron mostrando una reducción en la expresión del ARNm en comparación con el control el día 22 (aproximadamente un 70 % de bloqueo el día 22 (0,299)).

Ejemplo 10. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumor renal.

10 Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la 15 presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2 $\alpha$  (*EPAS1*).

El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

20 Tabla 12. Grupos de dosificación de ratones en el Ejemplo 10.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
2	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2 $\alpha$ (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
3	7,5 mg/kg de agente de ARNi Hif2 $\alpha$ (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2.6a y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

25 Los agentes de ARNi se sintetizaron con secuencias de nucleótidos dirigidas a dirigirse al gen Hif2 $\alpha$  humano e incluyeron un grupo reactivo de amina funcionalizado (NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) en el extremo 5' terminal de la cadena de sentido para facilitar la conjugación con los ligandos dirigidos a integrinas.

30 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2 $\alpha$  humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.

35 Tabla 13. Expresión media relativa del ARNm de Hif2 $\alpha$  en el momento del sacrificio en el Ejemplo 10.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2 $\alpha$	Bajo (error)	Alto (error)
Grupo 1 (glucosa isotónica)	1,000	0,087	0,095
Grupo 2 (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, PEG de 40 kDa)	0,351	0,080	0,104
Grupo 3 (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.6a, PEG de 40 kDa)	0,441	0,040	0,043

40 Como se muestra en la Tabla 13 anterior, cada uno de los conjugados entre el agente de ARNi del Hif2 $\alpha$  y el ligando dirigido a integrina mostró una reducción en la expresión del ARNm en los ratones en comparación con el control. Por ejemplo, el grupo 2, que incluía una dosis de 7,5 mg/kg de agente de ARNi conjugado con el ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, mostró una reducción de aproximadamente el 65 % del mRNA del Hif2 $\alpha$  (0,351).

Ejemplo 11. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones con tumor renal  $\alpha\beta 3$  KO A498.

45 Las células tumorales de carcinoma de células renales claras (ccRCC) A498 expresan integrinas  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 5$ , con una expresión de  $\alpha\beta 3$  aproximadamente 4 veces mayor que  $\alpha\beta 5$  según un análisis de citometría de flujo. Para evaluar la contribución de  $\alpha\beta 5$  en este modelo, se sintetizaron células A498 knockout (KO)  $\alpha\beta 3$  mediante tecnología de edición de genes. El bloqueo de la integrina  $\alpha\beta 3$  se confirmó mediante secuenciación genómica y tinción

- 5 inmunohistoquímica de  $\alpha\beta3$ , lo que mostró que la tinción fue negativa en las células  $\alpha\beta3$  KO A498. Se prepararon ratones portadores de tumores renales con células A498 WT (tanto con  $\alpha\beta3$  como con  $\alpha\beta5$ ) y  $\alpha\beta3$  KO A498 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4.
- 10 En el día 1 del estudio, se dosificó a los ratones portadores de tumores renales mediante inyección en la vena de la cola. Se dosificó a tres (3) ratones portadores de tumores en cada grupo expuesto en la Tabla 13, a continuación (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección y se aisló el ARN total del tumor renal como se indica en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2 $\alpha$  humano se cuantificó mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PP1A) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se establece en el Ejemplo 4.
- 15

Tabla 14. Expresión media relativa del ARNm de Hif2 $\alpha$  en el momento del sacrificio en el Ejemplo 11.

<b>Id. del grupo</b>	<b>Tumor</b>	<b>Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2<math>\alpha</math></b>	<b>Bajo (error)</b>	<b>Alto (error)</b>
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	A498 WT	1,000	0,084	0,092
<b>Grupo 2</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a, y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo)	A498 WT	0,295	0,040	0,046
<b>Grupo 3</b> (glucosa isotónica)	A498 $\alpha\beta3$ KO	1,000	0,232	0,302
<b>Grupo 4</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a, y que incluye además un resto PEG de 40 kDa enlazado al constructo)	A498 $\alpha\beta3$ KO	0,621	0,068	0,077

- 20 Como se muestra en la Tabla 14 anterior, los conjugados de agente de ARNi del Hif2 $\alpha$  y ligando de integrina mostraron una reducción en la expresión del ARNm del Hif2 $\alpha$  en los tumores A498 WT (de tipo salvaje) en comparación con el control (aproximadamente un 71 % (0,295) bloqueo). Por el contrario, como se esperaba, la reducción en la expresión de ARNm de Hif2 $\alpha$  fue menos eficiente en tumores A498  $\alpha\beta3$  KO; sin embargo, la reducción fue sustancial, con un bloqueo del 38 % (0,621). Esto demuestra que tanto la integrina  $\alpha\beta3$  como la integrina  $\alpha\beta5$  contribuyen a la administración del agente de ARNi.
- 25

Ejemplo 12. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumor renal.

- 30 Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2 $\alpha$  (EPAS1).
- 35 El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

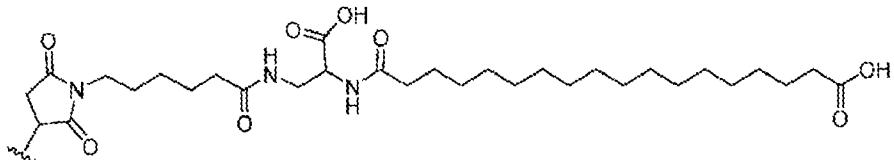
Tabla 15. Grupos de dosificación de ratones en el Ejemplo 12.

<b>Grupo</b>	<b>Agente de ARNi y dosis</b>	<b>Régimen de dosificación</b>
<b>1</b>	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
<b>2</b>	7,5 mg/kg de agente de ARNi de Hif2 $\alpha$ (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a, y que incluye además un resto diácido C18 enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
<b>6</b>	7,5 mg/kg de agente de ARNi de Hif2 $\alpha$ (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 2a, y que incluye además un resto diácido Mal-C18 enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

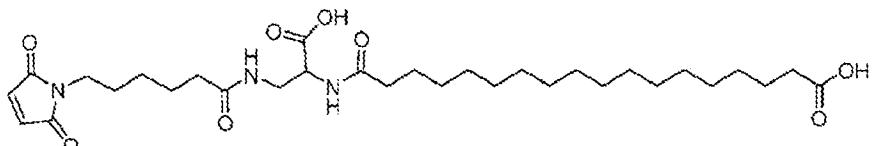
Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
7	7,5 mg/kg de agente de ARNi de Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 29a, y que incluye además un resto diácido Mal-C18 enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
8	7,5 mg/kg de agente de ARNi de Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 30a, y que incluye además un resto diácido Mal-C18 enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
9	7,5 mg/kg de agente de ARNi de Hif2α (AD04546) conjugado con un ligando dirigido a integrina tridentado de estructura 31a, y que incluye además un resto diácido Mal-C18 enlazado al constructo, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

5 Los agentes de ARNi se sintetizaron con secuencias de nucleótidos dirigidas a dirigirse al gen Hif2α humano e incluyeron un grupo reactivo de amina funcionalizado ( $\text{NH}_2\text{-C}_6$ ) en el extremo 5' terminal de la cadena de sentido para facilitar la conjugación con los ligandos dirigidos a integrinas.

10 Los agentes de ARNi se sintetizaron con un modulador de la FD denominado “resto diácido Mal-C18” que tiene la estructura:



15 en donde indica el punto de unión al agente de ARNi en el grupo C6-S- como se indica en AD05971 (véase el Ejemplo 2). El modulador de la FD se conjugó con el extremo 3' de la cadena de sentido reduciendo el grupo C6-SS-C6, como se muestra en la Tabla A, que se sometió a continuación a adición de Michael con el siguiente compuesto:



20 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2α humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.

Tabla 16. Expresión media relativa del ARNm de Hif2α en el momento del sacrificio en el Ejemplo 12.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	1,000	0,077	0,083
<b>Grupo 2</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, diárido Mal-C18)	0,456	0,113	0,150
<b>Grupo 6</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 28a, diárido Mal-C18)	0,649	0,072	0,081
<b>Grupo 7</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 29a, diárido Mal-C18)	0,426	0,054	0,062
<b>Grupo 8</b> (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 30a, diárido Mal-C18)	0,699	0,064	0,070

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
Grupo 9 (7,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 31a, diácido Mal-C18)	0,580	0,069	0,079

5 Como se muestra en la Tabla 16 anterior, cada uno de los conjugados de agente de ARNi del Hif2α y ligando dirigido a integrina mostró una reducción en la expresión de ARNm en comparación con el control.

10 Ejemplo 13. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumor renal.

15 Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2α (*EPAS1*).

20 El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

Tabla 17. Grupos de dosificación de ratones en el Ejemplo 13.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
4	5,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrina de estructura 2a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2a enlazado internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') del primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y enlazado adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
5	5,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrina de estructura 32a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 32a enlazado internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') del primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y enlazado adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
6	5,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrina de estructura 33a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 33a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') del primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
7	5,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrina de estructura 34a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 34a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') del primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

(i) Los ligandos dirigidos a avb3 están unidos a los nucleótidos 2'-O-propargilo (representados por aAlk, gAlk y uAlk en la secuencia de cadena de sentido modificada), que cuando se ven 5' → 3' en la secuencia de cadena de sentido están en los nucleótidos 14, 16, 18 y 20 en la cadena de sentido.

25 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2α humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa

5 basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.

10 Tabla 18. Expresión media relativa del ARNm de Hif2α en el momento del sacrificio en el Ejemplo 13.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	1,000	0,083	0,090
<b>Grupo 4</b> (5,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, tres ligandos internos de la estructura 2a y modulador de la FD con diácido C-18)	0,245	0,048	0,059
<b>Grupo 5</b> (5,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 32a, tres ligandos internos de la estructura 32a y modulador de la FD con diácido C-18)	0,213	0,065	0,094
<b>Grupo 6</b> (5,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 33a, tres ligandos internos de la estructura 33a y diácido C-18)	0,603	0,117	0,146
<b>Grupo 7</b> (5,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 34a, tres ligandos internos de la estructura 34a y diácido C-18)	0,528	0,067	0,077

Como se muestra en la Tabla 18 anterior, cada uno de los conjugados de agente de ARNi del Hif2α y ligando dirigido a integrina mostró una reducción en la expresión de ARNm en los ratones en comparación con el control, y los constructos que incluían los ligandos dirigidos a integrinas de la estructura 2a y la estructura 32a mostraron la mayor actividad inhibidora.

15 Ejemplo 14. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumor renal.

20 Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2α (EPAS1).

25 El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

30 Tabla 19. Grupos de dosificación de ratones en el Ejemplo 14.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
2	2,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(1)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
5	2,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 36a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 36a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(1)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
6	2,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene la estructura del ligando dirigido a integrina SM37-avb3, que tiene un ligando que se puede dirigir a diana de SM37-avb3 unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

<sup>(i)</sup> Los ligandos dirigidos a avb3 están unidos a los nucleótidos 2'-O-propargilo (representados por aAlk, gAlk y uAlk en la secuencia de cadena de sentido modificada), que cuando se ven 5' → 3' en la secuencia de cadena de sentido están en los nucleótidos 14, 16, 18 y 20 en la cadena de sentido.

- 5 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2α humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.
- 10

Tabla 20. Expresión media relativa del ARNm de Hif2α en el momento del sacrificio en el Ejemplo 14.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
Grupo 1 (glucosa isotónica)	1,000	0,090	0,099
Grupo 2 (2,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diácido C-18)	0,362	0,021	0,022
Grupo 5 (2,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 36a, tres ligandos internos de la estructura 36a y diácido C-18)	0,617	0,028	0,029
Grupo 6 (2,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 37a, tres ligandos internos de la estructura 37a y diácido C-18)	0,375	0,081	0,103

- 15 Como se muestra en la Tabla 20 anterior, cada uno de los conjugados de agente de ARNi del Hif2α y ligando dirigido a integrina mostró una reducción en la expresión de ARNm en comparación con el control.

20 Ejemplo 15. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumor renal.

25 Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2α (EPAS1).

30 El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

Tabla 21. Grupos de dosificación de ratones en el Ejemplo 15.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Glucosa isotónica (d5w (dextrosa al 5 % en agua)) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
2	2,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena	Inyección única el día 1

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
	antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	
3	4,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
6	2,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 38a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 38 a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
7	4,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 38a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 38a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
8	2,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 39a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 39a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
9	4,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 39a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 39a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
10	2,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 40a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 40a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
11	4,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 40a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 40a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
12	2,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 41a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 41a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
13	4,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres	Inyección única el día 1

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
	ligandos dirigidos a integrinas de estructura 41a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 41a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	

<sup>(i)</sup> Los ligandos dirigidos a avb3 están unidos a los nucleótidos 2'-O-propargilo (representados por aAlk, gAlk y uAlk en la secuencia de cadena de sentido modificada), que cuando se ven 5' → 3' en la secuencia de cadena de sentido están en los nucleótidos 14, 16, 18 y 20 en la cadena de sentido.

- 5 Se dosificaron tres (3) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=3). Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2α humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PP1A) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.
- 10

Tabla 22. Expresión media relativa del ARNm de Hif2α en el momento del sacrificio en el Ejemplo 15.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	1,000	0,247	0,327
<b>Grupo 2</b> (2,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diárido C-18)	0,286	0,037	0,043
<b>Grupo 3</b> (4,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diárido C-18)	0,263	0,035	0,040
<b>Grupo 6</b> (2,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 38a, tres ligandos internos de la estructura 38a y diárido C-18)	0,655	0,050	0,054
<b>Grupo 7</b> (4,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 38a, tres ligandos internos de la estructura 38a y diárido C-18)	0,488	0,042	0,046
<b>Grupo 8</b> (2,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 39a, tres ligandos internos de la estructura 39a y diárido C-18)	0,609	0,065	0,073
<b>Grupo 9</b> (4,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 39a, tres ligandos internos de la estructura 39a y diárido C-18)	0,518	0,050	0,055
<b>Grupo 10</b> (2,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 40a, tres ligandos internos de la estructura 40a y diárido C-18)	0,805	0,113	0,132
<b>Grupo 11</b> (4,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 40a, tres ligandos internos de la estructura 40a y diárido C-18)	0,738	0,091	0,104
<b>Grupo 12</b> (2,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 41a, tres ligandos internos de la estructura 41a y diárido C-18)	0,978	0,082	0,090
<b>Grupo 13</b> (4,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 41a, tres ligandos internos de la estructura 41a y diárido C-18)	0,779	0,106	0,123

- 15 Como se muestra en la Tabla 22 anterior, cada uno de los conjugados de agente de ARNi del Hif2α y ligando dirigido a integrina mostró una reducción en la expresión del ARNm en los ratones en comparación con el control.

- 20 Ejemplo 16. Administración *in vivo* de ligandos dirigidos a integrinas conjugados con agentes de ARNi dirigidos a HIF-2 alfa en ratones portadores de tumor renal.

5 Los agentes de ARNi que incluían una cadena de sentido y una cadena antisentido se sintetizaron según la tecnología de la fosforamidita en fase sólida según los procedimientos generales conocidos en la técnica y utilizados habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, tal como se expone en el Ejemplo 2 de la presente memoria. Los agentes de ARNi tenían las respectivas secuencias de nucleótidos modificadas expuestas en el Ejemplo 2 en la presente memoria y se diseñaron para dirigirse a Hif2α (*EPAS1*).

10 El día 1 del estudio, a los ratones portadores de tumores renales (véase el Ejemplo 4) se les administró una dosis mediante inyección en la vena de la cola según los siguientes grupos de dosificación:

15 Tabla 23. Grupos de dosificación de ratones en el Ejemplo 16.

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
1	Solución salina (0,9 %) (sin agente de ARNi)	Inyección única el día 1
2	2,5 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
3	5,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
4	10,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
5	2,5 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
6	5,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
7	10,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2.11a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2.11a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
8	2,5 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena	Inyección única el día 1

Grupo	Agente de ARNi y dosis	Régimen de dosificación
	antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	
<b>9</b>	5,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrina de estructura 2a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') del primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1
<b>10</b>	10,0 mg/kg del agente de ARNi alfa de HIF-2 AD05971, enlazado en el extremo 5' de la cadena de sentido a un grupo que se puede dirigir a diana tridentado que tiene tres ligandos dirigidos a integrinas de estructura 2a, con un ligando dirigido a integrina de estructura 2a unido internamente en la posición 2' de cada uno de los nucleótidos 2, 4, 6 y 8 (3'→5') desde el primer nucleótido que forma un par de bases con la cadena antisentido <sup>(i)</sup> , y unido adicionalmente en el extremo 3' de la cadena de sentido al modulador de la FD diácido Mal-C18, formulado en glucosa isotónica.	Inyección única el día 1

<sup>(i)</sup> Los ligandos dirigidos a avb3 están unidos a los nucleótidos 2'-O-propargilo (representados por aAlk, gAlk y uAlk en la secuencia de cadena de sentido modificada), que cuando se ven 5' → 3' en la secuencia de cadena de sentido están en los nucleótidos 14, 16, 18 y 20 en la cadena de sentido.

- 5 Se dosificaron cuatro (4) ratones portadores de tumores en cada Grupo (n=4), excepto para el grupo 4 que solo tenía tres (3) ratones, ya que se consideró que un ratón tenía una inyección defectuosa. Los ratones se sacrificaron el día 8 del estudio después de la inyección, y el ARN total se aisló del tumor de riñón según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 4. La expresión relativa de ARNm de HIF2α humano se cuantificó a continuación mediante PCR cuantitativa basada en sonda (RT-qPCR), se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina A humana (PPIA) y se expresó como fracción del grupo de control de vehículo (glucosa isotónica) (media geométrica, +/- intervalo de confianza del 95 %), como se explica en el Ejemplo 4.
- 10
- 15

Tabla 24. Expresión media relativa del ARNm de Hif2α en el momento del sacrificio en el Ejemplo 16.

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 1</b> (glucosa isotónica)	1,000	0,180	0,220
<b>Grupo 2</b> (2,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diárido C-18)	0,278	0,068	0,091
<b>Grupo 3</b> (5,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diárido C-18)	0,229	0,062	0,086
<b>Grupo 4</b> (10,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diárido C-18)	0,202	0,014	0,015
<b>Grupo 5</b> (2,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diárido C-18)	0,324	0,035	0,040
<b>Grupo 6</b> (5,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diárido C-18)	0,308	0,018	0,019
<b>Grupo 7</b> (10,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2.11a, tres ligandos internos de la estructura 2.11a y diárido C-18)	0,197	0,041	0,052
<b>Grupo 8</b> (2,5 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, tres ligandos internos de la estructura 2a y diárido C-18)	0,218	0,048	0,062
<b>Grupo 9</b> (5,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, tres ligandos internos de la estructura 2a y diárido C-18)	0,160	0,065	0,109

Id. del grupo	Expresión relativa promedio del ARNm de huHIF2α	Bajo (error)	Alto (error)
<b>Grupo 10</b> (10,0 mg/kg de agente de ARNi y ligando dirigido a integrina tridentado de la estructura 2a, tres ligandos internos de la estructura 2a y diácido C-18)	0,276	0,053	0,066

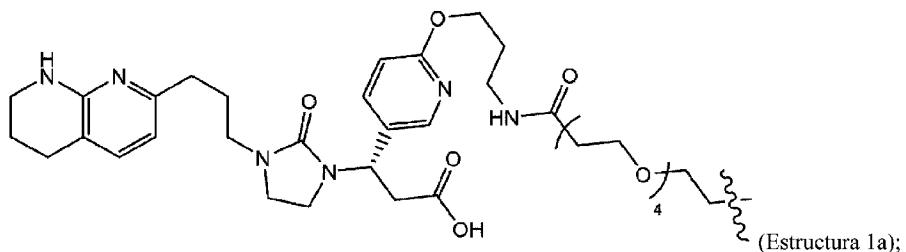
5

Como se muestra en la Tabla 24 anterior, cada uno de los conjugados de agente de ARNi del Hif2α y ligando dirigido a integrina mostró una reducción en la expresión de ARNm en los ratones en comparación con el control.

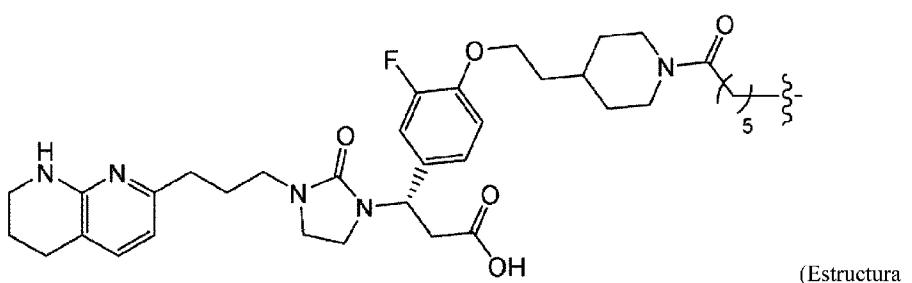
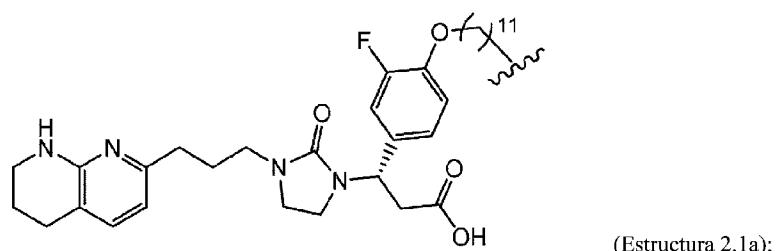
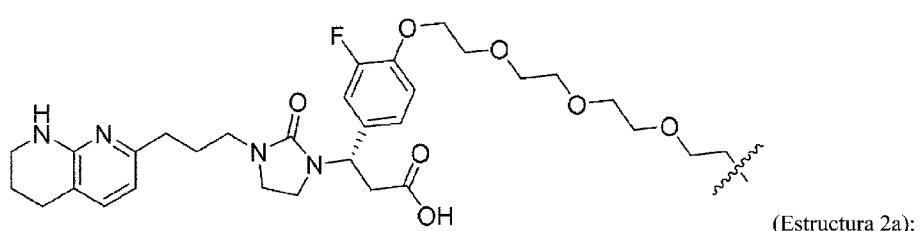
5

## REIVINDICACIONES

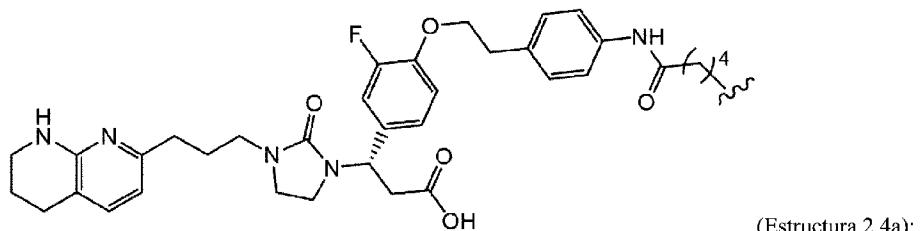
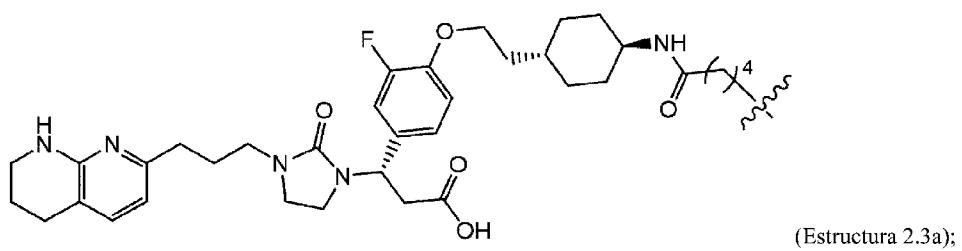
1. Un ligando dirigido a integrinas que comprende una fórmula seleccionada de:



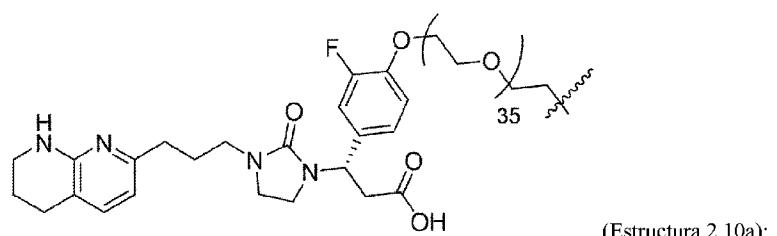
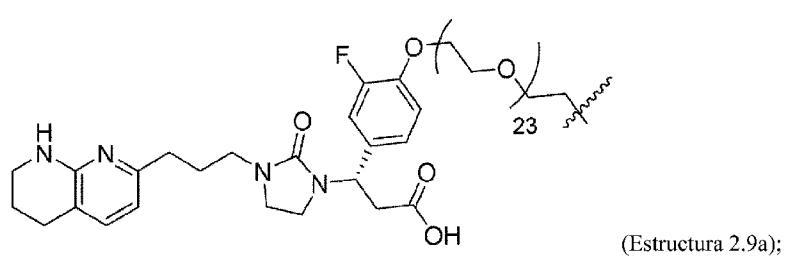
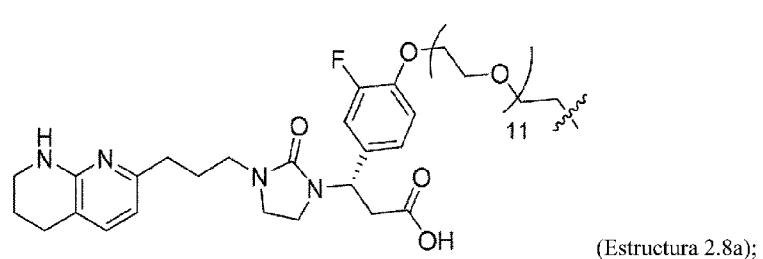
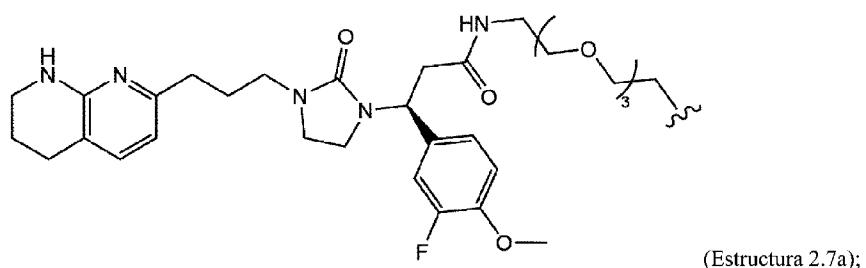
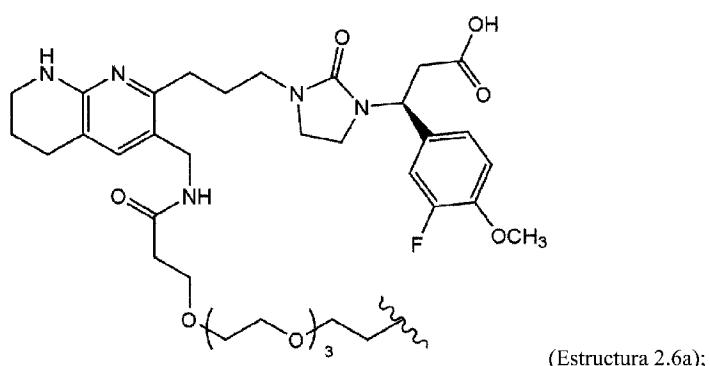
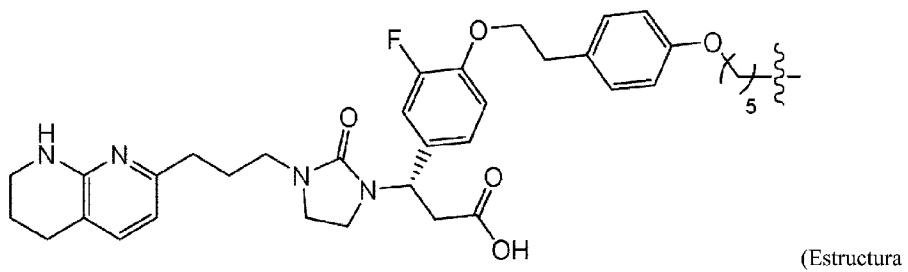
10



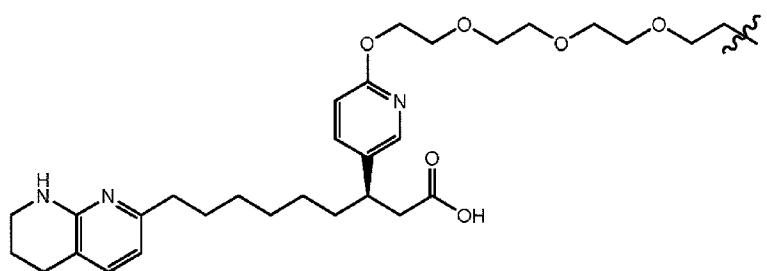
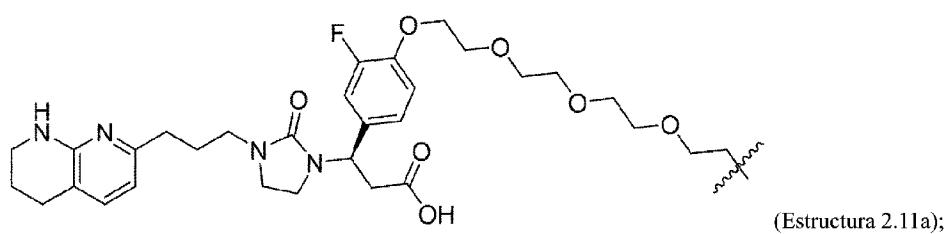
15



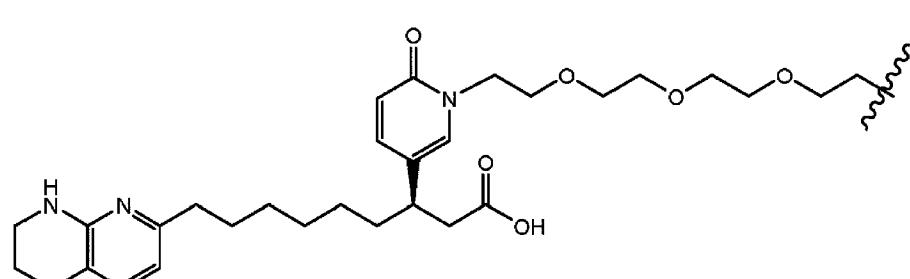
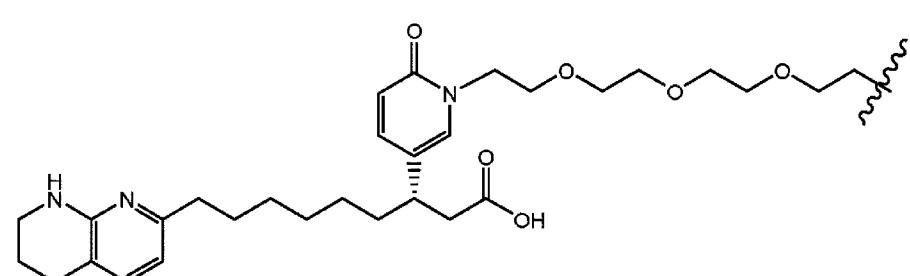
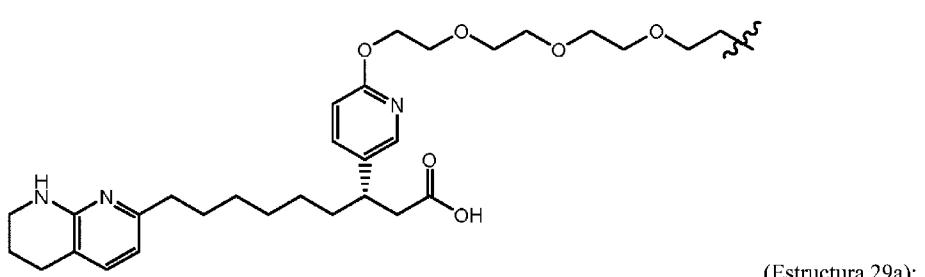
20



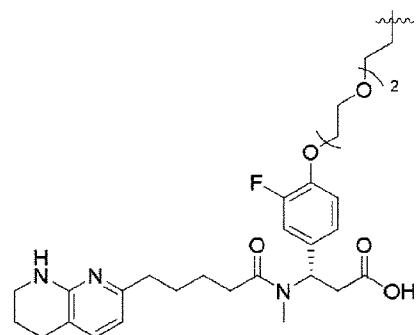
5



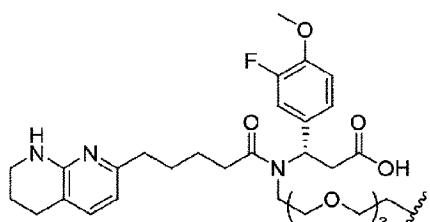
10



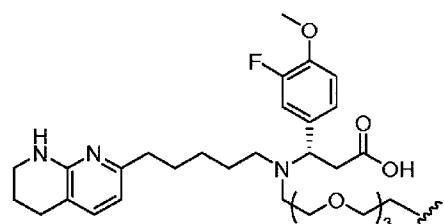
15



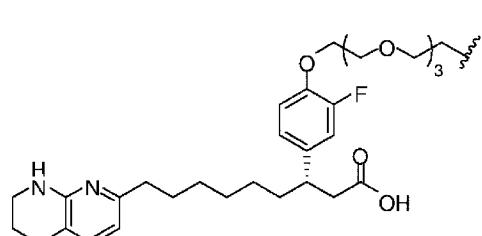
(Estructura 32a);



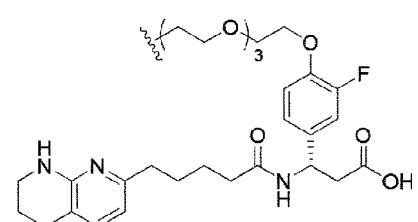
(Estructura 33a);



(Estructura 34a);



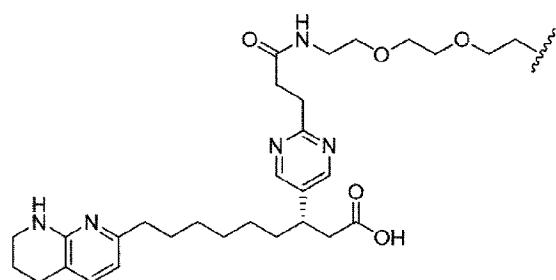
(Estructura 36a);



(Estructura 37a);

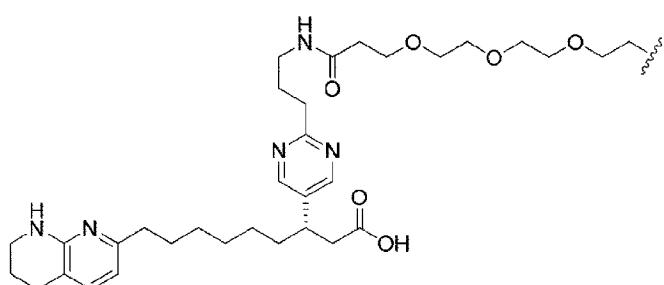
5

10

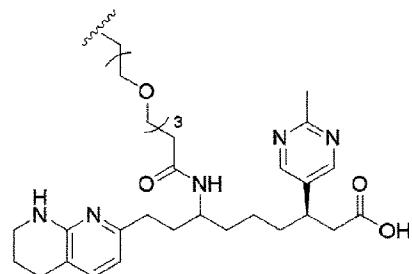


5

(Estructura 38a);

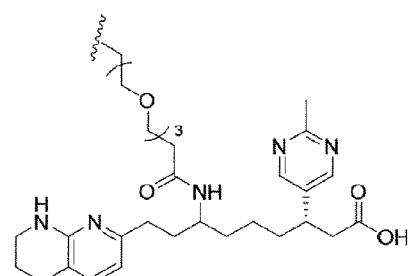


(Estructura 39a);



(Estructura 40a); y

10



(Estructura 41a)

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde indica el punto de conexión a un compuesto basado en oligonucleótidos.

- 15 2. El ligando dirigido a integrinas de la reivindicación 1, en donde el ligando dirigido a integrinas se conjuga con un agente de ARNi.
- 20 3. El ligando dirigido a integrinas de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el ligando dirigido a integrinas comprende además un enlazador de polietilenglicol que tiene 2-20 unidades de óxido de etileno.
4. Una composición que comprende el ligando de integrinas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5        5. La composición de la reivindicación 4, en donde el ligando dirigido a integrinas se conjuga con un compuesto basado en oligonucleótidos que es al menos parcialmente complementario a una secuencia codificante de un gen diana en una célula que expresa una integrina.
- 10      6. La composición de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde el compuesto basado en oligonucleótidos es un agente de ARNi.
- 15      7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la integrina es  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  o tanto  $\alpha v\beta 3$  como  $\alpha v\beta 5$ .
- 20      8. Uso de (i) una composición que comprende un ligando dirigido a integrinas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o (ii) una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 para suministrar un compuesto basado en oligonucleótidos a una célula que expresa integrina  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ , o tanto  $\alpha v\beta 3$  como  $\alpha v\beta 5$  *in vitro*.
- 25      9. El uso de la reivindicación 8, en donde el compuesto basado en oligonucleótidos es un agente de ARNi.
10. Una composición que comprende un ligando dirigido a integrinas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 para su uso como medicamento para suministrar un compuesto basado en oligonucleótidos a una célula o tejido de un sujeto *in vivo*.
- 30      11. Composición para su uso de la reivindicación 10, en donde la célula es una célula renal.
12. Composición para su uso como medicamento de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el compuesto basado en oligonucleótidos es un agente de ARNi.
- 35      13. Una composición que incluye un agente de ARNi conjugado con un ligando dirigido a integrinas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o (ii) una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 para su uso en un tratamiento que comprende inhibir la expresión de un gen diana en una célula que expresa integrina  $\alpha v\beta 3$ , integrina  $\alpha v\beta 5$ , o tanto integrina  $\alpha v\beta 3$  como  $\alpha v\beta 5$ .
14. Composición para su uso de la reivindicación 13, en donde el gen diana es EPAS1 (HIF2 alfa).
15. Composición para su uso de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde la célula es una célula tumoral de carcinoma renal de células claras.