

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 506**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)

C07K 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/US2014/070800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095301**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14835606 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3082877**

54 Título: **Péptidos citotóxicos y conjugados de estos**

30 Prioridad:
17.12.2013 US 201361917293 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2020

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:
**GEIERSTANGER, BERNHARD;
GRUNEWALD, JAN;
OU, WEIJIA;
UNO, TETSUO;
WAN, YONGQIN;
WANG, XING y
JIN, YUNHO**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 758 506 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).

DESCRIPCIÓN

Péptidos citotóxicos y conjugados de estos

5 Campo de la invención

La invención proporciona compuestos que son péptidos citotóxicos antimitóticos, y son útiles para tratar trastornos proliferativos celulares. La invención también incluye conjugados que comprenden dichos péptidos citotóxicos conectados a un resto de unión a antígeno y a composiciones farmacéuticas que contienen estos conjugados. También se incluyen métodos para utilizar estos compuestos y conjugados para tratar trastornos de proliferación celular, incluidos cánceres.

Antecedentes

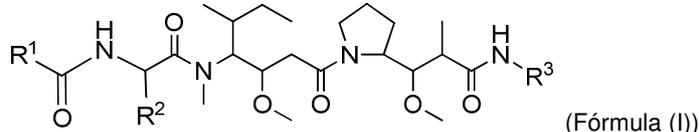
15 El uso de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) para el suministro dirigido de inhibidores de la proliferación celular y/o agentes citotóxicos para células específicas ha sido el foco de una investigación considerable. *Antibody-Drug Conjugate, Methods in Molecular Biology*, Vol. 1045, Editor L. Ducry, Humana Press (2013). Los ADC incluyen un anticuerpo seleccionado por su capacidad para unirse a una célula utilizada como diana para la intervención terapéutica, conectado a un fármaco seleccionado por su actividad citostática o citotóxica. La unión del anticuerpo a la célula utilizada como diana suministra de este modo el fármaco al sitio en el que se requiere el efecto terapéutico.

Muchos anticuerpos que reconocen y se unen selectivamente a las células utilizadas como diana, como las células cancerosas, se han divulgado para su uso en ADC, y también se han descrito muchos métodos para unir compuestos de carga (fármaco) tales como citotoxinas a los anticuerpos. Sin embargo, a pesar del trabajo exhaustivo sobre ADC, solamente unas pocas clases de inhibidores de la proliferación celular se han utilizado extensamente como cargas de ADC. Aunque el primer ADC aprobado para el uso en seres humanos en los EE. UU. se lanzó en el 2000 (y más tarde se retiró del mercado), una década más tarde, solamente unas pocas clases químicas de compuestos farmacológicos (maitansinoides, auristatinas, calicheamicinas y duocarmicinas) han alcanzado los ensayos clínicos como cargas para ADC. *Antibody-Drug Conjugates: the Next Generation of Moving Parts*, A. Lash, *Start-Up*, Dic. de 2011, 1-6. Dado el ampliamente reconocido valor de los ADC como productos terapéuticos, particularmente para tratar el cáncer, continúa habiendo por tanto una necesidad de péptidos citotóxicos con propiedades mejoradas para su uso como cargas en los ADC.

Compendio de la invención

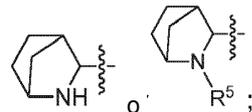
35 La invención proporcionada en la presente incluye péptidos citotóxicos y métodos para utilizar dichos péptidos citotóxicos como el componente farmacológico de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). La presente invención incluye péptidos citotóxicos novedosos y el uso de dichos péptidos citotóxicos novedosos como cargas para ADC. La invención incluye además métodos e intermedios útiles para incorporar dichos péptidos citotóxicos novedosos en ADC, y métodos para utilizar los compuestos y conjugados novedosos para tratar trastornos de proliferación celular. Dichos péptidos citotóxicos son agentes antimitóticos que inhiben la división celular bloqueando la polimerización de la tubulina y, de este modo, bloqueando la migración nuclear y la división celular y nuclear.

45 En un aspecto de la invención hay péptidos citotóxicos, o estereoisómeros de estos, y sales farmacéuticamente aceptables de estos, que tienen la estructura de Fórmula (I)

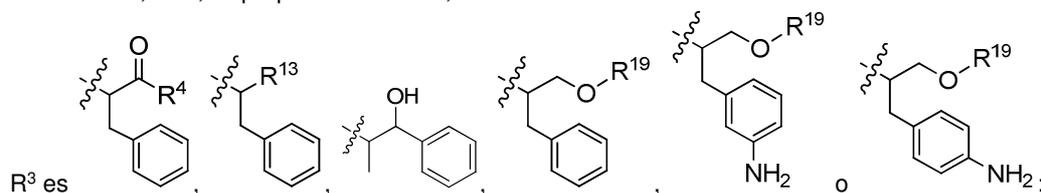


donde:

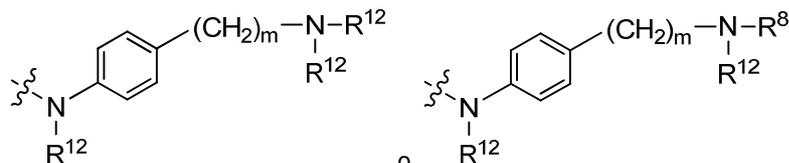
R¹ es



50 R² es metilo, etilo, isopropilo o *sec*-butilo;



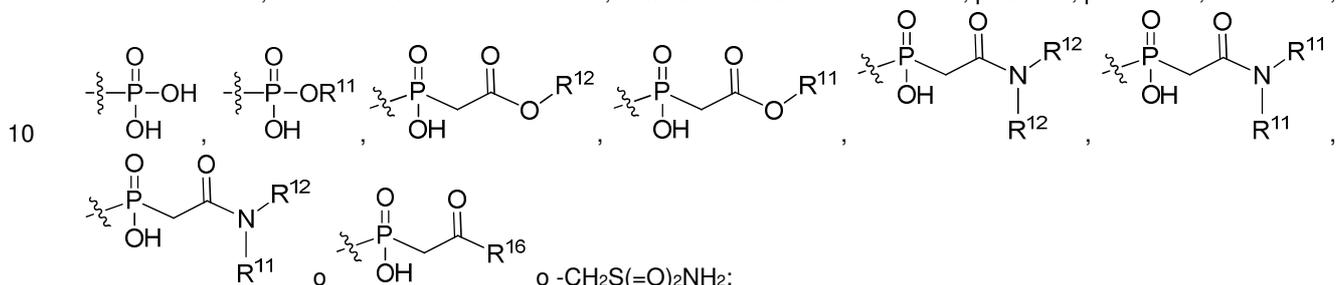
R⁴ es -OH, alcoxi C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶, -NR¹²(CH₂)_mN(R¹⁴)₂, -NR¹²(CH₂)_mR¹⁶, -NHS(O)₂R¹¹,



R⁵ es alquilo C₁-C₆, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², -((CH₂)_mO)_nR¹² o alquilo C₁-C₆ que se sustituye opcionalmente con -CN, -C(=O)NH₂ o de 1 a 5 hidroxilos,

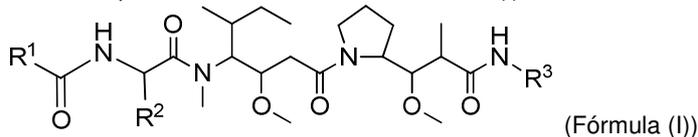
R⁸ es H;
 cada R¹¹ se selecciona independientemente entre alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ que se sustituye opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;
 cada R¹² se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

R¹³ es tetrazolilo, imidazolilo sustituido con fenilo, oxadiazolilo sustituido con fenilo, pirazolilo, pirimidinilo,

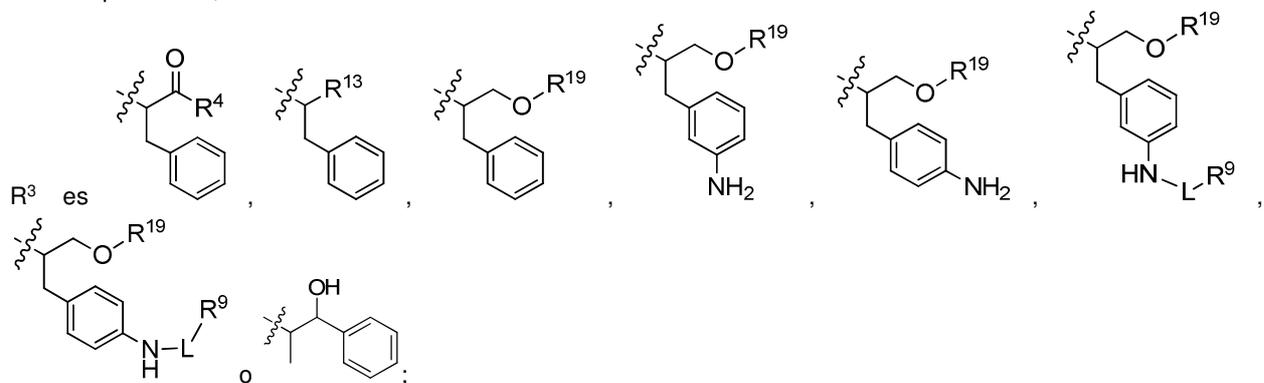


o -CH₂S(=O)₂NH₂;
 cada R¹⁴ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;
 R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros sin sustituir conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;
 R¹⁹ es H o alquilo C₁-C₆;
 cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y
 cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En la presente se divulgan péptidos citotóxicos, o un estereoisómero de estos, y sales farmacéuticamente aceptables de estos, que tienen la estructura de Fórmula (I)

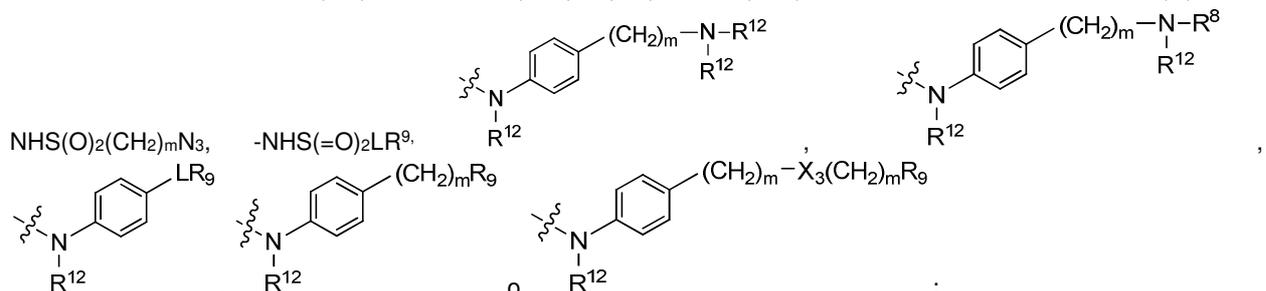


donde:
 R¹ es un heterocicloalquilo de 6 miembros conectado en C que contiene 1-2 heteroátomos de N y un puente alqueno C₁-C₂ o R¹ es un heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros conectado en C que contiene 1-2 heteroátomos de N, donde cada uno está sin sustituir o cada uno está sustituido con un R⁷ y de 0 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶, o cada uno está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;
 R² es alquilo C₁-C₆;



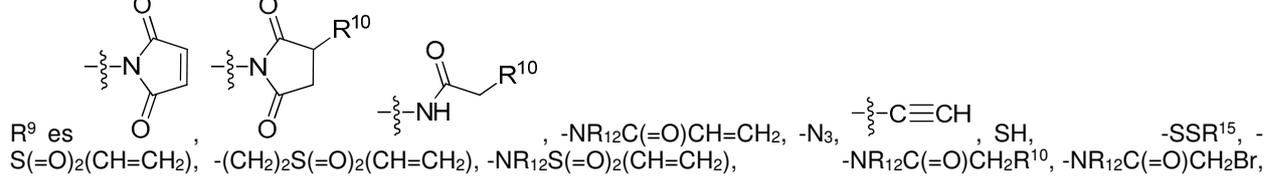
R³ es

R⁴ es -OH, alcoxi C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶, -NR¹²(CH₂)_mN(R¹⁴)₂, -NR¹²(CH₂)_mR¹⁶, -LR⁹, -NHS(O)₂R₁₁, -

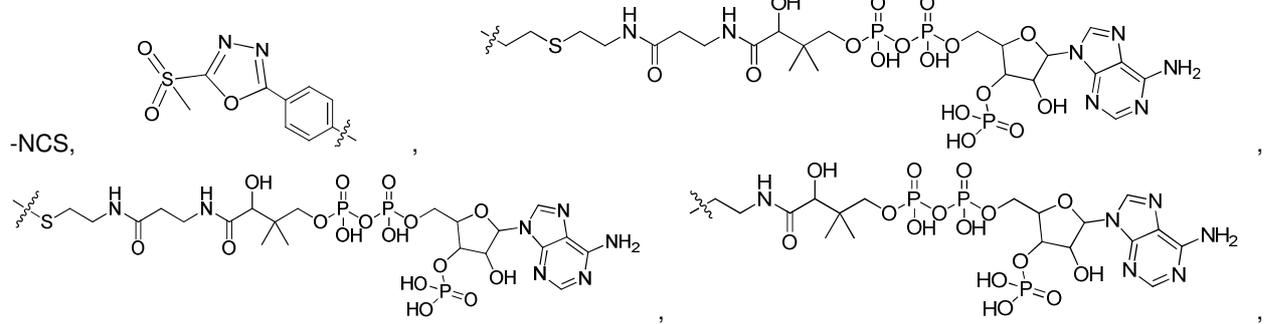


5 R⁵ es alquilo C₁-C₆, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², -((CH₂)_mO)_nR¹², o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con -CN, -C(=O)NH₂ o de 1 a 5 hidroxilos;
 R⁶ es halo, oxo, OH, alquilo C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶ y -NR¹²C(=O)R¹¹;
 R⁷ es LR⁹;
 R⁸ es H o LR⁹;

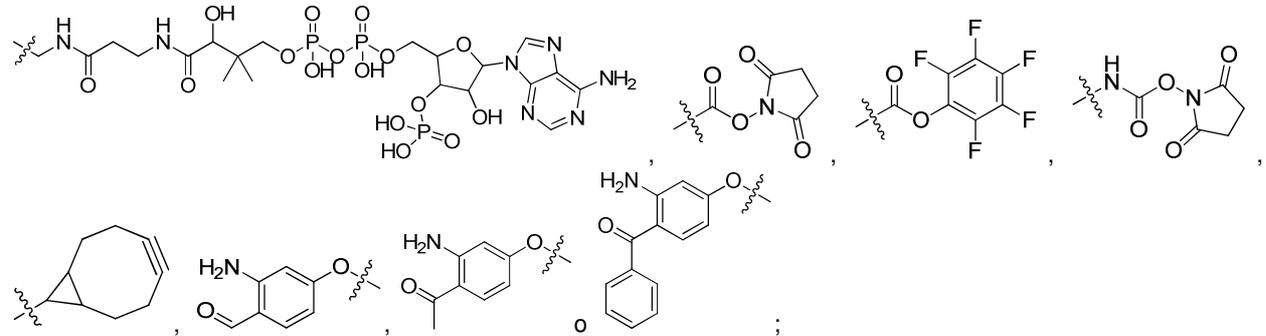
10 cada L se selecciona independientemente entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂-, -L₂L₁- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;

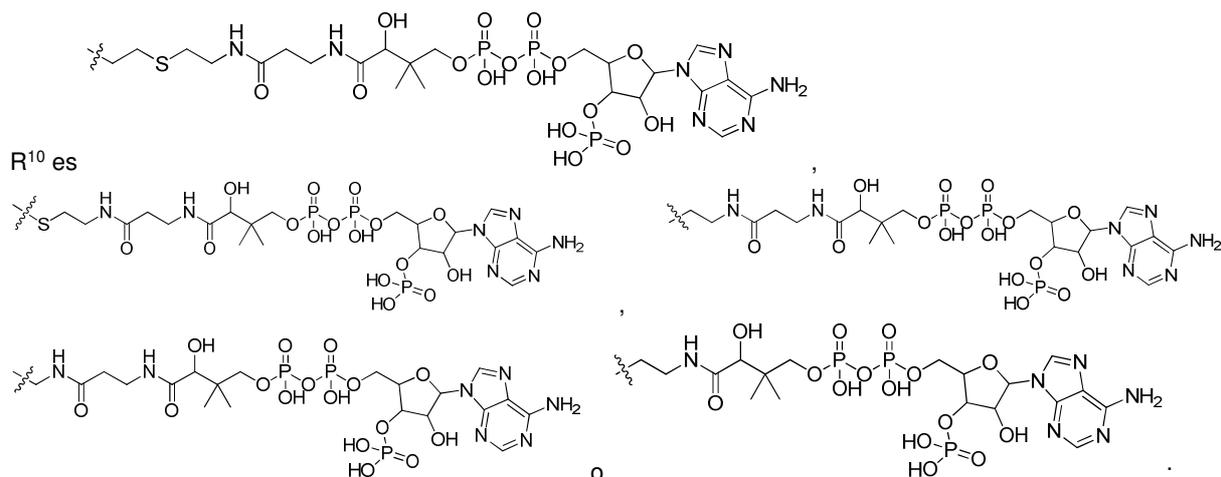


R⁹ es S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NR₁₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NR₁₂C(=O)CH=CH₂, -N₃, -NR₁₂C(=O)CH₂R¹⁰, -NR₁₂C(=O)CH₂Br, -NR₁₂C(=O)CH₂I, -NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -ONH₂, -C(O)NHNH₂, -CO₂H, -NH₂, -NCO,

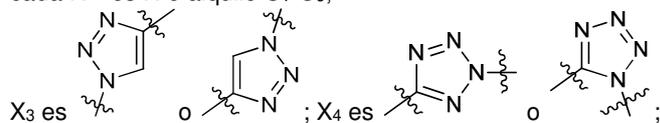
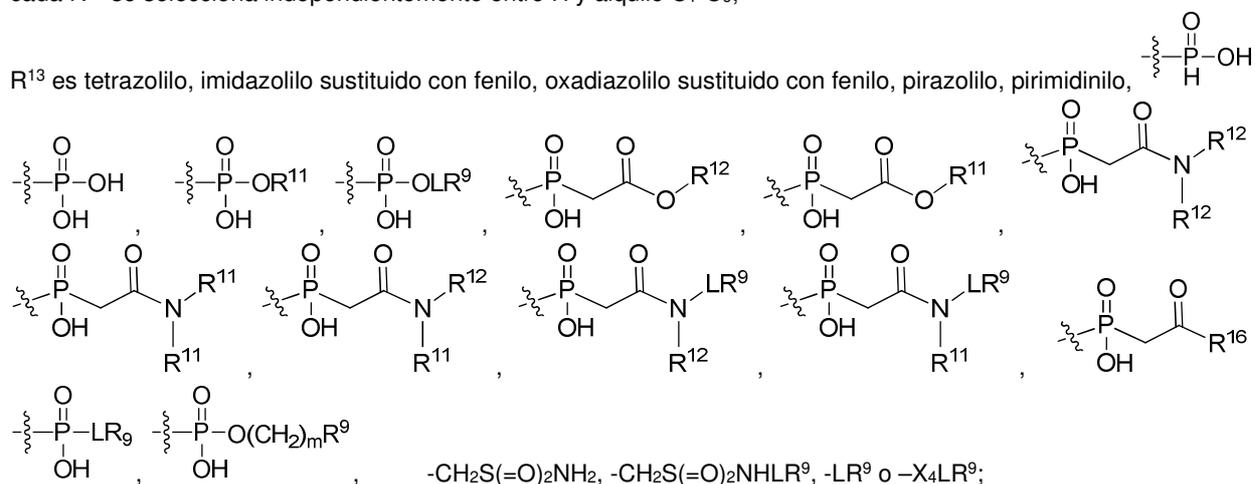


15



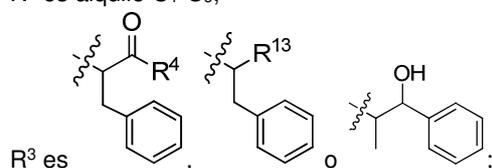


- 5 cada R¹¹ se selecciona independientemente entre alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ que se sustituye opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;
 cada R¹² se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

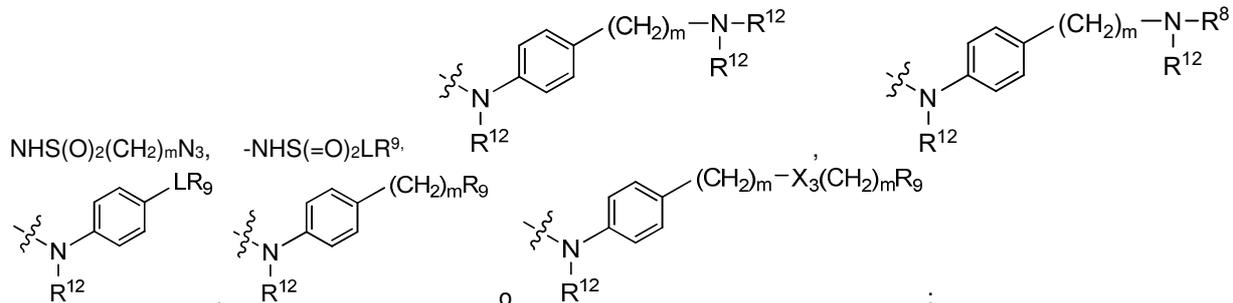


cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; y
 cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

- 20 En la presente se divulgan también compuestos de fórmula (I), donde,
 R¹ es un heterocicloalquilo de 6 miembros conectado en C que contiene 1-2 heteroátomos de N y un puente alquileo C₁-C₂ o R¹ es un heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros conectado en C que contiene 1-2 heteroátomos de N, donde cada uno está sin sustituir o cada uno está sustituido con un R⁷ y de 0 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶, o cada uno está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;
- 25 R² es alquilo C₁-C₆;



R⁴ es -OH, alcoxi C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶, -NR¹²(CH₂)_mN(R¹⁴)₂, -NR¹²(CH₂)_mR¹⁶, -LR⁹, -NHS(O)₂R¹¹, -



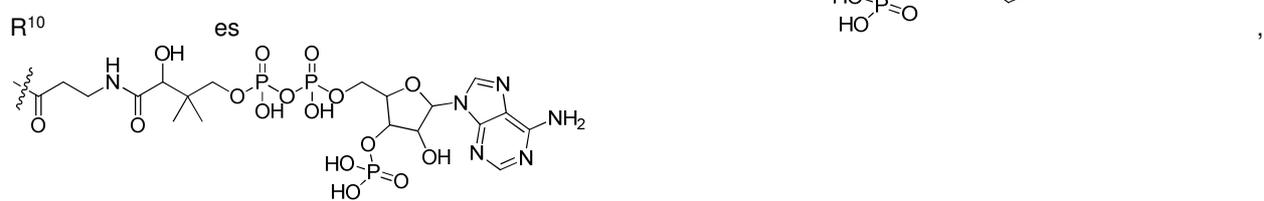
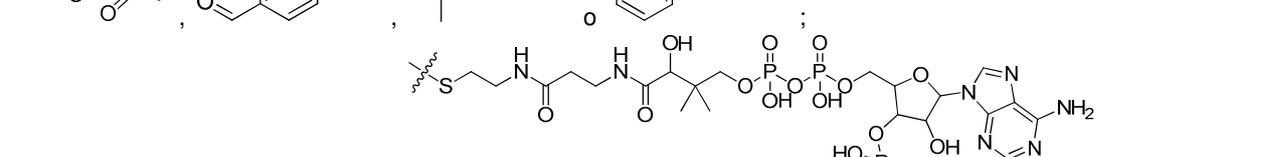
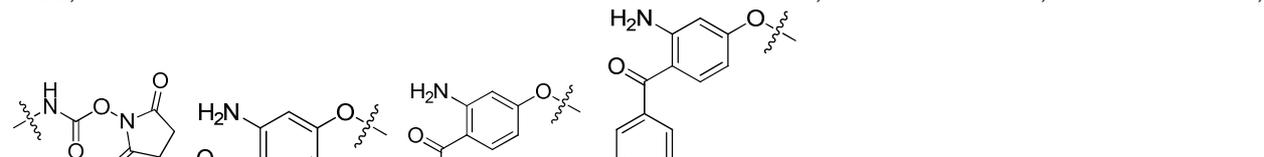
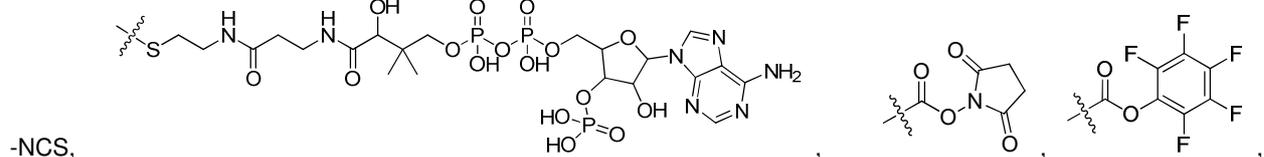
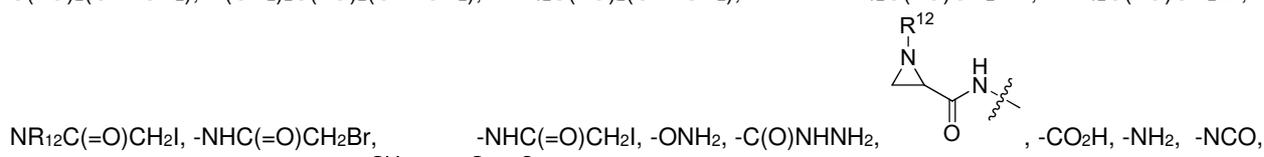
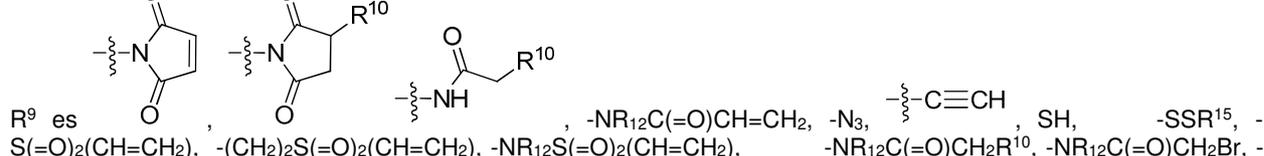
R⁵ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², o -(CH₂)_mO)_nR¹²;

R⁶ es halo, oxo, OH, alquilo C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶ y -NR¹²C(=O)R¹¹;

R⁷ es LR⁹;

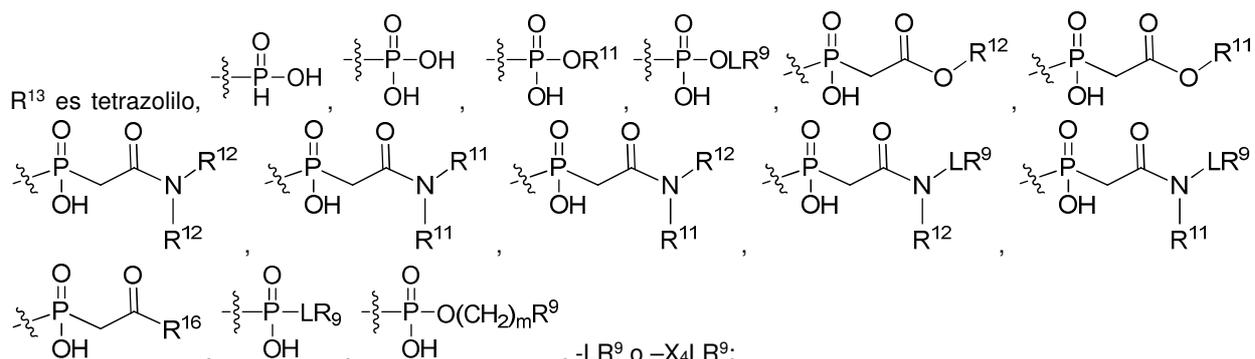
R⁸ es H o LR⁹;

cada L se selecciona independientemente entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆⁻, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁⁻, -L₁L₂L₃L₄L₅⁻, -L₅L₄L₃L₂L₁⁻, -L₁L₂L₃L₄⁻, -L₄L₃L₂L₁⁻, -L₁L₂L₃⁻, -L₃L₂L₁⁻, -L₁L₂⁻, -L₂L₁⁻ y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;



cada R¹¹ se selecciona independientemente entre alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ que se sustituye opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;

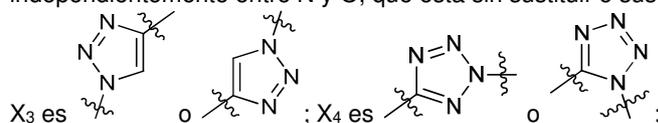
cada R¹² se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;



5 cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

R¹⁵ es 2-piridilo o 4-piridilo;

R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O, que está sin sustituir o sustituido con -LR⁹;



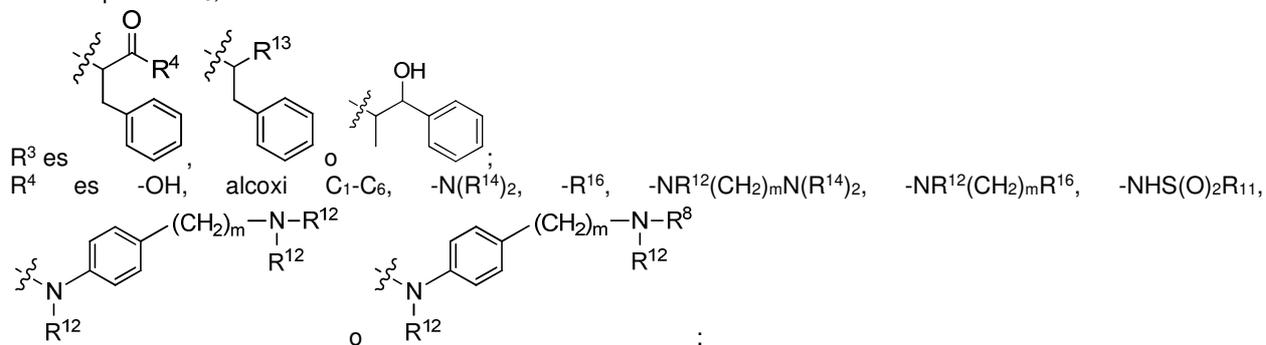
10 cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; y

cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En determinadas realizaciones de este aspecto de los péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (I), R¹ es un heterocicloalquilo de 6 miembros conectado en C que contiene 1-2 heteroátomos de N y un puente alquileo C₁-C₂ o R¹ es un heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros conectado en C que contiene 1-2 heteroátomos de N, donde cada uno está sin sustituir o cada uno está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;

15

R² es alquilo C₁-C₆;



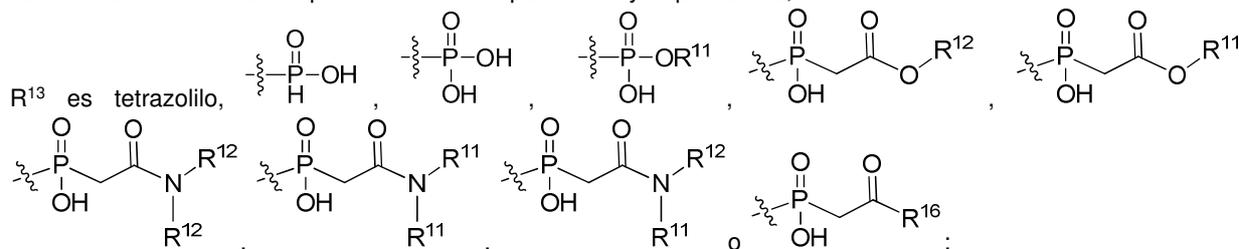
R⁵ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², o -(CH₂)_mO)_nR¹²;

R⁶ es halo, oxo, OH, alquilo C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶ y -NR¹²C(=O)R¹¹;

R⁸ es H;

25 cada R¹¹ se selecciona independientemente entre alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ que se sustituye opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;

cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;



30 cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

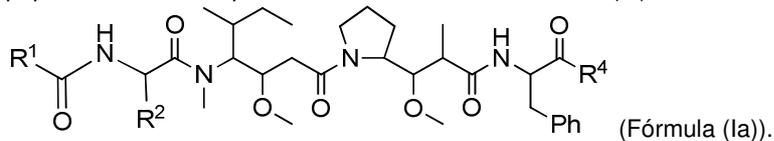
R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros sin sustituir conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

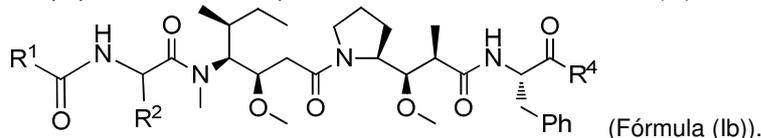
cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

35

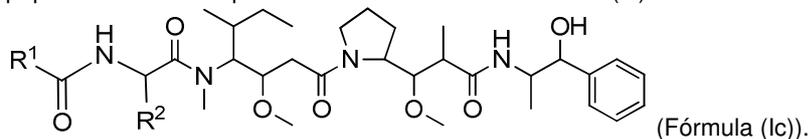
En determinadas realizaciones de este aspecto de los péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (I), son péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (Ia):



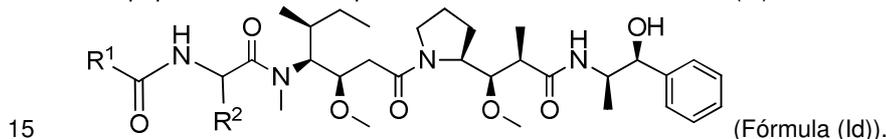
5 En otras realizaciones del aspecto de los péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (I) o Fórmula (Ia), son péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (Ib):



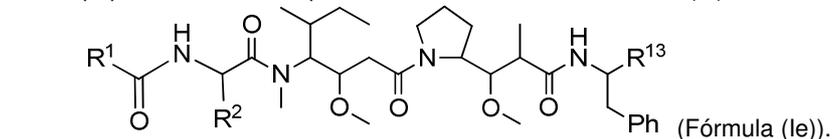
10 En determinadas realizaciones del aspecto de los péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (I), son péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (Ic):



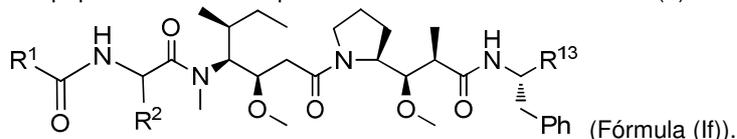
En otras realizaciones del aspecto de los péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (I) o Fórmula (Ic), son péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (Id):



En determinadas realizaciones del aspecto de los péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (I), son péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (Ie):



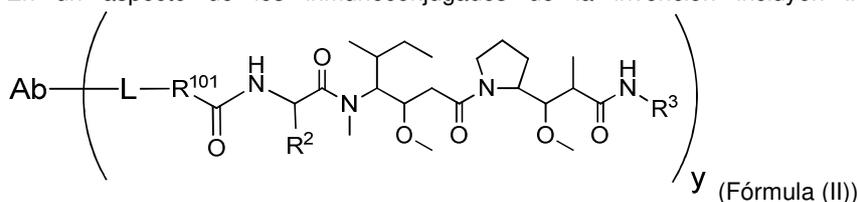
20 En otras realizaciones del aspecto de los péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (I) o Fórmula (Ie), son péptidos citotóxicos que tienen la estructura de Fórmula (If):



25 La presente invención proporciona inmunoconjugados, también denominados en la presente ADC, que contienen péptidos citotóxicos conectados a un resto de unión a antígeno tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Estos conjugados que comprenden péptidos citotóxicos son útiles para tratar trastornos de proliferación celular, particularmente cuando el péptido citotóxico está conectado con un anticuerpo que reconoce células cancerosas y, por tanto, promueve el suministro de los péptidos citotóxicos a una célula utilizada como diana para el ataque. Los inmunoconjugados son especialmente útiles para tratar determinados tipos de cáncer tal como se detalla adicionalmente en la presente. Los datos proporcionados en la presente demuestran que estos inmunoconjugados son inhibidores eficaces de la proliferación celular; sin ceñirse a ninguna teoría, se cree que su actividad se debe a la inhibición de la polimerización de la tubulina en las células.

30

En un aspecto de los inmunocombinados de la invención incluyen inmunocombinados de Fórmula (II):



donde:

Ab representa un resto de unión a antígeno;

- 5 L se selecciona entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂-, -L₂L₁- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;

y es un número entero de 1 a 16;

R¹⁰¹ es un radical divalente heterocicloalquílico de 6 miembros que contiene 1-2 heteroátomos de N y un puente



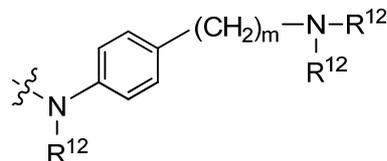
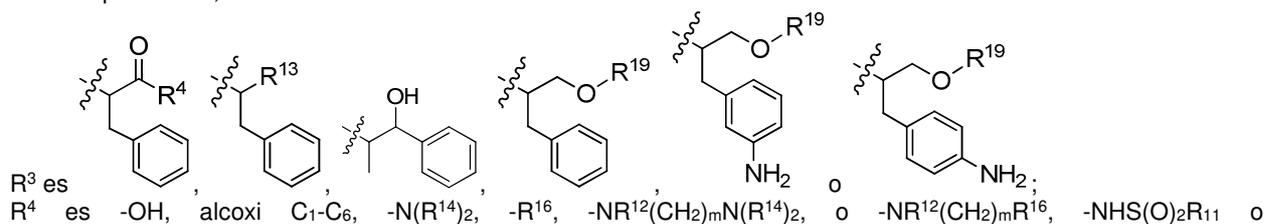
- 10 alqueno C₁-C₂, donde el radical divalente heterocicloalquílico de 6 miembros está conectado en C al grupo y está conectado en N a L₁, o está conectado en C a L₁, y el radical divalente heterocicloalquílico de 6 miembros está sin sustituir o sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;

o R¹⁰¹ es un radical divalente heterocicloalquílico bicíclico fusionado de 5-8 miembros que contiene 1-2 heteroátomos de N, donde el radical divalente heterocicloalquílico bicíclico fusionado de 5-8 miembros está conectado en C al grupo



- 15 y está conectado en N a L₁, o está conectado en C a L₁, y el radical divalente heterocicloalquílico bicíclico fusionado de 5-8 miembros está sin sustituir o sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;

R² es alquilo C₁-C₆;



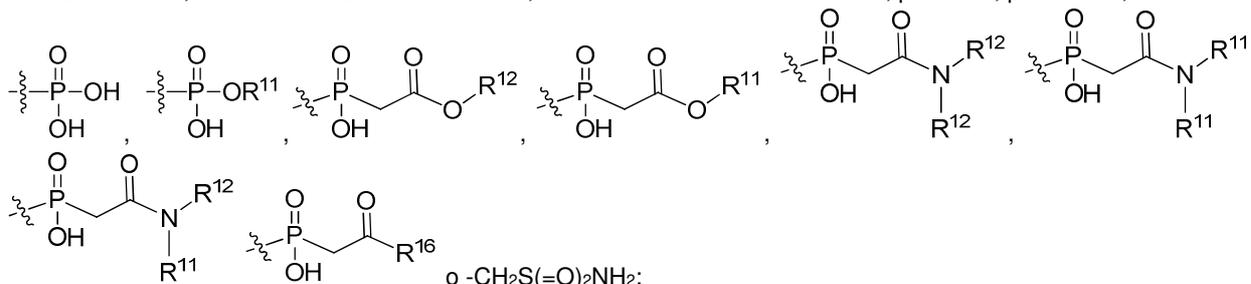
- 20 R⁵ es alquilo C₁-C₆, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², -((CH₂)_mO)_nR¹², o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con -CN, -C(=O)NH₂ o de 1 a 5 hidroxilos,

R⁶ es halo, oxo, OH, alquilo C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶ y -NR¹²C(=O)R¹¹;

R¹¹ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;

- 25 cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

R¹³ es tetrazolilo, imidazolilo sustituido con fenilo, oxadiazolilo sustituido con fenilo, pirazolilo, pirimidinilo, ,



- 30 cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;

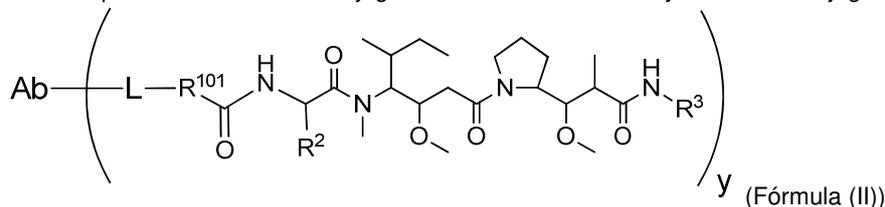
R¹⁹ es H o alquilo C₁-C₆;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10,

y

cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

5 En un aspecto de los inmunocombinados de la invención incluyen inmunocombinados de Fórmula (II):



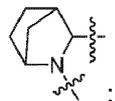
donde:

Ab representa un resto de unión a antígeno;

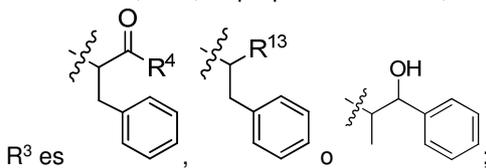
L se selecciona entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;

10 y es un número entero de 1 a 16;

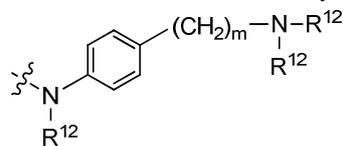
R¹⁰¹ es



R² es metilo, etilo, isopropilo o sec-butilo;



15 R³ es -OH, C₁-C₆alkoxy, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶, -NR¹²(CH₂)_mN(R¹⁴)₂, o -NR¹²(CH₂)_mR¹⁶, -NHS(O)₂R₁₁ o

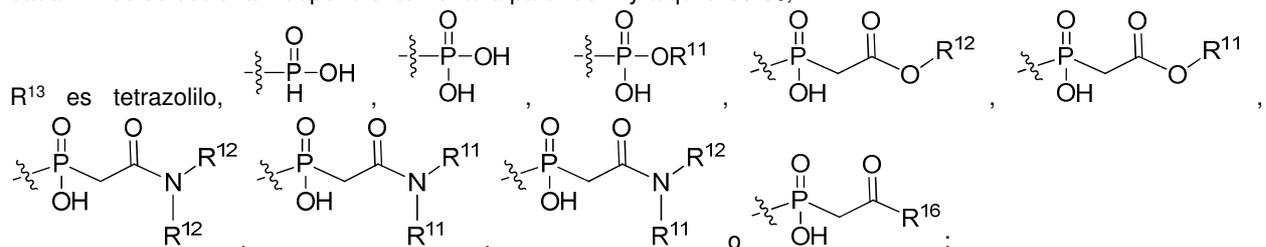


20 R⁵ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², o -((CH₂)_mO)_nR¹²;

R⁶ es halo, oxo, OH, alquilo C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶ y -NR¹²C(=O)R¹¹;

R¹¹ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;

cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;



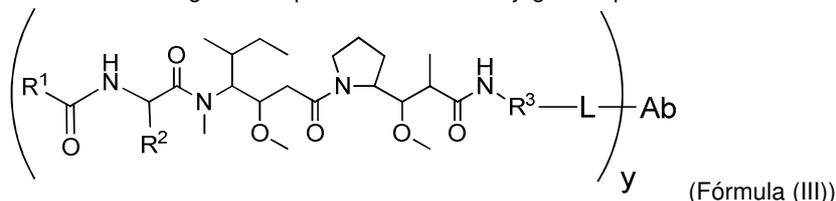
25 cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

30 cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

También se divulgan en la presente inmunocombinados que tienen la estructura de Fórmula (III):



donde:

Ab representa un resto de unión a antígeno;

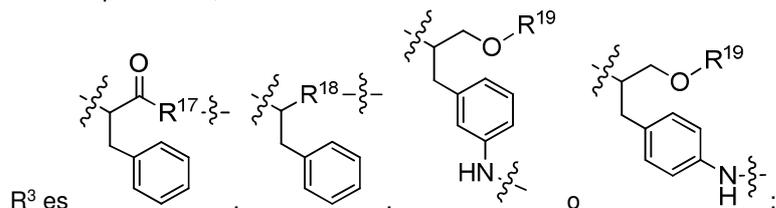
L se selecciona entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂-, -L₂L₁- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;

5 y es un número entero de 1 a 16;

R¹ es un heterocicloalquilo de 6 miembros que contiene 1-2 heteroátomos de N y un puente alquileo C₁-C₂, donde el heterocicloalquilo de 6 miembros está sin sustituir o sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;

10 o R¹ es un heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros que contiene 1-2 heteroátomos de N, donde el heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros está sin sustituir o sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;

R² es alquilo C₁-C₆;



R³ es

15 R⁵ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², o -((CH₂)_mO)_nR¹²;

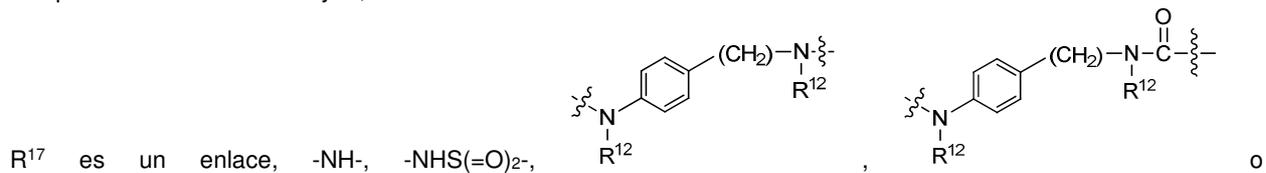
R⁶ es halo, oxo, OH, alquilo C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶ y -NR¹²C(=O)R¹¹;

R¹¹ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;

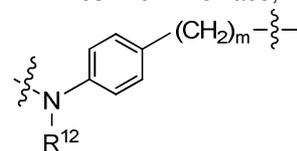
cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

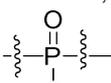
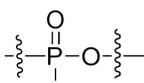
cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

20 R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;



R¹⁷ es un enlace, -NH-, -NHS(=O)₂-,



25 R¹⁸ es un enlace, ,  o -CH₂S(=O)₂NH-;

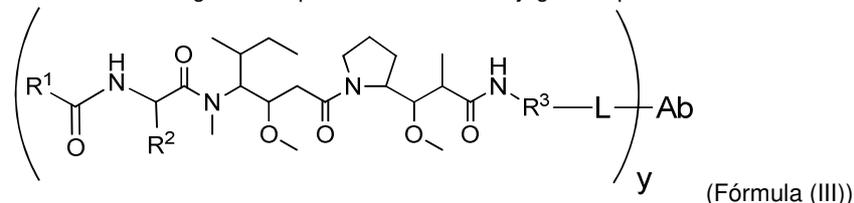
R¹⁹ es H o alquilo C₁-C₆;

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10,

y

cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

30 También se divulgan en la presente inmunoconjugados que tienen la estructura de Fórmula (III):



donde:

Ab representa un resto de unión a antígeno;

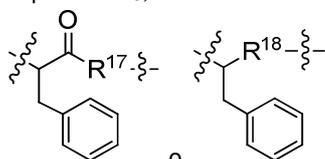
35 L se selecciona entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂-, -L₂L₁- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;

y es un número entero de 1 a 16;

R¹ es un heterocicloalquilo de 6 miembros que contiene 1-2 heteroátomos de N y un puente alquileo C₁-C₂, donde el heterocicloalquilo de 6 miembros está sin sustituir o sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;

o R¹ es un heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros que contiene 1-2 heteroátomos de N, donde el heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros está sin sustituir o sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;

R² es alquilo C₁-C₆;



5 R³ es ;

R⁵ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², o -((CH₂)_mO)_nR¹²;

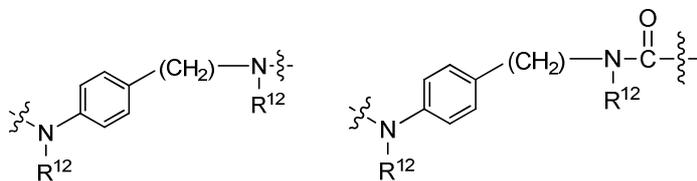
R⁶ es halo, oxo, OH, alquilo C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶ y -NR¹²C(=O)R¹¹;

R¹¹ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;

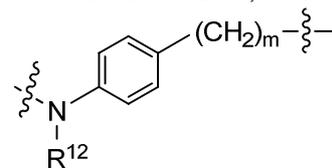
10 cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

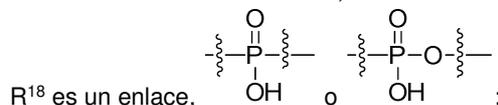
R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;



R¹⁷ es un enlace, -NH-, -NHS(=O)₂-,



15 ;



R¹⁸ es un enlace,

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

20 La invención proporciona métodos para preparar dichos ADC utilizando péptidos citotóxicos de Fórmula (I) como la carga (fármaco) a suministrar. En dichos péptidos citotóxicos, el extremo N o el extremo C del péptido citotóxico se ha modificado para que tenga un grupo funcional reactivo, y opcionalmente uno o más componentes conectores, para facilitar la conexión del péptido citotóxico ya sea directa o indirectamente al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, los aspectos descritos anteriormente de los péptidos citotóxicos de Fórmula (I). Además, la invención
25 proporciona métodos para utilizar estos ADC con el fin de tratar trastornos de proliferación celular.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inmunoconjugado de Fórmula (II) o subfórmula de esta, mezclado con al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente mezclado con dos o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, y métodos para
30 utilizar estas composiciones con el fin de tratar trastornos de proliferación celular.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar una afección caracterizada por una proliferación celular excesiva o indeseada, que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un inmunoconjugado de Fórmula (II). El sujeto para el tratamiento puede ser un mamífero y es preferentemente un ser humano. Las afecciones que se pueden tratar con los inmunoconjugados y métodos descritos en la presente incluyen varias formas de cáncer, tales como tumores gástricos, mieloides, de colon, nasofaríngeos, esofágicos y de próstata, glioma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena, leucemia linfocítica, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica aguda de linaje T o LLA-T, leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), tricoleucemia), linfoma (linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH)), mieloma múltiple, cáncer de vejiga, renal, gástrico (por ejemplo, tumores del estroma gastrointestinal (TEGI)), de hígado, melanoma y pancreático, y sarcoma. Otros trastornos de proliferación celular que se pueden tratar con estos métodos y composiciones incluyen retinopatía diabética, fibrosis hepática y pulmonar, síndrome de Sjogren y lupus eritematoso.
45

La invención incluye composiciones de las Fórmulas (I)-(II) y las subfórmulas de estas tal como se describen en la presente, y todos los estereoisómeros (incluidos diastereoisómeros y enantiómeros), tautómeros y versiones isotópicamente enriquecidas de estos (que incluyen sustituciones con deuterio), así como sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos. La presente invención también comprende polimorfos de Fórmula (I) (o subfórmulas de estos) y sales, particularmente sales farmacéuticamente aceptables, de estos.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1. Ensayos de proliferación celular *in vitro* de ADC anti-Her2 con mutación Cys (A) y etiqueta A1/ybbR (B) con el clon 40 de MDA-MB-231, ADC anti-Her2 con mutación Cys (C) y etiqueta A1/ybbR (D) con el clon 16 de MDA-MB-231, ADC anti-Her2 con mutación Cys (E) y etiqueta A1/ybbR (F) con HCC1954, y ADC anti-Her2 con mutación Cys (G) y etiqueta A1/ybbR (H) con células JimT-1.
- Figura 2. Ensayos de proliferación celular *in vitro* de ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 (A), anticuerpo 20507-HC-S375C-47 (B), anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 (C) y anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 (D).
- Figura 3. Estudios farmacocinéticos de anti-Her2-LC-S159C-10 (A), anti-Her2-LC-S159C-47 (B), anti-Her2-LC-S159C-77 (C), anti-Her2-LC-S159C-80 (D), anti-Her2-LC-S159C-79 (E), anti-Her2-LC-S159C-78 (F), anti-Her2-LC-S159C-14 (G), anti-Her2-HC-E152C-S375C-10 (H) y anti-Her2-10 (I) en ratones que no han recibido tratamiento.
- Figura 4. Estudios farmacocinéticos de ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 (A), anticuerpo 20507-LC-K107C-47 (B), anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 (C), anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 (D), anticuerpo 20507-10 (E), anti-Her2-HC-ins388-ybbR-20 (G), anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 (H), anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22 (I), y anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11)-75 (J) en ratones que no han recibido tratamiento con una dosis de 1 mg/kg. El estudio farmacocinético del anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 (F) se llevó a cabo en ratones que portaban tumores con una dosis de 10 mg/kg.
- Figura 5. Estudios de estabilidad *in vitro* de los ADC. Cronología de la retención de carga de anti-Her2-LC-S159C-10 incubado en tampones con diferente pH a 37 °C (A), Cronología de la hidrólisis del anillo de succinimida de anti-Her2-LC-S159C-10 incubado en tampones con diferente pH a 37 °C (B), Cronología de la retención de carga de anti-Her2-LC-S159C-47 incubada en tampones con diferente pH a 37 °C (C), Cronología de la hidrólisis del anillo de succinimida de anti-Her2-LC-S159C-47 incubado en tampones con diferente pH a 37 °C (D), tasa de retención de carga de anti-Her2-LC-S159C-10, anti-Her2-LC-S159C-77, anti-Her2-LC-S159C-80, anti-Her2-LC-S159C-79, anti-Her2-LC-S159C-78 y anti-Her2-LC-S159C-14 incubados en tampones a pH 8,5 a 37°C durante 24 horas (E), Extensión de la hidrólisis del anillo de succinimida de anti-Her2-LC-S159C-10, anti-Her2-LC-S159C-77, anti-Her2-LC-S159C-80, anti-Her2-LC-S159C-79, anti-Her2-LC-S159C-78 y anti-Her2-LC-S159C-14 incubados en tampones a pH 8,5 a 37 °C durante 24 horas (F).
- Figura 6. Estudio de eficacia *in vivo* de ADC de anticuerpo 20507 en el modelo tumoral H526. (A) ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 y anticuerpo 20507-HC-E152C-MMAF. (B) ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10, anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 y anticuerpo 20507-LC-S159C-MMAF. (C) Anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 y anticuerpo 20507-10. (D) ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10, anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 y anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22.

Descripción detallada

Las siguientes definiciones se aplican a menos que se proporcionen otras expresamente.

- El término «aminoácido» se refiere a aminoácidos canónicos, sintéticos y artificiales, así como también a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos canónicos. Los aminoácidos canónicos son aminoácidos proteinógenos codificados por el código genético e incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, así como selenocisteína, pirrolisina y pirrolina-carboxilisina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido canónico, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p. ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (p. ej., norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido canónico.

La expresión «resto de unión a antígeno», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un resto capaz de unirse específicamente a un antígeno, e incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

El término «anticuerpo», tal como se utiliza en la presente se refiere a un polipéptido de la familia de las inmunoglobulinas que es capaz de unirse a un antígeno correspondiente de forma no covalente, reversible y de manera específica. Por ejemplo, un anticuerpo IgG presente en la naturaleza es un tetrámero que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está constituida por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región

constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo aminico hasta el extremo carboxílico en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos hospedadores, que incluyen varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término «anticuerpo» incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de camélido, anticuerpos quiméricos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, de anticuerpos anti-Id a anticuerpos). Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo/clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos «constante» y «variable» se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de tanto las porciones de cadena ligera (V_L) como pesada (V_H) determinan el reconocimiento y la especificidad antigénicos. En cambio, los dominios constantes de la cadena ligera (C_L) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad a través de la placenta, unión a receptores de Fc y unión al complemento. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que pasan a ser más distales del sitio de unión a antígeno o extremo amino del anticuerpo. El extremo N es una región variable y en el extremo C hay una región constante; los dominios CH3 y C_L comprenden en realidad los dominios carboxi terminales de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

La expresión «fragmento de unión a antígeno», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una o más partes de un anticuerpo que retienen la capacidad para interactuar de forma específica con (por ejemplo, mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión incluyen Fv monocatenarios (scFv), Fv conectados mediante disulfuro (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, un fragmento monovalente constituido por los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd constituido por los dominios VH y CH1; un fragmento Fv constituido por los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989), que está constituido por un dominio VH; y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, u otros fragmentos de unión a epítipo de un anticuerpo.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH estén codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, a través de un conector sintético que permite que sean preparados como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario («scFv»); remítase, p. ej., a Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988; y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883, 1988). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén englobados en la expresión «fragmento de unión a antígeno». Estos fragmentos de unión a antígeno se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que para los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (remítase, por ejemplo, a Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Se pueden injertar fragmentos de unión a antígeno en matrices basados en polipéptidos tales como fibronectina tipo III (Fn3) (remítase a la Pat. de EE. UU. N.º 6 703 199, que describe monocuerpos de polipéptidos de fibronectina).

Se pueden incorporar fragmentos de unión a antígeno en moléculas monocatenarias que comprenden un par de segmentos Fv tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8:1057-1062, 1995; y la Pat. de EE. UU. N.º 5 641 870).

La expresión «anticuerpo monoclonal» o «composición de anticuerpos monoclonales», tal como se utiliza en la presente, se refiere a polipéptidos, que incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica o proceden de la misma fuente genética. Esta expresión también incluye preparados de moléculas de anticuerpo de composición monomolecular. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

La expresión «anticuerpo humano», tal como se utiliza en la presente, incluye anticuerpos con regiones variables en las que tanto las regiones de marco como las CDR proceden de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también procede de dichas secuencias humanas, p. ej.,

secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o un anticuerpo que contiene secuencias de marco consenso derivadas del análisis de secuencias de marco humanas, por ejemplo, tal como se describe en Knappik, *et al. J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000).

5 Los anticuerpos humanos incluyen residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o con especificidad por un sitio *in vitro*, o mediante mutación somática *in vivo*, o una sustitución para promover la estabilidad o la producción).

10 El término anticuerpo «humanizado», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano a la vez que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto se puede conseguir, por ejemplo, conservando las regiones CDR no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos. Remítase, p. ej., a Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994).

15 La expresión «se une específicamente» o «se une selectivamente», cuando se utiliza en el contexto de describir la interacción entre un antígeno (p. ej., una proteína o un glicano) y un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de unión derivado de anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia del antígeno en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos, p. ej., en una muestra biológica, p. ej., una muestra de sangre, suero, plasma o tejido. De este modo, en determinadas condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o agentes de unión con una especificidad de unión particular se unen a un antígeno particular en una cantidad que es al menos dos veces la de referencia y no se unen sustancialmente en ninguna cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. En una realización, en las condiciones de inmunoensayo designadas, el anticuerpo o agentes de unión con una especificidad de unión particular se unen a un antígeno particular en una cantidad que es al menos diez (10) veces la de referencia y no se unen sustancialmente en ninguna cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo o agente de unión en tales condiciones puede requerir que el anticuerpo o agente hayan sido seleccionados por su especificidad por una proteína particular. Según corresponda o se desee, esta selección se puede conseguir sustrayendo anticuerpos que reaccionen de forma cruzada con moléculas de otras especies (p. ej., de ratón o rata) u otros subtipos. Como alternativa, en algunas realizaciones, se seleccionan anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que reaccionan de forma cruzada con determinadas moléculas deseadas.

35 Se pueden utilizar varios formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se utilizan inmunoensayos ELISA en fase sólida de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (remítase, por ejemplo, a Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998), para consultar una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden utilizar para determinar una inmunoreactividad específica). Habitualmente, una reacción de unión específica o selectiva producirá una señal de al menos el doble por encima de la señal de referencia y, más habitualmente, al menos de 10 a 100 veces por encima de la referencia.

40 El término «afinidad», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del «brazo» del anticuerpo interacciona a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad.

45 La expresión «anticuerpo aislado» se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un antígeno puede, sin embargo, tener reactividad cruzada respecto a otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

50 Los términos «polipéptido» y «proteína» se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos canónicos, así como a polímeros de aminoácidos no canónicos. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también engloba de forma implícita variantes modificadas de esta.

55 El término «inmunoconjugado» o la expresión «conjugado de anticuerpo-fármaco», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la conexión de un resto de unión a antígeno tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este con un péptido citotóxico de Fórmula (I). La conexión puede ser enlaces covalentes, o interacciones no covalentes, y puede incluir quelación. Se pueden emplear varios conectores, conocidos en la técnica, para formar el inmunoconjugado.

60 El término «citotóxica» o «agente citotóxico», tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier agente que es perjudicial para el crecimiento y la proliferación de las células y puede actuar para reducir, inhibir o destruir una célula o neoplasia maligna.

65

La expresión «agente anticanceroso», tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier agente que se puede utilizar para tratar un trastorno proliferativo celular tal como el cáncer, que incluye agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, radioterapia y agentes radioterapéuticos, agentes anticancerosos dirigidos y agentes inmunoterapéuticos.

5 La expresión «resto farmacológico» o «carga», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un resto químico que se conjuga o se puede conjugar con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para formar un inmunoconjugado, y puede incluir cualquier resto que sea útil unir al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, «resto farmacológico» o «carga» incluye los péptidos citotóxicos descritos en la presente. Los inmunoconjugados de la
10 invención comprenden uno o más péptidos citotóxicos descritos en la presente como una carga, pero también pueden incluir una o más cargas diferentes. Otras cargas incluyen, por ejemplo, una carga o resto farmacológico puede ser un agente anticanceroso, un agente antiinflamatorio, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente antiparasitario, un agente antiviral o un agente anestésico. En determinadas realizaciones, se selecciona un resto farmacológico entre un inhibidor de Eg5, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un
15 estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, un maitansitoide, un MetAP (metionina-aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de cinesina, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalante de ADN, un agente de unión al surco menor del ADN y un inhibidor de DHFR. Los ejemplos adecuados incluyen calicheamicinas tales como gamma-calicheamicina; y maitansinoides tales como DM1, DM3 y DM4. Los métodos para unir cada uno de estos a un conector compatible con los anticuerpos y el método de la invención son conocidos en la técnica. Remítase, por ejemplo, a Singh *et al.*, (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457.

25 El término «tumor» se refiere a la proliferación y el crecimiento celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

30 La expresión «actividad antitumoral» se refiere a una reducción en la tasa de proliferación, viabilidad o actividad metastásica de células tumorales. Una posible vía para mostrar actividad antitumoral es mostrar una disminución en la velocidad de crecimiento de células anormales que surge durante la terapia o una estabilidad o reducción del tamaño tumoral. Dicha actividad se puede evaluar utilizando modelos tumorales *in vitro* o *in vivo* aceptados, que incluyen modelos de xenoinjerto, modelos de aloinjerto, modelos de MMTV y otros conocidos modelos conocidos en la técnica para investigar la actividad antitumoral.

35 La expresión «neoplasia maligna» se refiere a un tumor no benigno o un cáncer. Tal como se utiliza en la presente, el término «cáncer», incluye una neoplasia maligna caracterizada por un crecimiento celular desregulado o incontrolado. Los tipos de cáncer ilustrativos incluyen: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas.

40 El término «cáncer» incluye tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no hayan migrado a sitios en el cuerpo del sujeto aparte del sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (por ejemplo, aquellos que surgen de la metástasis, la migración de células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

45 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «portador farmacéuticamente aceptable» incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (p. ej., agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, estabilizantes farmacológicos, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes y combinaciones de estos, tal como serían conocidos para los expertos en la técnica (remítase, por ejemplo, a *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Salvo en lo que concierne a cualquier portador convencional que sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

55 La expresión «una cantidad terapéuticamente eficaz» de un compuesto de la presente invención se refiere a una cantidad del compuesto de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la reducción o inhibición de una enzima o una actividad proteica, o mejorará los síntomas, aliviará las afecciones, ralentizará o retrasará la progresión de la enfermedad, o prevendrá una enfermedad, etc. En una realización, la expresión «una cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es eficaz para, al menos en parte, aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar una afección o un trastorno o una enfermedad.

60 El término «sujeto», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un animal. Habitualmente el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a primates (p. ej., seres humanos, hombres o mujeres), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces y pájaros. En ciertas realizaciones, el sujeto es un primate. En realizaciones específicas, el sujeto es un ser humano.

65

Tal como se utiliza en la presente, el término «inhibir», «inhibición» o la expresión «que inhibe» se refiere a la reducción o supresión de una determinada afección, síntoma o trastorno, o enfermedad o una reducción significativa en la actividad basal de una actividad o proceso biológico.

5 Tal como se utiliza en la presente, el término «tratar», la expresión «que trata» o el término «tratamiento» de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de esta). En otra realización, «tratar», «que trata» o «tratamiento» se refiere a mitigar o mejorar al menos un parámetro físico que incluye los que pueden no ser perceptibles por el paciente. En otra realización más, «tratar», «que trata» o «tratamiento» se refiere a modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, (p. ej., estabilización de un síntoma perceptible), fisiológicamente, (p. ej., estabilización de un parámetro físico), o ambos. En otra realización más, «tratar», «que trata» o «tratamiento» se refiere a prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad o trastorno.

15 Tal como se utiliza en la presente, un sujeto «necesita» un tratamiento si dicho sujeto se beneficiaría biológicamente, médicamente, o en su calidad de vida, de dicho tratamiento.

20 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto.

25 En determinadas realizaciones, los inmunoconjugados modificados de la invención se describen según una proporción «péptido citotóxico respecto a anticuerpo» de, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8, o 12 o 16; esta proporción corresponde a "y" en la Fórmula (II) y la Fórmula (III). Aunque esta proporción tiene un valor entero para una molécula de conjugado específica, se sobreentiende que habitualmente se utiliza un valor promedio para describir una muestra que contiene muchas moléculas, debido a algún grado de inhomogeneidad dentro de una mezcla de un inmunoconjugado. A la carga promedio para una muestra de un inmunoconjugado se hace referencia en la presente como «proporción de fármaco respecto a anticuerpo» o DAR. En algunas realizaciones, la DAR se encuentra entre aproximadamente 1 y aproximadamente 16, y habitualmente es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8. En algunas realizaciones, al menos un 50% de una muestra en peso es un compuesto que tiene la DAR promedio más o menos 2, y preferentemente al menos un 50% de la muestra es un producto que contiene la DAR promedio más o menos 1.5. Las realizaciones preferidas incluyen inmunoconjugados en los que la DAR es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7 o aproximadamente 8. En estas realizaciones, una DAR de «aproximadamente q» significa que el valor medido para DAR se encuentra dentro de un $\pm 20\%$ de q, o preferentemente dentro de un $\pm 10\%$ de q.

40 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «un isómero óptico» o «un estereoisómero» se refiere a cualquiera de las diversas configuraciones estereoisoméricas que pueden existir para un compuesto determinado de la presente invención e incluye isómeros geométricos. Se sobreentiende que un sustituyente puede estar unido a un centro quiral de un átomo de carbono. El término «quiral» se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse a su imagen especular, mientras que el término «aquiral» se refiere a moléculas que se pueden superponer a su imagen especular. Por lo tanto, la invención incluye enantiómeros, diastereómeros o racematos del compuesto. Los «enantiómeros» son un par de estereoisómeros cuyas imágenes especulares no se pueden superponer entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla «racémica». El término se utiliza para designar una mezcla racémica cuando sea apropiado. Los «diastereoisómeros» son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes especulares entre sí. La estereoquímica absoluta se especifica de acuerdo con el sistema *R-S* de Cahn-Ingold-Prelog. Cuando un compuesto es un enantiómero puro, la estereoquímica en cada uno de los carbonos quirales se puede especificar ya sea como *R* o *S*. Los compuestos resueltos, cuya configuración absoluta es desconocida, se pueden designar (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextrógira o levógira) en la que desvían el plano de luz polarizada a la longitud de onda de la línea D del sodio. Ciertos compuestos descritos en la presente contienen uno o más centros o ejes asimétricos y, por tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de su estereoquímica absoluta, como (*R*) o (*S*).

55 Dependiendo de la elección de los materiales de partida y los procedimientos, los compuestos se pueden encontrar presentes en forma de uno de los posibles isómeros o como mezclas de estos, por ejemplo, como isómeros ópticos puros, o como mezclas de isómeros tales como mezclas de racematos y diastereómeros, dependiendo del número de átomos de carbono asimétricos. Se pretende que la presente invención incluya todos los isómeros posibles de este tipo, incluidas mezclas racémicas, mezclas diastereoméricas y formas ópticamente puras, a menos que se indique de otro modo, por ejemplo, cuando se identifica un isómero específico. Se pueden preparar isómeros (*R*) y (*S*) ópticamente activos utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver utilizando técnicas convencionales. Si el compuesto contiene un doble enlace, el sustituyente puede tener la configuración *E* o *Z*. Si el compuesto contiene un cicloalquilo disustituido, el sustituyente del cicloalquilo puede tener una configuración *cis* o *trans*. También se pretende que todas las formas tautoméricas estén incluidas.

65

Tal como se utilizan en la presente, los términos «sal» o «sales» se refieren a una sal de adición de ácido o base de un compuesto de la invención. El término «sales» incluye en particular «sales farmacéuticamente aceptables». La expresión «sales farmacéuticamente aceptables» se refiere a sales que conservan la efectividad biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención y que habitualmente no son indeseadas desde un punto de vista biológico o de otra forma. En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a estos.

Se pueden formar sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, p. ej., sales acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/hidrobromuro, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canfosulfonato, cloruro/hidrocloruro, cloroteofilonato, citrato, etandisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

Los ácidos inorgánicos a partir de los cuales pueden derivarse sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico.

Los ácidos orgánicos a partir de los cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico y ácido sulfosalicílico. Se pueden formar sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables con bases inorgánicas y orgánicas.

Las bases inorgánicas a partir de las cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, sales de amonio y metales de las columnas I a XII de la tabla periódica. En determinadas realizaciones, las sales se obtienen a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc y cobre; algunas sales particularmente adecuadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Las bases orgánicas a partir de las cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas. Ciertas aminas orgánicas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un resto básico o ácido, por métodos químicos convencionales. Generalmente, este tipo de sales se pueden preparar haciendo reaccionar formas ácidas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de Na, Ca, Mg o K), o haciendo reaccionar formas de bases libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Las reacciones de este tipo normalmente se llevan a cabo en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, cuando sea posible, es deseable el uso de medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Se pueden encontrar listas de sales adecuadas adicionales, p. ej., en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20.^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

También se pretende que cualquier fórmula proporcionada en la presente represente formas no marcadas, así como formas marcadas isotópicamente de los compuestos. Los compuestos marcados isotópicamente tienen estructuras representadas por las fórmulas dadas en la presente, salvo por que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico seleccionado. Algunos ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I respectivamente. La invención incluye diversos compuestos marcados isotópicamente tal como se definen en la presente, por ejemplo, aquellos en los que están presentes isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , o aquellos en los que están presentes isótopos no radiactivos tales como ^2H y ^{13}C . Los compuestos marcados isotópicamente de este tipo son útiles en estudios metabólicos (con ^{14}C), estudios de reacción cinéticos (con, por ejemplo, ^2H o ^3H), técnicas de detección o formación de imágenes, tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), incluidos los ensayos de distribución tisular de sustratos o fármacos, o en el tratamiento radiactivo de pacientes. En particular, un ^{18}F o compuesto marcado puede ser particularmente deseable para estudios de PET o SPECT. Generalmente se pueden preparar compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos en los Ejemplos y Preparaciones adjuntos utilizando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado previamente.

Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, ^2H o D), puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas como resultado de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducida o una mejora en el índice terapéutico. La concentración de un isótopo más pesado de este tipo, específicamente deuterio, se puede definir con el factor de enriquecimiento isotópico. El término «factor de enriquecimiento isotópico», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la relación entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo específico. Si un sustituyente en un compuesto de esta invención se denomina deuterio, dicho compuesto tendrá un factor de enriquecimiento isotópico para cada átomo de deuterio designado de al menos 3500 (52,5% de incorporación de deuterio en cada átomo de deuterio designado), al menos 4000 (60% de incorporación de deuterio), al menos 4500 (67,5% de incorporación de deuterio), al menos 5000 (75% de incorporación de deuterio), al menos 5500 (82,5% de incorporación de deuterio), al menos 6000 (90% de incorporación de deuterio), al menos 6333,3 (95% de incorporación de deuterio), al menos 6466,7 (97% de incorporación de deuterio), al menos 6600 (99% de incorporación de deuterio) o al menos 6633,3 (99,5% de incorporación de deuterio).

Algunos solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquellos en los que el disolvente de cristalización puede estar sustituido con isótopos, p. ej., D_2O , d^6 -acetona, d^6 -DMSO, así como solvatos con disolventes no enriquecidos.

Algunos compuestos de la invención, es decir, los compuestos de fórmula (I) que contienen grupos capaces de actuar como dadores y/o aceptores de enlaces de hidrógeno pueden ser capaces de formar cocristales con formadores de cocristales adecuados. Estos cocristales se pueden preparar a partir de compuestos de fórmula (I) mediante procedimientos de formación de cocristales conocidos. Tales procedimientos incluyen moler, calentar, cosublimar, cofundir o poner en contacto en disolución los compuestos de fórmula (I) con el formador de cocristales en condiciones de cristalización y aislar los cocristales formados de este modo. Los formadores de cocristales adecuados incluyen los descritos en el documento WO 2004/078163. Por lo tanto, la invención proporciona, además, cocristales que comprenden un compuesto de fórmula (I).

Cualquier átomo asimétrico (p. ej., carbono) del compuesto o compuestos de la presente invención puede estar presente en forma racémica o enriquecida enantioméricamente, por ejemplo, la configuración (R)-, (S)- o (R,S). En determinadas realizaciones, cada átomo asimétrico tiene al menos un 50% de exceso enantiomérico, al menos un 60% de exceso enantiomérico, al menos un 70% de exceso enantiomérico, al menos un 80% de exceso enantiomérico, al menos un 90% de exceso enantiomérico, al menos un 95% de exceso enantiomérico o al menos un 99% de exceso enantiomérico de la configuración (R)- o (S)-, es decir, para compuestos ópticamente activos, a menudo se prefiere utilizar un enantiómero hasta la exclusión sustancial del otro enantiómero. Los sustituyentes en átomos con dobles enlaces insaturados pueden estar presentes, si es posible, en forma *cis* (Z) o *trans* (E).

Por consiguiente, tal como se utiliza en la presente, un compuesto de la presente invención puede estar en forma de uno de los posibles isómeros, rotámeros, atropisómeros, tautómeros o mezclas de estos, por ejemplo, como isómeros geométricos (*cis* o *trans*), diastereómeros, isómeros ópticos (enantiómeros), racematos o mezclas de estos sustancialmente puros. La expresión «sustancialmente puro» o «sustancialmente exento de otros isómeros», tal como se utiliza en la presente, se refiere a que el producto contiene menos de un 5%, y preferentemente menos de un 2% de otros isómeros en relación con la cantidad del isómero preferido, en peso.

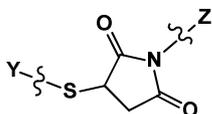
Cualesquiera mezclas resultantes de isómeros se pueden separar, basándose en las diferencias fisicoquímicas de los constituyentes, en los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos u ópticos puros o sustancialmente puros, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada.

Cualesquiera racematos resultantes de productos finales o intermedios se pueden resolver en los enantiómeros ópticos mediante métodos conocidos, p. ej., mediante la separación de las sales diastereoméricas de estos, obtenidas con una base o ácido ópticamente activo, y la liberación del compuesto ácido o básico ópticamente activo. En particular, se puede emplear de este modo un resto básico para resolver los compuestos de la presente invención en sus enantiómeros ópticos, por ejemplo, mediante la cristalización fraccionada de una sal formada con un ácido ópticamente activo, por ejemplo, ácido tartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido diacetiltartárico, ácido di-O,*O'*-*p*-toluoltartárico, ácido mandélico, ácido málico o ácido canfor-10-sulfónico. Los productos racémicos también se pueden resolver por cromatografía quiral, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un adsorbente quiral.

Además, los compuestos de la presente invención, incluidas sus sales, también se pueden obtener en forma de sus hidratos o incluir otros disolventes utilizados para su cristalización. Los compuestos de la presente invención pueden formar solvatos de forma inherente o intencional con disolventes farmacéuticamente aceptables (que incluyen agua); por lo tanto, se pretende que la invención englobe tanto formas solvatadas como no solvatadas. El término «solvato» se refiere a un complejo molecular de un compuesto de la presente invención (incluidas las sales farmacéuticamente aceptables de este) con una o más moléculas de disolvente. Dichas moléculas de disolvente son aquellas utilizadas comúnmente en la técnica farmacéutica, de las que se tiene constancia que son inocuas para el receptor, p. ej., agua y etanol. El término «hidrato» se refiere al complejo donde la molécula de disolvente es agua.

Los compuestos de Fórmula (I) de la presente invención, incluidas sales, hidratos y solvatos de estos, pueden formar polimorfos de forma inherente o intencional.

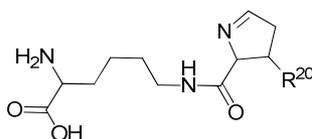
5 El término «tiol-maleimida», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un grupo formado mediante la reacción de un tiol con maleimida, que tiene esta fórmula general



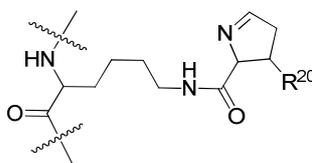
, donde Y y Z son grupos que se han de conectar a través de la conexión tiol-maleimida y pueden comprender componentes de conectores, anticuerpos o cargas.

10 El término «escindible», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un conector o componente de conector que conecta dos restos mediante conexiones covalentes, pero que se descompone para cortar la conexión covalente entre los restos en condiciones fisiológicamente relevantes, habitualmente un conector escindible se corta *in vivo* más rápidamente en un ambiente intracelular que cuando se encuentra fuera de una célula, lo que provoca que la liberación de la carga tenga lugar preferentemente dentro de una célula diana. La escisión puede ser enzimática o no enzimática, pero generalmente libera una carga de un anticuerpo sin degradar el anticuerpo. La escisión puede dejar alguna parte de un conector o componente de un conector unida a la carga, o puede liberar la carga sin ninguna parte o componente residual del conector.

15 El término «Pcl», tal como se utiliza en la presente, se refiere a pirrolinocarboxilisina, por ejemplo,



, donde R²⁰ es H, que tiene la siguiente fórmula cuando se incorpora en un péptido:



20 El compuesto correspondiente, donde R²⁰ es metilo es pirrolisina.

25 La expresión «no escindible», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un conector o componente de un conector que no es especialmente susceptible de descomposición en condiciones fisiológicas, por ejemplo, es al menos tan estable como el anticuerpo o la parte de fragmento de unión a antígeno del inmunocombinado. Dichos conectores a menudo se denominan «estables», lo que significa que son suficientemente resistentes a la degradación para mantener la carga conectada al resto de unión a antígeno Ab hasta que el Ab mismo se degrade al menos parcialmente, es decir, la degradación del Ab precede a la escisión del conector *in vivo*. La degradación de la porción de anticuerpo de un ADC que tiene un conector estable o no escindible pueden dejar algo o todo el conector, y uno o más grupos aminoácidos de un anticuerpo, unidos al resto de fármaco o carga que se suministra *in vivo*.

35 Los términos «alquilo C₁-C₃», «alquilo C₂-C₃», «alquilo C₁-C₄», «alquilo C₁-C₅», «alquilo C₁-C₆» y «alquilo C₂-C₆», tal como se utilizan en la presente, se refieren a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada totalmente saturado que contiene 1-3 átomos de carbono, 2-3 átomos de carbono, 1-4 átomos de carbono, 1-5 átomos de carbono, 1-6 átomos de carbono o 2-6 átomos de carbono, respectivamente. Algunos ejemplos de grupos «alquilo C₁-C₃» incluyen metilo, etilo, *n*-propilo e isopropilo. Algunos ejemplos de grupos «alquilo C₂-C₃» incluyen etilo, *n*-propilo e isopropilo. Algunos ejemplos de grupos «alquilo C₁-C₄» incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *tert*-butilo. Algunos ejemplos de grupos «alquilo C₁-C₅» incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo e isopentilo. Algunos ejemplos de grupos «alquilo C₁-C₆» incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo y hexilo. Algunos ejemplos de grupos «alquilo C₂-C₆» incluyen etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo y hexilo.

45 Tal como se utiliza en la presente, el término «alquilenos» se refiere a un grupo alquilo divalente que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, y dos valencias abiertas para unirse a otros rasgos. A menos que se indique lo contrario, alquilenos se refiere a restos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, de 1 a 6 átomos de carbono o de 1 a 4 átomos de carbono. Algunos ejemplos representativos de alquilenos incluyen metileno, etileno, *n*-propileno, isopropileno, *n*-butileno, *sec*-

butileno, isobutileno, *tert*-butileno, *n*-pentileno, isopentileno, neopentileno, *n*-hexileno, 3-metilhexileno, 2,2-dimetilpentileno, 2,3-dimetilpentileno, *n*-heptileno, *n*-octileno, *n*-nonileno y *n*-decileno.

Los términos «alcoxi C₁-C₃», «alcoxi C₂-C₃», «alcoxi C₁-C₄», «alcoxi C₁-C₅», «alcoxi C₁-C₆» y «alcoxi C₂-C₆», tal como se utilizan en la presente, se refieren a los grupos -O-alquilo C₁-C₃, -O-alquilo C₂-C₃, -O-alquilo C₁-C₄, -O-alquilo C₁-C₅, -O-alquilo C₁-C₆ y -O-alquilo C₂-C₆ respectivamente, donde los grupos «alquilo C₁-C₃», «alquilo C₂-C₃», «alquilo C₁-C₄», «alquilo C₁-C₅», «alquilo C₁-C₆» y «alquilo C₂-C₆» son como se definen en la presente. Los ejemplos de grupos «alcoxi C₁-C₃» incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi e isopropoxi. Los ejemplos de grupos «alcoxi C₂-C₃» incluyen etoxi, *n*-propoxi e isopropoxi. Los ejemplos de grupos «alcoxi C₁-C₄» incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi y *tert*-butoxi. Los ejemplos de grupos «alcoxi C₁-C₅» incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *tert*-butoxi, *n*-pentiloxi e isopentiloxi. Los ejemplos de grupos «alcoxi C₁-C₆» incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *tert*-butoxi, *n*-pentiloxi, isopentiloxi y hexiloxi. Los ejemplos de grupos «alcoxi C₂-C₆» incluyen etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *tert*-butoxi, *n*-pentiloxi, isopentiloxi y hexiloxi.

Tal como se utiliza en la presente, el término «halógeno» (o halo) se refiere a flúor, bromo, cloro o yodo, en particular, flúor o cloro. Los grupos y restos sustituidos con halógeno tales como alquilo sustituido con halógeno (haloalquilo) pueden estar mono-, poli- o perhalogenados.

Tal como se utiliza en la presente, el término «heteroátomos» se refiere a átomos de nitrógeno (N), oxígeno (O) o azufre (S), en particular nitrógeno u oxígeno, a menos que se indique lo contrario.

La expresión «heterocicloalquilo de 4-8 miembros», tal como se utiliza en la presente se refiere a una estructura anular hidrocarbonada monocíclica de 4-8 miembros saturada, donde de uno a dos de los carbonos anulares de la estructura anular hidrocarbonada se reemplazan por de uno a dos grupos NR, donde R es hidrógeno, un enlace, un grupo R⁵ tal como se define en la presente o un grupo R⁷ tal como se define en la presente. Los ejemplos de grupos heterocicloalquílicos de 4-8 miembros, tal como se utilizan en la presente, incluyen azetadinilo, azetadin-1-ilo, azetadin-2-ilo, azetadin-3-ilo, pirrolidinilo, pirrolidin-1-ilo, pirrolidin-2-ilo, pirrolidin-3-ilo, pirrolidin-4-ilo, pirrolidin-5-ilo, piperidinilo, piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, piperidin-3-ilo, piperidin-4-ilo, piperidin-5-ilo, piperidin-6-ilo, piperazinilo, piperazin-1-ilo, piperazin-2-ilo, piperazin-3-ilo, piperazin-4-ilo, piperazin-5-ilo, piperazin-6-ilo, azepanilo, azepan-1-ilo, azepan-2-ilo, azepan-3-ilo, azepan-4-ilo, azepan-5-ilo, azepan-6-ilo y azepan-7-ilo.

La expresión «heterocicloalquilo de 6 miembros», tal como se utiliza en la presente se refiere a una estructura anular hidrocarbonada monocíclica de 6 miembros saturada, donde de uno a dos de los carbonos anulares de la estructura anular hidrocarbonada se reemplazan por de uno a dos grupos NR, donde R es hidrógeno, un enlace, un grupo R⁵ tal como se define en la presente o un grupo R⁷ tal como se define en la presente. Los ejemplos de grupos heterocicloalquílicos de 6 miembros, tal como se utilizan en la presente, incluyen piperidinilo, piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, piperidin-3-ilo, piperidin-4-ilo, piperidin-5-ilo, piperidin-6-ilo, piperazinilo, piperazin-1-ilo, piperazin-2-ilo, piperazin-3-ilo, piperazin-4-ilo, piperazin-5-ilo y piperazin-6-ilo.

La expresión «heterocicloalquilo de 5-8 miembros», tal como se utiliza en la presente se refiere a una estructura anular hidrocarbonada bicíclica fusionada de 5-8 miembros saturada, donde de uno a dos de los carbonos anulares de la estructura anular hidrocarbonada se reemplazan por de uno a dos grupos NR, R es hidrógeno, un enlace, un grupo R⁵ tal como se define en la presente o un grupo R⁷ tal como se define en la presente. Los ejemplos de grupos heterocicloalquílicos bicíclicos fusionados de 5-8 miembros, tal como se utilizan en la presente, incluyen 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo y 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo.

La convención de nomenclatura de inmunoconjugados utilizada en la presente es el Número de compuesto-anticuerpo, donde Número de compuesto se refiere al compuesto de Fórmula (I) utilizado para la conjugación al anticuerpo particular.

Conectores

Los péptidos citotóxicos proporcionados en la presente para su uso como cargas de ADC se pueden unir a un conector, L, o directamente a un resto de unión a antígeno. Los conectores adecuados para su uso en dichos ADC son muy conocidos en la técnica, y se pueden utilizar en los conjugados de la invención. El conector, L, se puede unir al resto de unión a antígeno en cualquier posición disponible adecuada en el resto de unión a antígeno: habitualmente, L se une a un átomo de nitrógeno de amino disponible (es decir, una amina primaria o secundaria, en lugar de una amida) o un átomo de oxígeno hidroxílico, o a un sulfhidrilo disponible tal como en una cisteína. La unión del conector, L, a los péptidos citotóxicos proporcionados en la presente puede ser en el extremo N del péptido citotóxico o en el extremo C del péptido citotóxico. Se conoce una amplia variedad de conectores para su uso en ADC (remítase, por ejemplo, a Lash, *Antibody-Drug Conjugates: the Next Generation of Moving Parts*, Start-Up, Dic. 2011, 1-6), y se pueden utilizar en conjugados dentro del alcance de la invención.

El conector, L, en la Fórmula (I), Fórmula (II) y Fórmula (III) es un resto conector que comprende uno o más componentes de conector L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, L₆, etc. En determinadas realizaciones, un componente de conector puede

representar un enlace que conecta los grupos que lo flanquean. En determinadas realizaciones, L es $^*L_1L_2L_3L_4L_5L_6^-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico. En determinadas realizaciones, un componente de conector puede representar un enlace que conecta los grupos que lo flanquean. En determinadas realizaciones, L es $^*L_1L_2L_3L_4L_5^-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico. En determinadas realizaciones, un componente de conector puede representar un enlace que conecta los grupos que lo flanquean. En determinadas realizaciones, L es $^-L_1L_2L_3L_4^-$, donde el * denota el sitio de unión al citotóxico. En determinadas realizaciones, un componente de conector puede representar un enlace que conecta los grupos que lo flanquean. En determinadas realizaciones, L es $^-L_1L_2L_3^-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico. En una realización preferida, L es $^-L_1L_2^-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico. En una realización determinada, L es $^-L_1^-$. Algunos conectores y componentes de conector preferidos se representan en la presente.

El conector, L, en la Fórmula (I), Fórmula (II) y Fórmula (III) puede ser divalente, lo que significa que se puede utilizar para conectar solamente una carga por conector a un resto de unión a antígeno, o puede ser trivalente y es capaz de conectar dos cargas por conector a un resto de unión a antígeno o puede ser polivalente. Se pueden utilizar conectores trivalentes, tetravalentes y polivalentes para aumentar la carga de una carga (fármaco) en un resto de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo), con lo cual aumenta la proporción de fármaco respecto a anticuerpo (DAR) sin necesidad de sitios adicionales en el anticuerpo para unir múltiples conectores. Algunos ejemplos de dichos conectores proporcionados en *Bioconjugate Chem.*, 1999 Marzo-Abril;10(2):279-88; US6638499; *Clin Cancer Res* Octubre 15, 2004 10; 7063; y el documento WO2012/113847A1.

Un conector, L, para su uso en los compuestos de Fórmula (I) y los inmunoconjugados de Fórmula (II) y Fórmula (III) puede ser escindible o no escindible. Los conectores escindibles tales como aquellos que contienen una hidrazona, un disulfuro, el dipéptido Val-Cit, y los que contienen un resto p-aminobenciloxycarbonilo escindible con glucuronidasa, son muy conocidos en la técnica, y se pueden utilizar. Remítase, por ejemplo, a Ducry, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, vol. 21, 5-13 (2010). Para los inmunoconjugados de que comprenden un conector escindible, el conector es sustancialmente estable *in vivo* hasta que el inmunoconjugado se une o entra a la célula, momento en el cual las enzimas intracelulares o las condiciones químicas intracelulares (pH, capacidad de reducción) escinden el conector para liberar el péptido citotóxico.

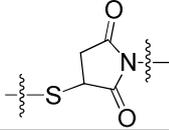
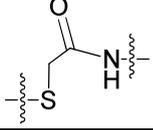
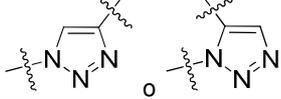
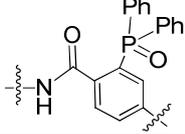
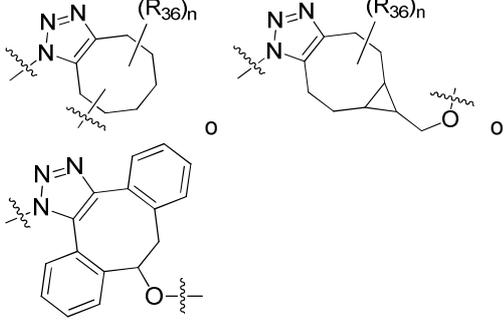
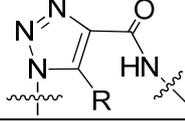
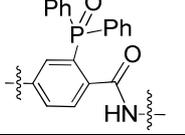
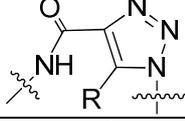
Como alternativa, se pueden utilizar conectores no escindibles en los compuestos de Fórmula (I) y los inmunoconjugados de Fórmula (II) y Fórmula (III). Los conectores no escindibles carecen de componentes estructurales diseñados para degradarse en las células, y por tanto, sus estructuras pueden variar de forma sustancial. Remítase, por ejemplo, a Ducry, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, vol. 21, 5-13 (2010). Se cree que estos inmunoconjugados entran en una célula diana y experimentan degradación proteolítica del anticuerpo en lugar de descomposición del conector, por lo que al menos una parte del conector, o todo, e incluso algo del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede permanecer unido a la carga.

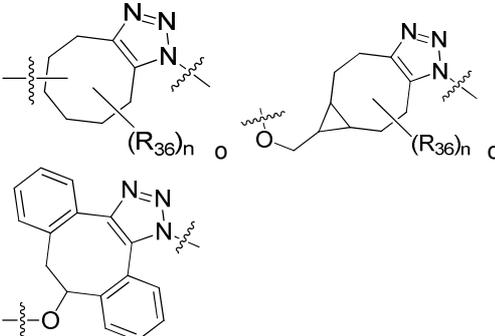
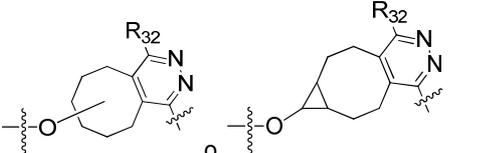
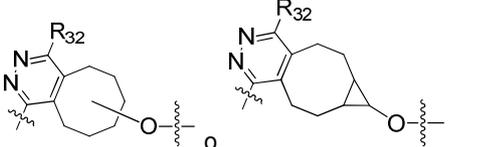
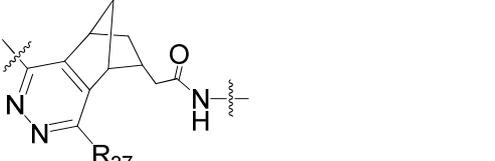
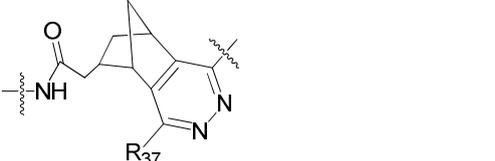
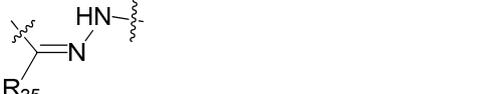
El conector, L, en los compuestos de Fórmula (I) y los inmunoconjugados de Fórmula (II) y Fórmula (III) contiene normalmente habitualmente dos o más componentes de conector, que se pueden seleccionar por conveniencia en ensamblaje del conjugado, o se pueden seleccionar de modo que influyan en las propiedades del conjugado. Los componentes de conector adecuados para formar un conector, L, son conocidos en la técnica, al igual que los métodos para construir el conector L. Los componentes de conector pueden incluir los grupos utilizados normalmente para unir un grupo a un aminoácido, espaciadores tales como grupos alquileo y oligómeros de óxido de etileno, aminoácidos y péptidos cortos hasta aproximadamente 4 aminoácidos en longitud; un enlace; y conexiones de carbonilo, carbamato, carbonato, urea, éster y amida. Los componentes de conector pueden comprender grupos tiol-maleimida, tioéteres, amidas y ésteres; grupos que se escinden fácilmente *in vivo* en condiciones que se encuentran en las células diana o alrededor de ellas, tales como disulfuros, hidrazonas, dipéptidos como Val-Cit y grupos benciloxycarbonilo sustituidos; espaciadores para orientar la carga en una posición adecuada respecto al resto de unión a antígeno tal como anillos fenilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclilo, y cadenas alquilénicas; y/o grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, tales como alquileo sustituido con uno o más grupos polares (carboxi, sulfonato, hidroxilo, amina, aminoácido, sacárido), y cadenas alquilénicas que contienen uno o más $-NH-$ u $-O-$ en lugar de uno o varios grupos metileno tales como éteres glicólicos $(-CH_2CH_2O-)_p$ donde p es 1-10, que puede potenciar la solubilidad o reducir la agregación intermolecular, por ejemplo.

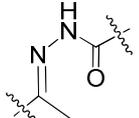
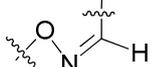
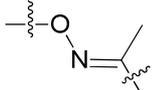
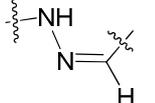
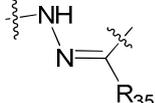
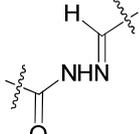
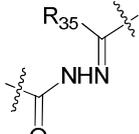
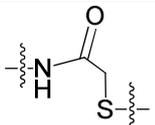
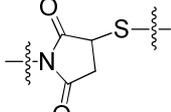
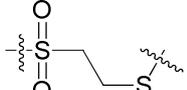
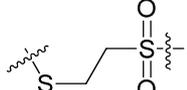
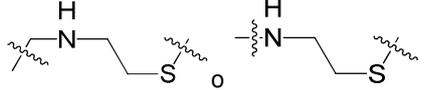
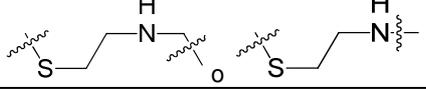
Además, los componentes de conector pueden comprender restos químicos que se forman fácilmente mediante reacción entre dos grupos reactivos. Algunos ejemplos de dichos restos químicos se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1

| Grupo reactivo 1 | Grupo reactivo 2 | Resto químico |
|------------------|------------------|---------------|
| un tiol | un tiol | -S-S- |

| Grupo reactivo 1 | Grupo reactivo 2 | Resto químico |
|--------------------|--------------------|--|
| un tiol | una maleimida |  |
| un tiol | una haloacetamida |  |
| una azida | un alquino |  |
| una azida | una triarilfosfina |  |
| una azida | un cicloocteno |  |
| una azida | un oxanobornadieno |  |
| una triarilfosfina | una azida |  |
| un oxanobornadieno | una azida |  |
| un alquino | una azida |  |

| Grupo reactivo 1 | Grupo reactivo 2 | Resto químico |
|-----------------------|----------------------------|--|
| un cicloocteno | azida |  |
| un cicloocteno | una diariltetrazina |  |
| una diariltetrazina | un cicloocteno |  |
| una monoariltetrazina | un norborneno |  |
| un norborneno | una monoariltetrazina |  |
| un aldehído | una hidroxilamina |  |
| un aldehído | una hidrazina |  |
| un aldehído | NH ₂ -NH-C(=O)- |  |
| una cetona | una hidroxilamina |  |
| una cetona | una hidrazina |  |

| Grupo reactivo 1 | Grupo reactivo 2 | Resto químico |
|----------------------------|----------------------------|--|
| una cetona | NH ₂ -NH-C(=O)- |  |
| una hidroxilamina | un aldehído |  |
| una hidroxilamina | una cetona |  |
| una hidrazina | un aldehído |  |
| una hidrazina | una cetona |  |
| NH ₂ -NH-C(=O)- | un aldehído |  |
| NH ₂ -NH-C(=O)- | una cetona |  |
| una haloacetamida | un tiol |  |
| una maleimida | un tiol |  |
| una vinilsulfona | un tiol |  |
| un tiol | una vinilsulfona |  |
| una aziridina | un tiol |  |
| un tiol | una aziridina |  |

| Grupo reactivo 1 | Grupo reactivo 2 | Resto químico |
|------------------|------------------|---------------|
| | hidroxilamina | |
| | hidroxilamina | |
| | | |
| | | |

donde: R³² en la Tabla 1 es H, alquilo C₁₋₄, fenilo, pirimidina o piridina; R³⁵ en la Tabla 1 es H, alquilo C₁₋₆, fenilo o alquilo C₁₋₄ sustituido con de 1 a 3 grupos -OH; cada R³⁶ en la Tabla 1 se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH; R³⁷ en la Tabla 1 se selecciona independientemente entre H, fenilo y piridina, cada R⁵ en la Tabla 1 se selecciona independientemente entre H o alquilo C₁₋₆; R¹² en la Tabla 1 es H, -CH₃ o fenilo; R⁵⁰ en la Tabla 1 es H o nitro.

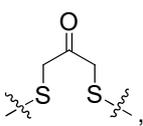
5 En algunas realizaciones, un componente de conector de un conector, L, de los inmunoconjugados de Fórmula (II) es un grupo formado tras la reacción de un grupo funcional reactivo con una de las cadenas laterales de aminoácidos utilizadas normalmente para la conjugación, por ejemplo, el tiol de la cisteína, o el -NH₂ libre de lisina, o un grupo Pcl o Pyl introducido mediante modificación en un anticuerpo. Remítase, por ejemplo, a Ou, *et al.*, *PNAS* 108(26), 10437-42 (2011). Los componentes de conector formados mediante reacción con un residuo de cisteína del resto de unión a

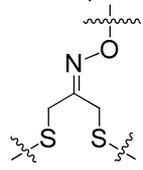
10
15 antigénico incluyen Los componentes de conector formados mediante reacción con el -NH₂ de un residuo de lisina del resto de unión a antigénico, donde cada p es 1-10 y cada R es independientemente H o alquilo C₁₋₄ (preferentemente metilo) incluyen

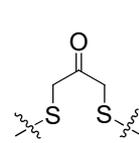
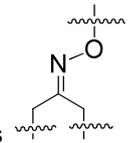
Los componentes de conector formados

mediante reacción con un grupo Pcl o Pyl incluyen 0

20 , donde R²⁰ es H o Me, y R³⁰ es H, Me o Fenilo, para la conexión, donde el grupo acilo mostrado se une a la parte de lisina de un Pcl o Pyl en un anticuerpo modificado. Un componente de conector formado

tras la reacción de un puente disulfuro de Ab, , y un compuesto de Fórmula (I) que contiene una

hidroxilamina es . Un componente de conector formado tras la reacción de un puente disulfuro de Ab,

, y un compuesto de Fórmula (I) que contiene una hidroxilamina es .

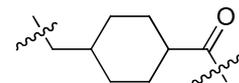
5 En algunas realizaciones, un componente de conector de un conector, L, de los inmunoconjugados de Fórmula (II) y Fórmula (III) incluyen, por ejemplo, grupos alquileo $-(CH_2)_n-$ (donde n es habitualmente 1-10 o 1-6), unidades de etilenglicol $-(CH_2CH_2O)_n$ (donde n es 1-20, habitualmente 1-10 o 1-6), -O-, -S-, carbonilo $-C(=O)-$, amidas $-C(=O)-NH-$ o $-NH-C(=O)-$, ésteres $-C(=O)-O-$ o $-O-C(=O)-$, sistemas anulares que tienen dos puntos disponibles de unión tales como un anillo divalente seleccionado entre fenilo (incluidos fenilos 1,2- 1,3- y 1,4- disustituidos), heteroarilo C₅₋₆, cicloalquilo C₃₋₈ que incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo 1,1-disustituido, y ciclohexilo 1,4-disustituido y anillos heterocíclicos C₄₋₈, y ejemplos específicos representados a continuación; aminoácidos $-NH-CHR^*-C(=O)-$ o $-C(=O)-CHR^*-NH-$, o grupos derivados de aminoácidos que se unen a N de una estructura adyacente (por ejemplo, a un nitrógeno de maleimida) que tiene la fórmula $[N]-CHR^*-C(=O)-$ donde R* es la cadena lateral de un aminoácido conocido (frecuentemente uno de los aminoácidos canónicos, por ejemplo, trp, ala, asp, lys y gly, pero que incluyen también, por ejemplo, norvalina, norleucina, homoserina, homocisteína, fenilglicina, citrulina y otros denominados normalmente alfa-aminoácidos), polipéptidos de aminoácidos conocidos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, etc.), uniones tiol-maleimida (a partir de la adición de $-SH$ a maleimida), $-S-CR_2-$ y otros éteres de tiol tales como $-S-CR_2-C(=O)-$ o $-C(=O)-CR_2-S-$ donde R es independientemente en cada caso H o alquilo C₁₋₄, $-CH_2-C(=O)-$, y disulfuros $(-S-S-)$, así como combinaciones de cualquiera de estos con otros componentes de conector descritos a continuación, por ejemplo, un enlace, un conector no escindible enzimáticamente, un conector no escindible, un conector escindible enzimáticamente, un conector fotoestable, un conector fotoescindible o un conector que comprende un espaciador autodestructivo.

25 En determinadas realizaciones, el conector, L, de los inmunoconjugados de Fórmula (II) es $-*L_1L_2L_3L_4L_5L_6-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico. En determinadas realizaciones, el conector, L, de los inmunoconjugados de Fórmula (II) es $-*L_1L_2L_3L_4L_5-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico. En determinadas realizaciones, el conector, L, de los compuestos de los inmunoconjugados de Fórmula (II) es $-*L_1L_2L_3L_4-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico. En determinadas realizaciones, el conector, L, de los inmunoconjugados de Fórmula (II) es $-*L_1L_2L_3-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico. En una realización preferida, el conector, L, de los inmunoconjugados de Fórmula (II) es $-*L_1L_2-$, donde el * denota el sitio de unión al péptido citotóxico.

30 El componente de conector L₁ de los inmunoconjugados de Fórmula (II) se selecciona entre $-(CH_2)_m-$, $-C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mNR^{12}C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mNR^{12}C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mNR^{12}C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mS(=O)_2((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-C(=O)(CH_2)_mNR^{12}(CH_2)_m-$, $-C(=O)NR^{12}(CH_2)_m-$, $-C(=O)NR^{12}(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)NH(CH_2)_mNR^{12}C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)(CH_2)_mX_3((CH_2)_mO)_n-$, $-C(=O)X_1C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1C(=O)NR^{12}(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$,

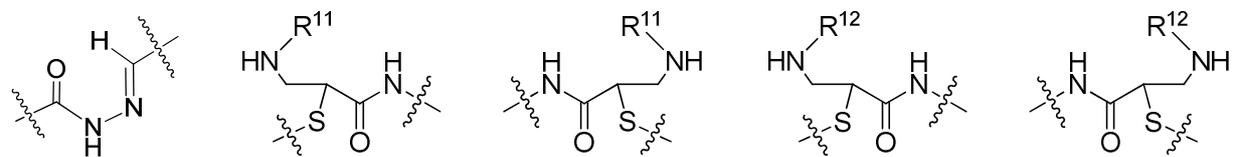
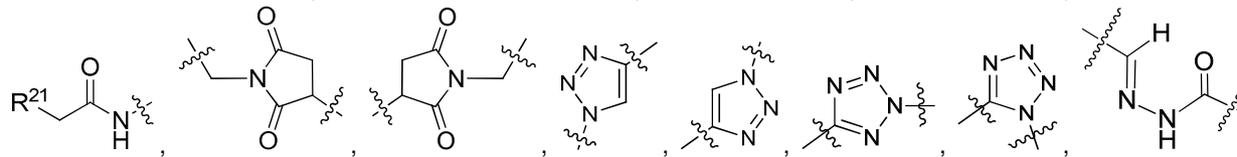
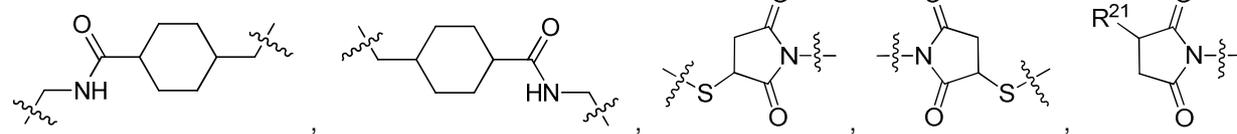
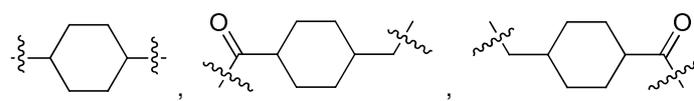
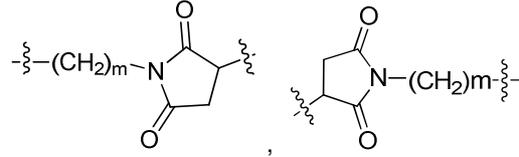
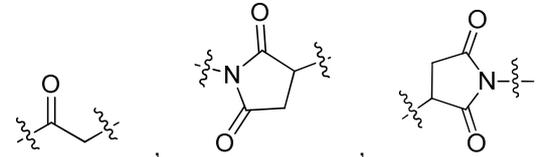
35 $-C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mC(=O)-$, $-(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mO(CH_2)_mN(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mO(CH_2)_mS(=O)_2(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mNR^{12}(CH_2)_mC(=O)-$, $-(CH_2)_mNR^{12}C(=O)-$, $-(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNHC(=O)-$,

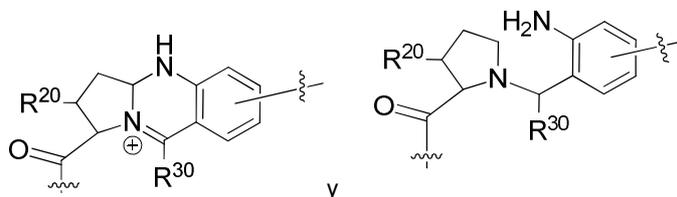
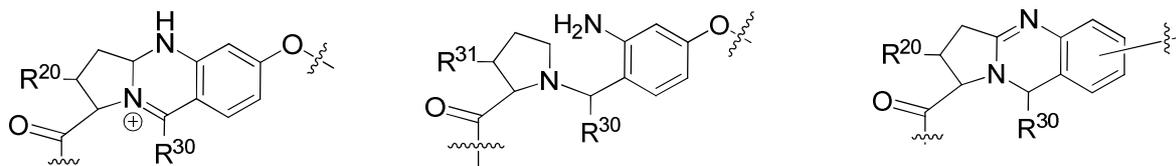




- (CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mNR¹²C(=O)X₁⁻, -(CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mNR¹²C(=O)-, -
- ((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿ⁻, -(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)-, -C(=O)(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿC(=O)-, -
- C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mC(=O)-, -C(=O)(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m⁻, -
- 5 (CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿC(=O)-, -C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m⁻, -
- C(=O)NR¹²(CH₂)_mNR¹²C(=O)-, -(CH₂)_mS(CH₂)_m⁻, -NR¹²C(=O)(CH₂)_m⁻, -NR¹²C(=O)(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NR¹²⁻, -(CH₂)_mC(=O)NR¹²⁻, -(CH₂)_mNR¹²(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -
- 10 ((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿ⁻, -NR¹²(CH₂)_m⁻, -NR¹²C(R¹²)₂(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mC(R¹²)₂NR¹²⁻, -
- (CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mNR¹²⁻, -NR¹²(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m⁻, -NR¹²C(R¹²)₂(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mC(R¹²)₂NR¹²⁻, -NR¹²(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -NR¹²C(R¹²)₂(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(R¹²)₂NR¹²⁻, -NR¹²C(R¹²)₂(CH₂)_mOC(=O)NR¹²(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mNR¹²C(=O)O(CH₂)_mC(R¹²)₂NR¹²⁻, -
- NR¹²C(R¹²)₂(CH₂)_mOC(=O)NR¹²(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mNR¹²C(=O)O(CH₂)_mC(R¹²)₂NR¹²⁻, -
- 15 NR¹²C(R¹²)₂(CH₂)_mOC(=O)NR¹²((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿNR¹²C(=O)O(CH₂)_mC(R¹²)₂NR¹²⁻, -
- (CH₂)_mX₃(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿNR¹²C(=O)O(CH₂)_mC(R¹²)₂NR¹²⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mNR¹²⁻, -
- NR¹²((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿNR¹²⁻, -(CH₂)_mNR¹²⁻, -NR¹²((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m⁻, -
- NR¹²((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿNR¹²⁻, -(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿNR¹²⁻, -
- 20 (C(R¹²)₂)_m⁻, -(CH₂CH₂O)_n⁻, -(OCH₂CH₂)_n⁻, -(CH₂)_mO(CH₂)_m⁻, -S(=O)₂(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mS(=O)₂⁻, -
- S(=O)₂(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mS(=O)₂⁻, -S(=O)₂(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mX₃(CH₂)_mS(=O)₂⁻, -(CH₂)_mX₂X₁C(=O)-, -C(=O)X₁X₂(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿC(=O)X₂X₁C(=O)-, -
- C(=O)X₁X₂C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿX₂X₁C(=O)-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mX₂X₁C(=O)-, -
- C(=O)X₁X₂(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿX₂X₁C(=O)-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mNR¹²C(=O)-, -
- 25 -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mC(=O)-, -C(=O)(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NR¹²(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿC(=O)-, -C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mNR¹²C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mC(=O)X₂X₁C(=O)NR¹²(CH₂)_m⁻, -X₄X₁X₂C(=O)(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mC(=O)X₂X₁X₄⁻, -X₁C(=O)(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_mC(=O)X₁⁻, -C(=O)CHR^{aa}NR¹²⁻, -
- CHR^{aa}C(=O)-, -C(=O)NR¹²⁻, -C(=O)O-, -S-, -SCH₂(C=O)NR¹²⁻, -NR¹²C(=O)CH₂S-, -S(=O)₂CH₂CH₂S-, -
- 30 SCH₂CH₂S(=O)₂⁻, -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂S-, -SCH₂CH₂S(=O)₂CH₂CH₂S-, -NR¹²C(=S)-, -(CH₂)_mX₃O(CH₂)_mⁿC(=O)-, -
- C(=O)((CH₂)_mO)_nX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mNR¹²C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mO(CH₂)_mⁿC(=O)NR¹²(CH₂)_m⁻, -
- (CH₂)_mNHC(=O)NR¹²(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mNR¹²C(=O)-, -C(=O)NR¹²(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -

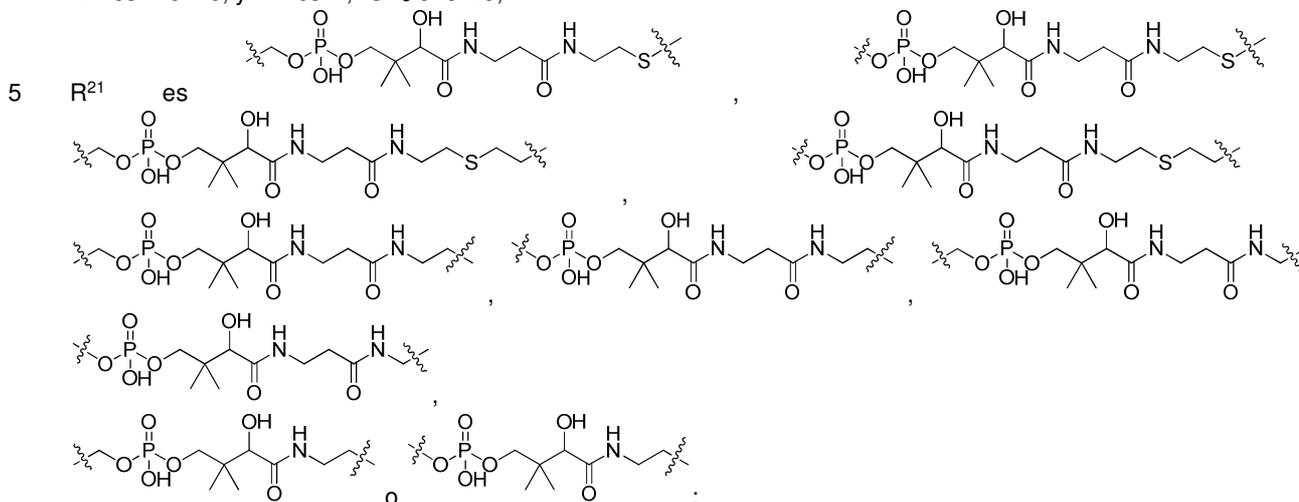
NR₁₂S(=O)₂(CH₂)_mX₃(CH₂)_m⁻, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mS(=O)₂NR₁₂⁻,





donde:

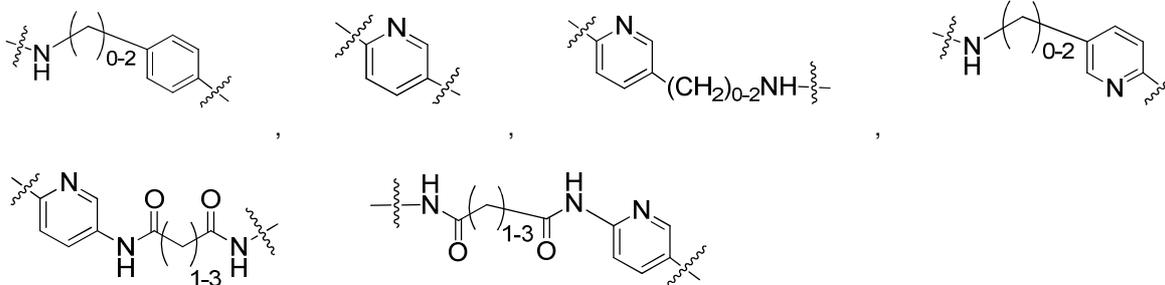
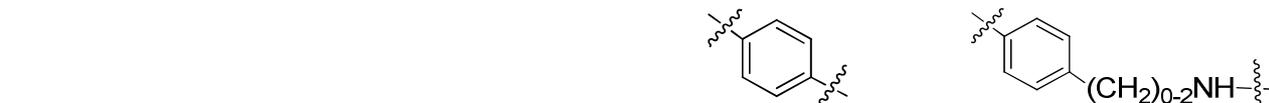
R²⁰ es H o Me, y R³⁰ es H, -CH₃ o fenilo;



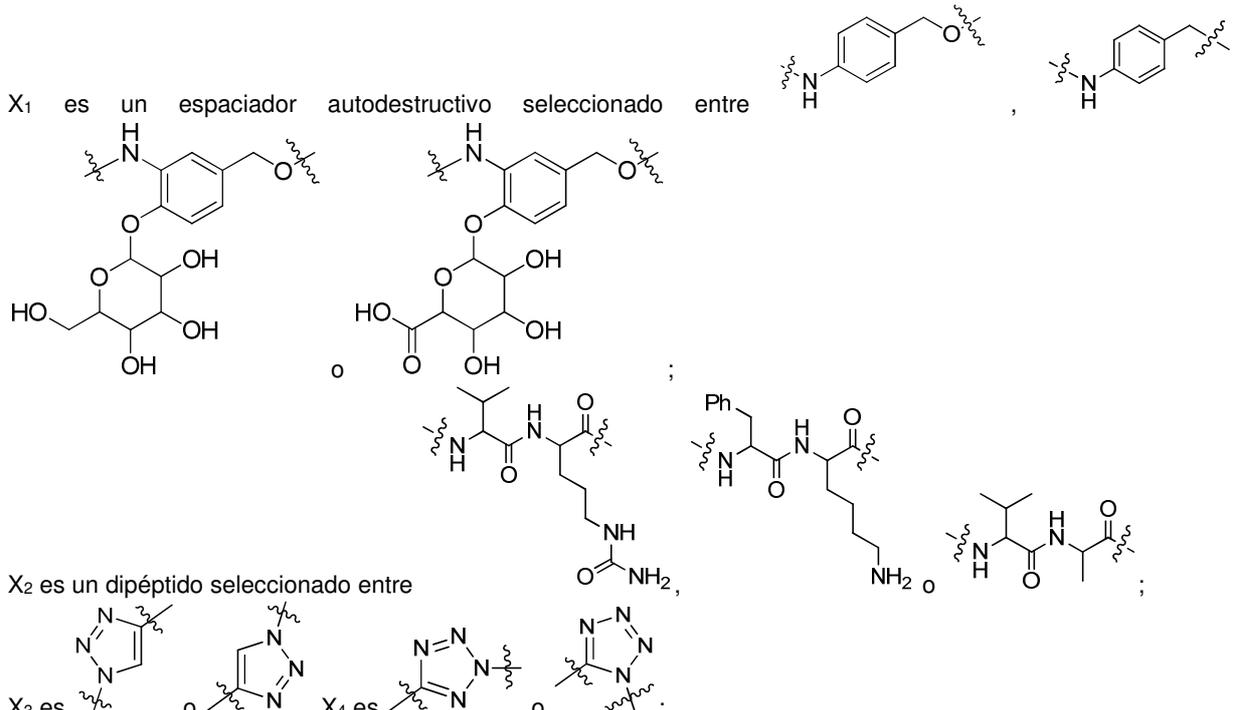
10 cada R²⁵ se selecciona independientemente entre H o alquilo C₁₋₄;

R^{aa} es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado entre glicina, alanina, triptófano, tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina, valina, asparagina, ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico, histidina, arginina, lisina, cisteína, metionina, serina, treonina, fenilglicina y *t*-butilglicina;

R³² se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₄, fenilo, pirimidina y piridina;



R³⁴ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₄, y haloalquilo C₁₋₆;

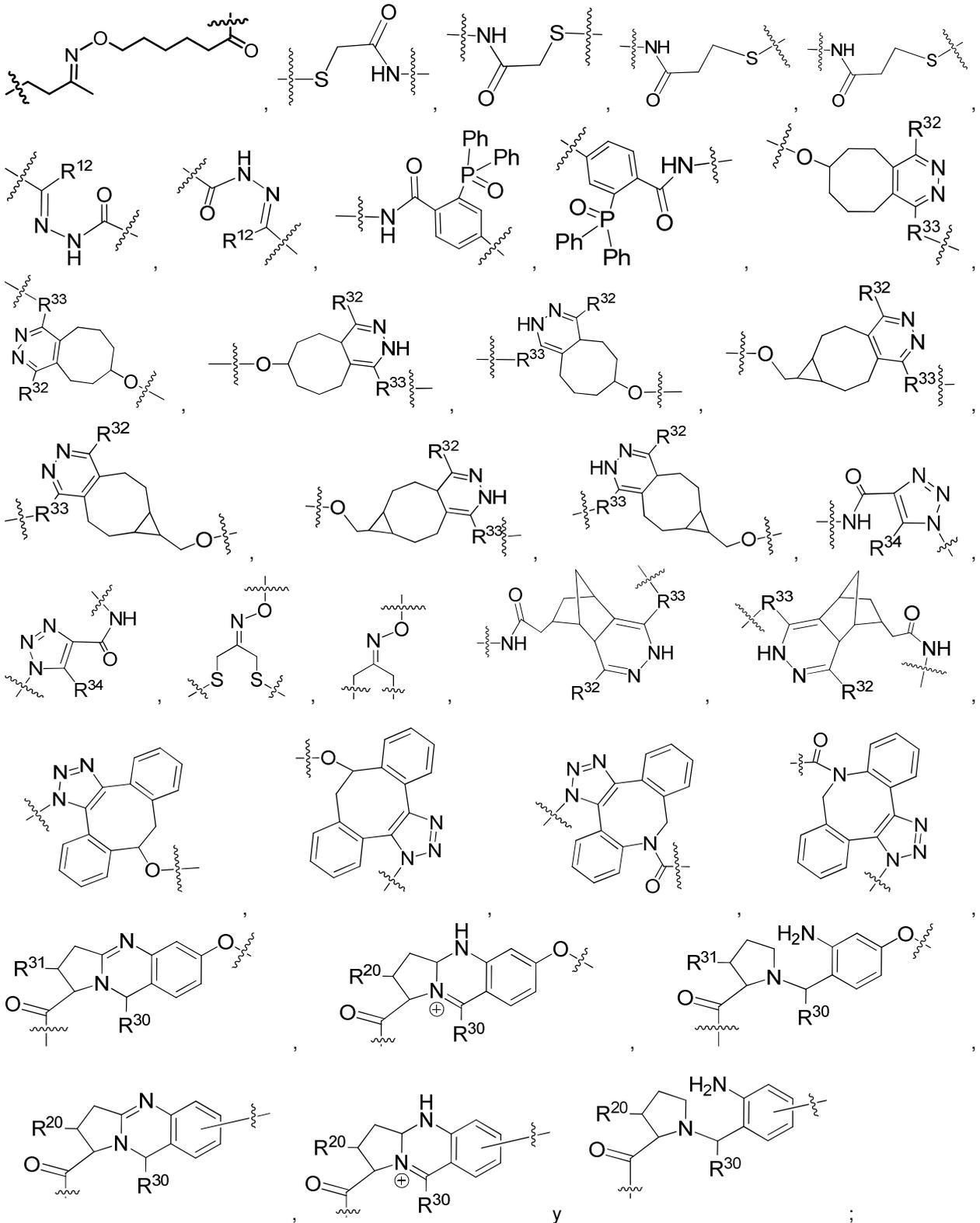


5 cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Los componentes de conector L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ de los inmunocombinados de Fórmula (II) se seleccionan cada uno independientemente entre un enlace, $-(CH_2)_m-$, $-C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2(CH_2)_mNR^{12}((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_mNR^{12}((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mS(=O)_2((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-C(=O)(CH_2)_mNR^{12}(CH_2)_m-$, $-C(=O)NR^{12}(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-C(=O)NH(CH_2)_mNR^{12}C(=O)X_1X_2C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_mO_n-$, $-C(=O)X_1C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)X_1C(=O)NR^{12}(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$,

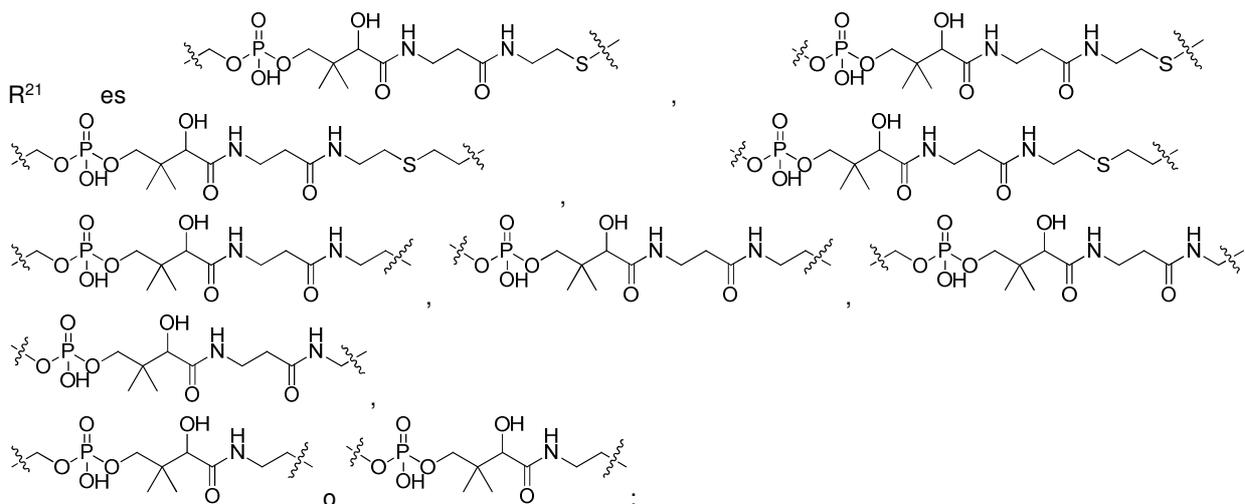
25 $C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mC(=O)-$, $-(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)-$, $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mO(CH_2)_mN(C=O)-$, $-(CH_2)_mO(CH_2)_mS(=O)_2(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mNR^{12}(CH_2)_mC(=O)-$, $-(CH_2)_mNR^{12}C(=O)-$, $-(CH_2)_mC(=O)X_2X_1C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNHC(=O)-$,

30 $(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)X_1-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)-$, $((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mO(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mO(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mX_3((CH_2)_mO)_n(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)-$, $-C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mO(CH_2)_mN(C=O)-$, $C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mC(=O)-$, $-C(=O)(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mO(CH_2)_mN(C=O)-$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $C(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)-$, $-(CH_2)_mS(CH_2)_m-$, $-NR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-NR^{12}C(=O)(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(=O)NR^{12}-$, $-(CH_2)_mC(=O)NR^{12}-$, $-(CH_2)_mNR^{12}(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $((CH_2)_mO)_n(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mO(CH_2)_m-$, $-NR^{12}(CH_2)_m-$, $-NR^{12}C(R^{12})_2(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mC(R^{12})_2NR^{12}-$, $(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}-$, $-NR^{12}(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $-NR^{12}C(R^{12})_2(CH_2)_mNR^{12}C(=O)(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mC(=O)NR^{12}(CH_2)_mC(R^{12})_2NR^{12}-$, $-NR^{12}(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-NR^{12}C(R^{12})_2(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $(CH_2)_mX_3(CH_2)_mC(R^{12})_2NR^{12}-$, $-NR^{12}C(R^{12})_2(CH_2)_mOC(=O)NR^{12}(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mNR^{12}C(=O)O(CH_2)_mC(R^{12})_2NR^{12}-$, $NR^{12}C(R^{12})_2(CH_2)_mOC(=O)NR^{12}(CH_2)_mX_3(CH_2)_m-$, $-(CH_2)_mX_3(CH_2)_mNR^{12}C(=O)O(CH_2)_mC(R^{12})_2NR^{12}-$,



5

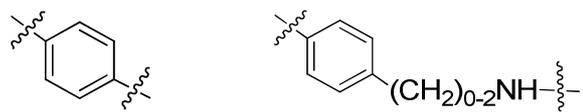
10 donde:
 R^{20} es H o Me, y R^{30} es H, $-CH_3$ o fenilo;



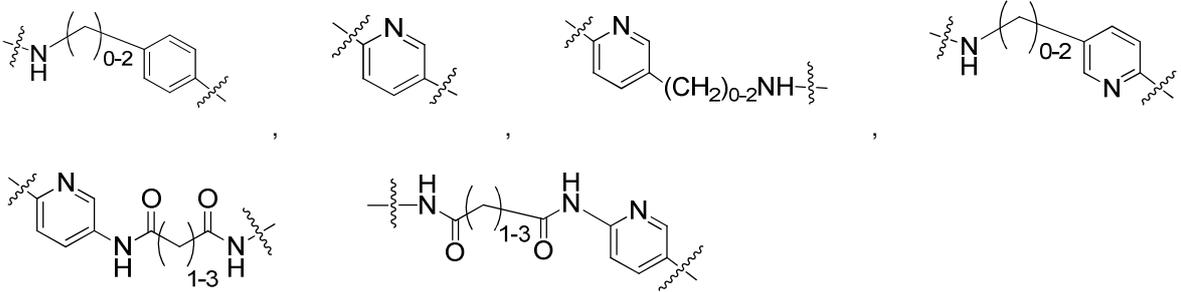
cada R²⁵ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁₋₄;

R^{aa} es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado entre glicina, alanina, triptófano, tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina, valina, asparagina, ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico, histidina, arginina, lisina, cisteína, metionina, serina, treonina, fenilglicina y *t*-butilglicina;

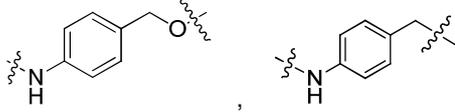
R³² se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₄, fenilo, pirimidina y piridina;



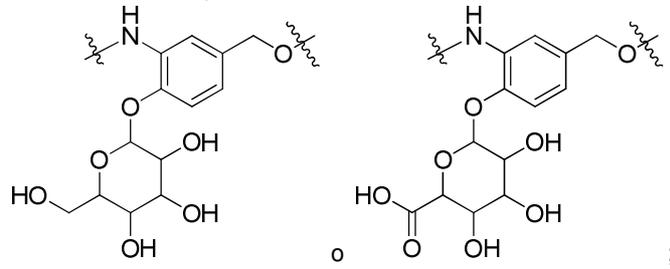
R³³ se selecciona independientemente entre



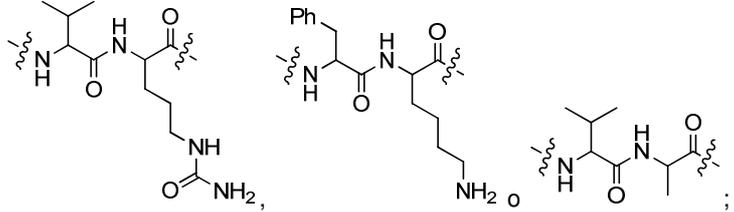
R³⁴ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₄, y haloalquilo C₁₋₆;

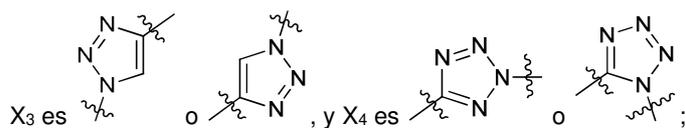


X₁ es un espaciador autodestructivo seleccionado entre



X₂ es un dipéptido seleccionado entre

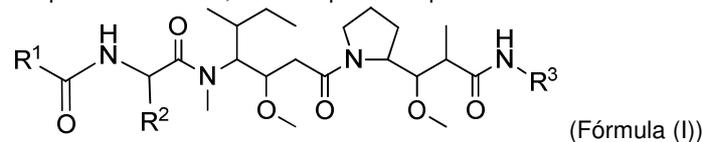




cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

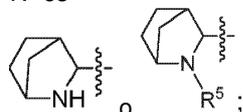
5 Péptidos citotóxicos

Los péptidos citotóxicos divulgados en la presente, o un estereoisómero de estos, y sales farmacéuticamente aceptables de estos, son compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I)

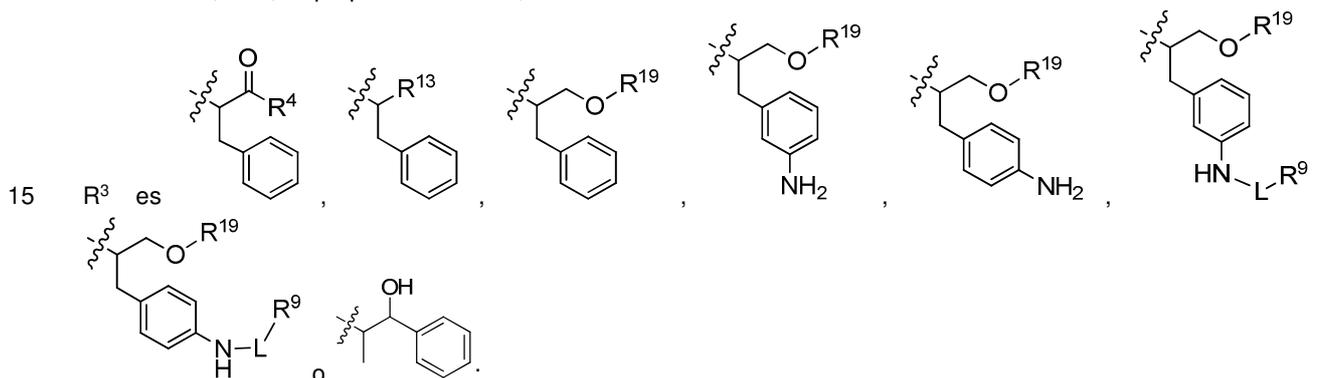


donde:

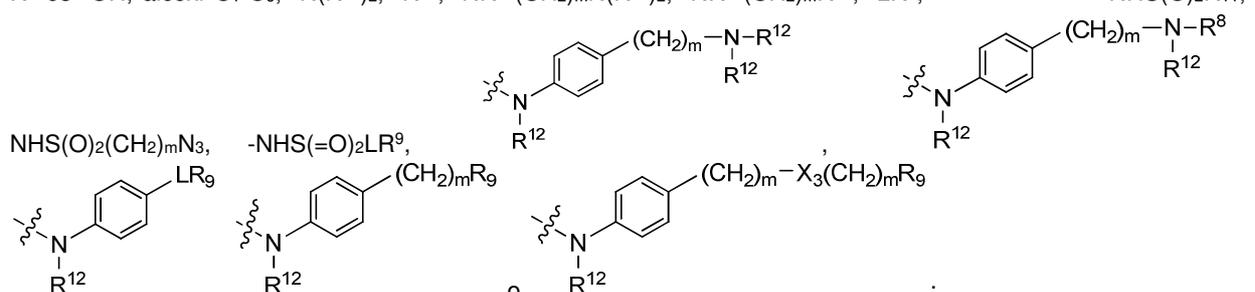
R¹ es



R² es metilo, etilo, isopropilo o *sec*-butilo;



R⁴ es -OH, alcoxi C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶, -NR¹²(CH₂)_mN(R¹⁴)₂, -NR¹²(CH₂)_mR¹⁶, -LR⁹, -NHS(O)₂R¹¹, -

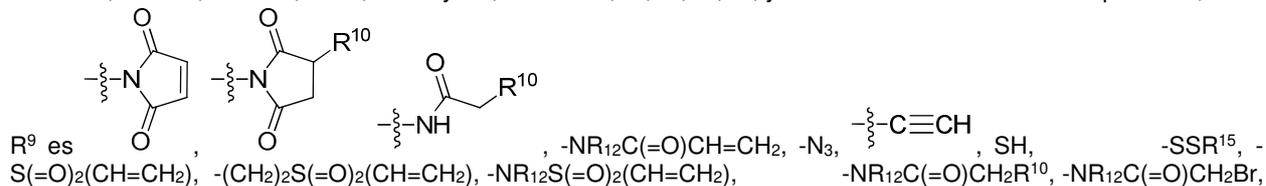


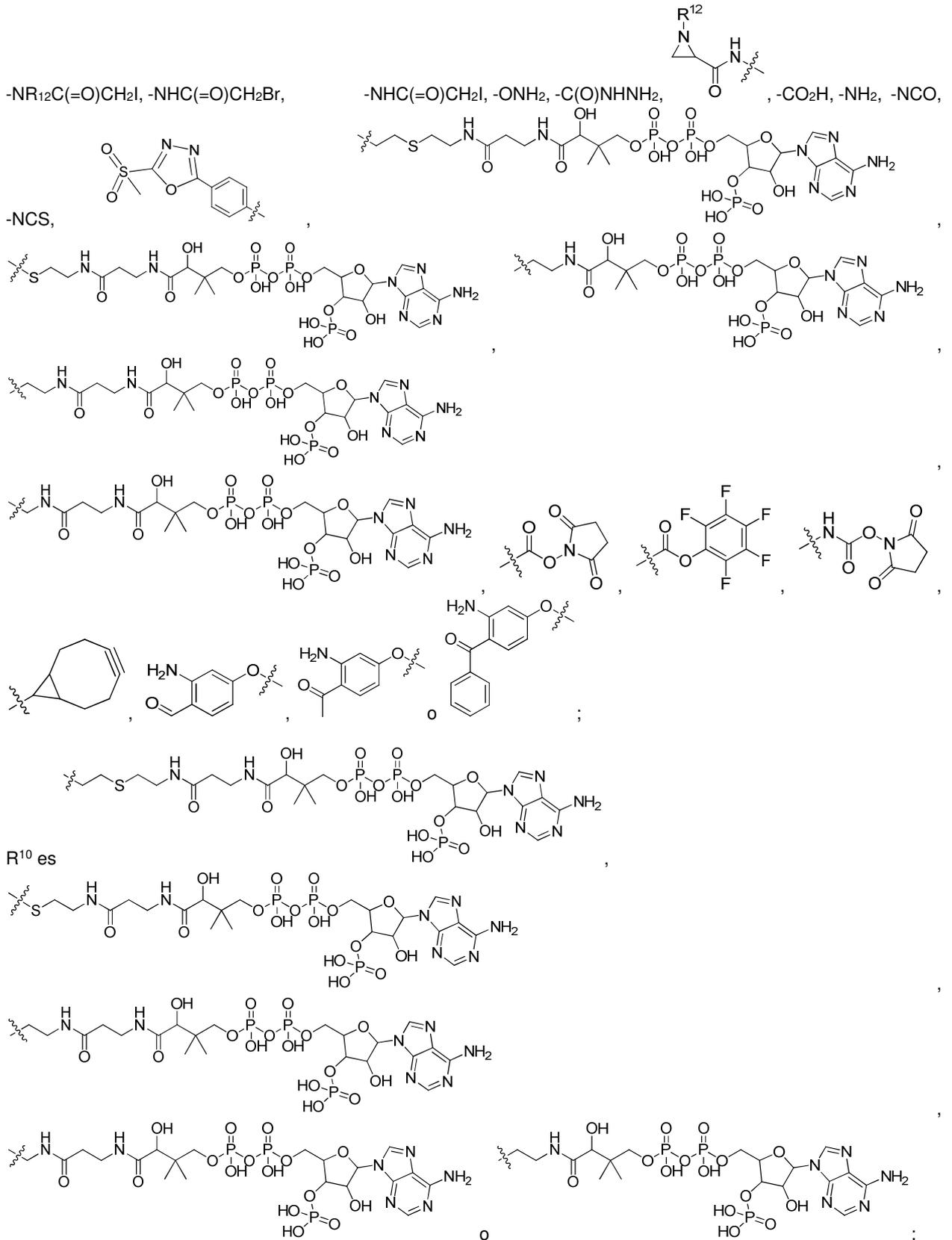
20 R⁵ es alquilo C₁-C₆, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², -((CH₂)_mO)_nR¹², o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con -CN, -C(=O)NH₂ o de 1 a 5 hidroxilos,

R⁷ es LR⁹;

R⁸ es H o LR⁹;

25 cada L se selecciona independientemente entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂-, -L₂L₁- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;

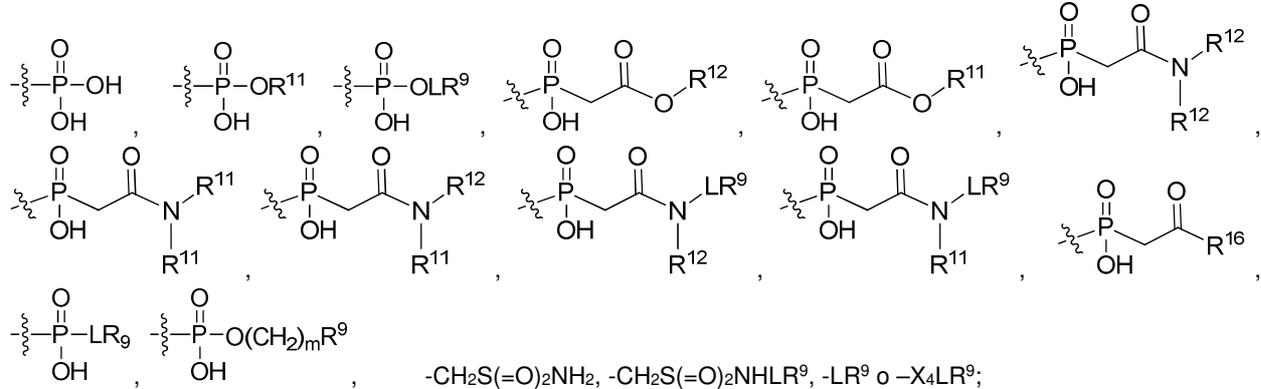




cada R^{11} se selecciona independientemente entre alquilo C_1-C_6 y alquilo C_1-C_6 que se sustituye opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;

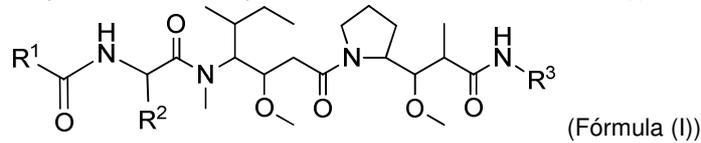
cada R^{12} se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C_1-C_6 ;

R¹³ es tetrazolilo, imidazolilo sustituido con fenilo, oxadiazolilo sustituido con fenilo, pirazolilo, pirimidinilo,

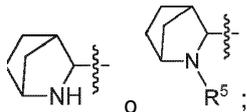


- 10 X₃ es o ; X₄ es ;
cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; y
cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

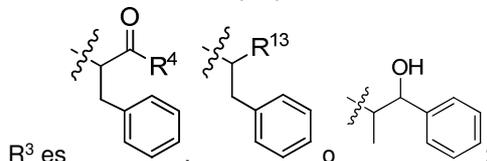
- 15 También se divulgan en la presente péptidos citotóxicos, o un estereoisómero de estos, y sales farmacéuticamente aceptables de estos, que tienen la estructura de Fórmula (I)



donde:
R¹ es



- 20 R² es metilo, etilo, isopropilo o *sec*-butilo;

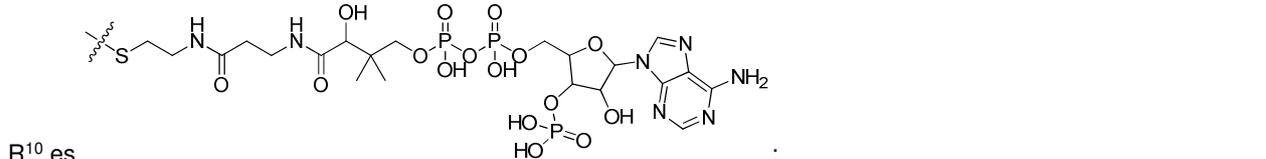
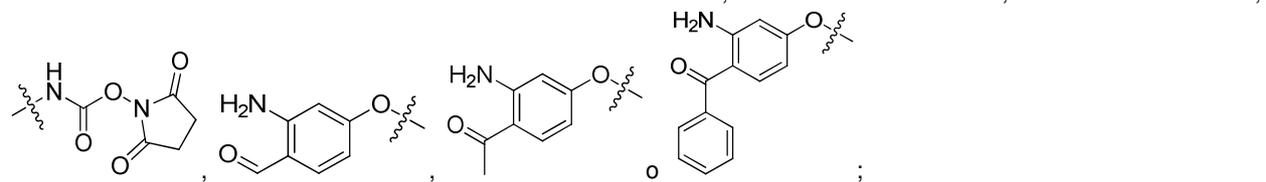
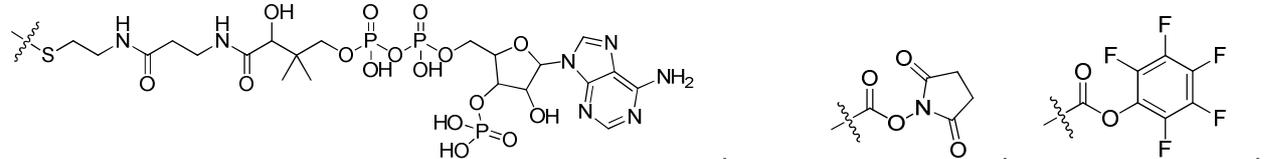
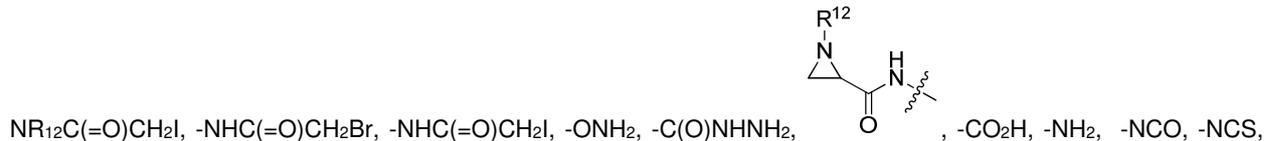
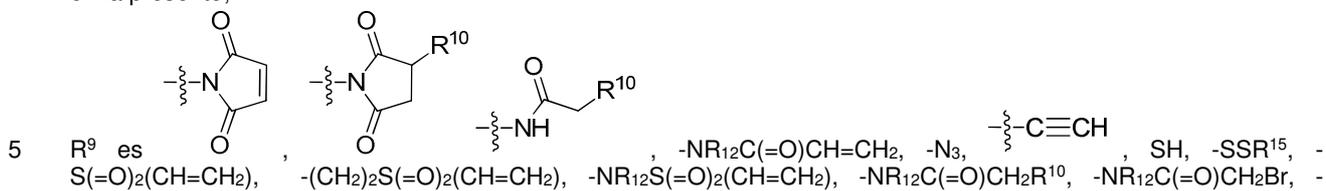


R⁴ es -OH, alcoxi C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶, -NR¹²(CH₂)_mN(R¹⁴)₂, -NR¹²(CH₂)_mR¹⁶, -LR⁹,
-NHS(O)₂(CH₂)_mN₃, -NHS(=O)₂LR⁹,

- 25 R⁵ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², o -((CH₂)_mO)_nR¹²;
R⁷ es LR⁹;

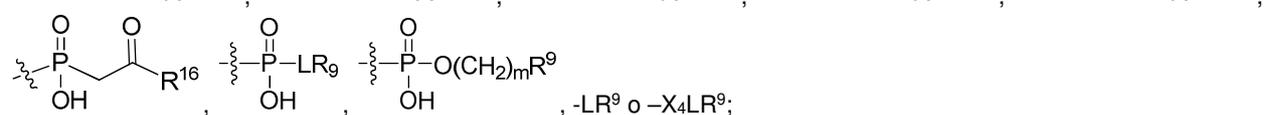
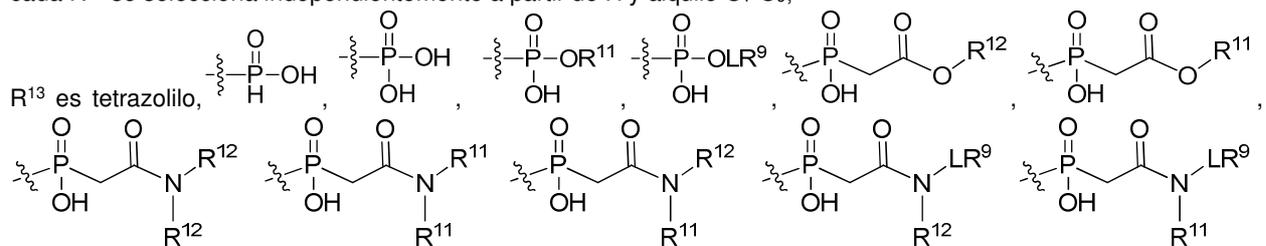
R⁸ es H o LR⁹;

cada L es un conector seleccionado independientemente entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂-, -L₂L₁- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;



10 R¹⁰ es cada R¹¹ se selecciona independientemente entre alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ que se sustituye opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;

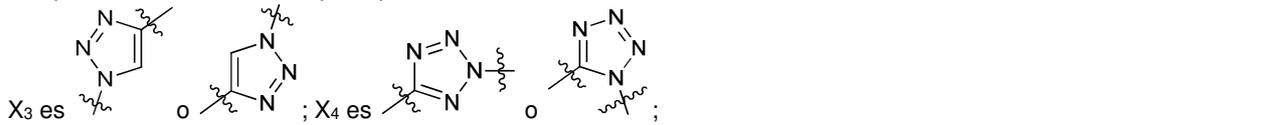
cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;



cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

R¹⁵ es 2-piridilo o 4-piridilo;

20 R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O, que está sin sustituir o sustituido con -LR⁹;



cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10;

cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

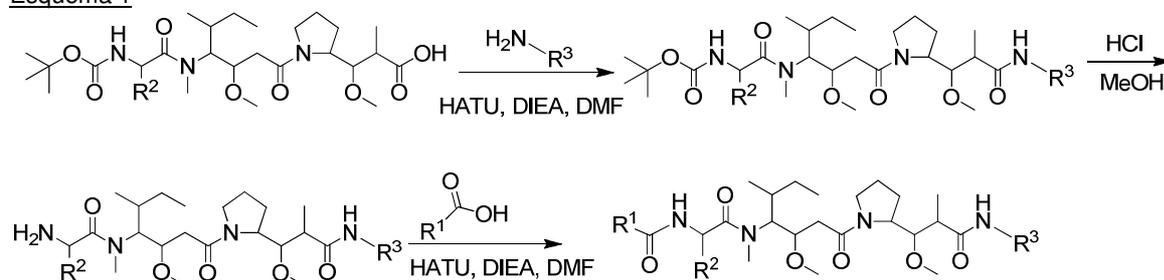
25 Métodos sintéticos

Todos los materiales de partida, componentes, reactivos, ácidos, bases, agentes deshidratantes, disolventes y catalizadores utilizados para sintetizar los compuestos de la presente invención están comercializados o se pueden producir mediante métodos de síntesis orgánica conocidos por los expertos en la técnica (remítase, por ejemplo, a Houben-Weyl 4.^a Ed. 1952, Methods of Organic Synthesis, Thieme, Volumen 21). Además, los compuestos de la presente invención se pueden producir mediante métodos de síntesis orgánica conocidos para un experto en la técnica, habida cuenta de los siguientes ejemplos.

Se proporcionan ejemplos ilustrativos de las estrategias sintéticas para el compuesto de Fórmula (I) y subfórmulas de esta, en los siguientes Esquemas generales. En los siguientes esquemas, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y L son como se definen en la presente. Aunque los esquemas generales muestran reactivos específicos utilizados para varios pasos sintéticos, se sobreentiende que se pueden utilizar otros reactivos conocidos para lograr dichos pasos sintéticos.

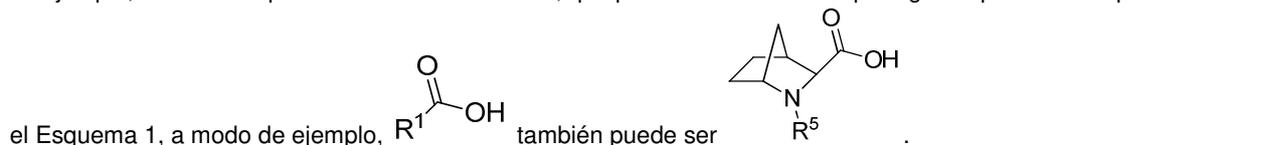
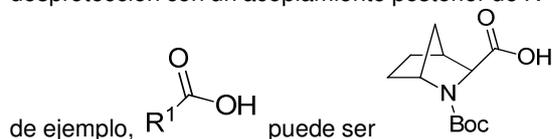
A continuación, en los Esquemas 1 a 3 se muestran estrategias sintéticas para los compuestos de Fórmula (I) y subfórmulas de esta, donde R¹ es un heterocicloalquilo de 6 miembros conectado en C que contiene 1-2 heteroátomos de N y un puente alquileo C₁-C₂ o R¹ es un heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros conectado en C que contiene 1-2 heteroátomos de N, donde cada uno está sin sustituir o cada uno está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶.

Esquema 1

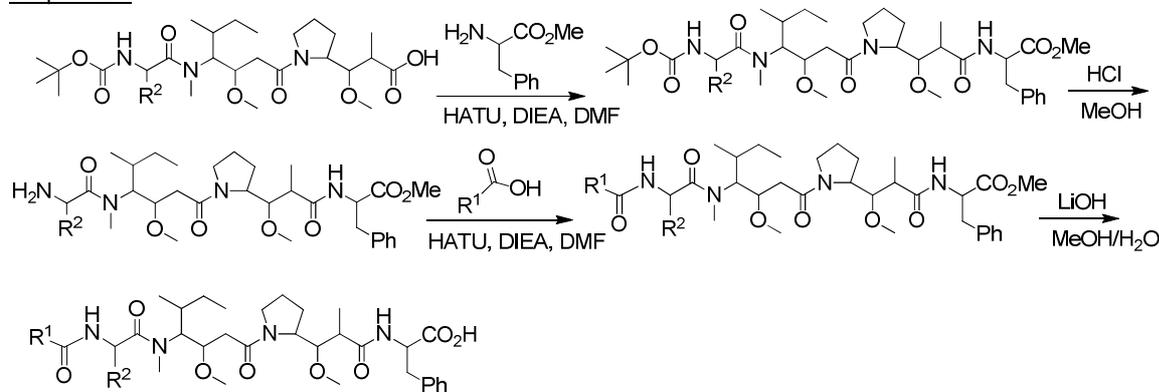


Fórmula (I)

En el Esquema 1, R³ se acopla con un péptido corto mediante formación de un enlace amida seguida por un paso de desprotección, con un acoplamiento posterior de R¹ mediante formación de un enlace amida. En el Esquema 1, a modo

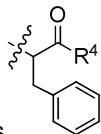


Esquema 2



30

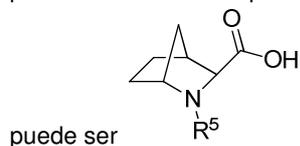
El Esquema 2 ilustra una estrategia sintética ilustrativa para los compuestos de Fórmula (I), y subfórmulas de esta,



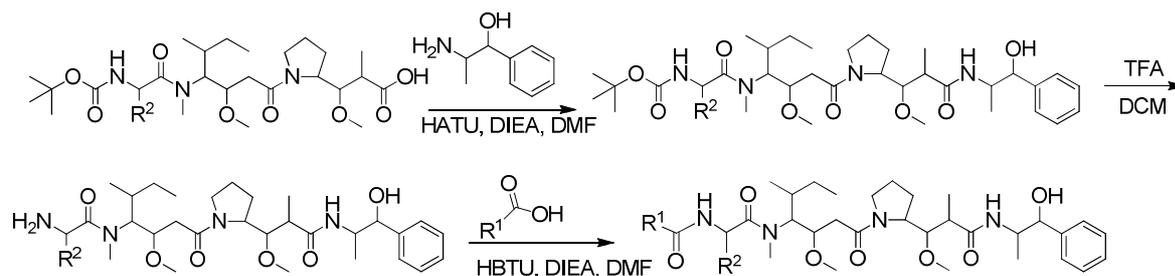
donde R³ es , y R⁴ es -OH o -OCH₃. En el Esquema 2, R³ se acopla con un péptido corto mediante formación de un enlace amida seguida por un paso de desprotección con un acoplamiento posterior de R¹ mediante formación

de un enlace amida. En el Esquema 2, a modo de ejemplo, R¹ puede ser , que

posteriormente se desprotege después del acoplamiento. En el Esquema 1, a modo de ejemplo, R¹ también



Esquema 3

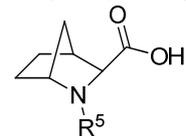


El Esquema 3 ilustra una estrategia sintética ilustrativa para los compuestos de Fórmula (I), y subfórmulas de esta,

donde R³ es . En el Esquema 3, R³ se acopla con un péptido corto mediante formación de un enlace amida seguida por un paso de desprotección con un acoplamiento posterior de R¹ mediante formación de un enlace

amida. En el Esquema 3, a modo de ejemplo, R¹ puede ser , que posteriormente se

desprotege después del acoplamiento. En el Esquema 1, a modo de ejemplo, R¹ también puede ser

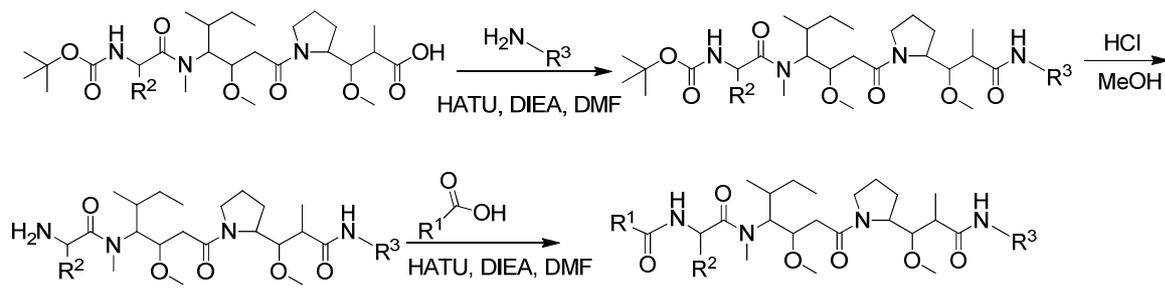


A continuación, en los Esquemas 4 a 6 se muestran estrategias sintéticas para los compuestos conectados al extremo

N terminal de Fórmula (I), y subfórmulas de esta, donde R¹ es o .

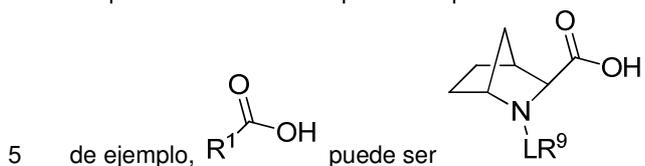
Esquema 4

20

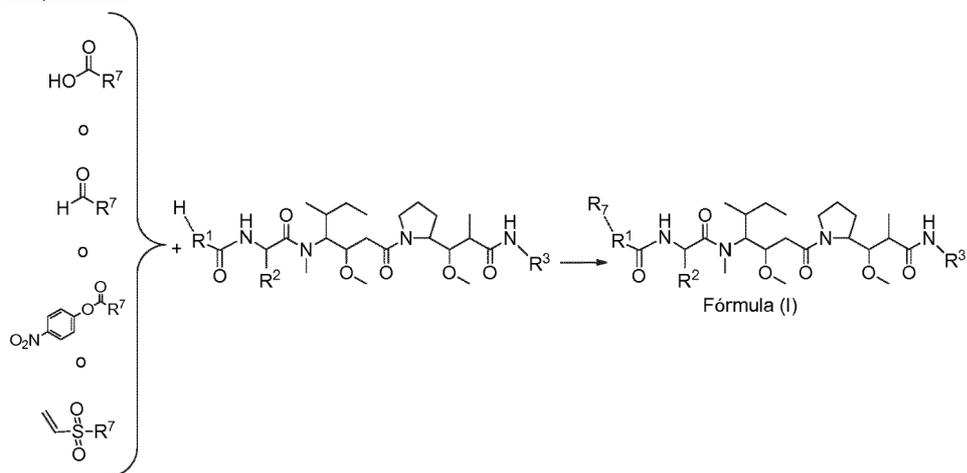


Fórmula (I)

En el Esquema 4, R³ se acopla con un péptido corto mediante formación de un enlace amida seguida por un paso de desprotección con un acoplamiento posterior de R¹ mediante formación de un enlace amida. En el Esquema 3, a modo

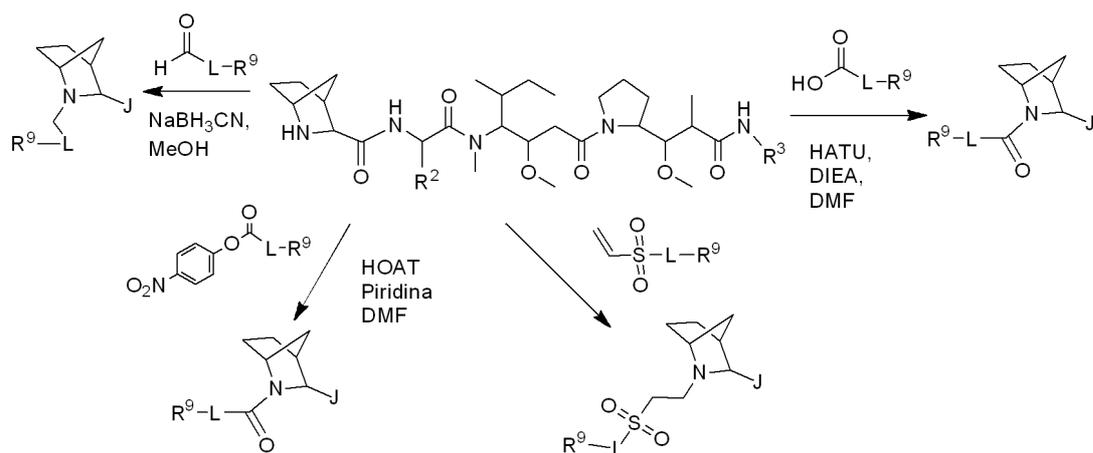


Esquema 5



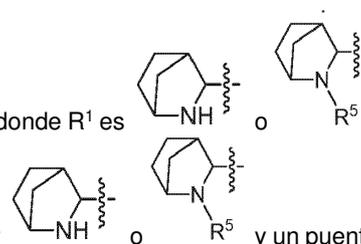
10 En el Esquema 5, R¹ es inicialmente o (remítase a los Esquemas 1 a 3) y a continuación se une

posteriormente R⁷ para obtener un puente alquileo C₁-C₂ o R¹ es o , donde cada uno se sustituye con un R⁷. Se muestran ejemplos ilustrativos en el esquema a continuación:

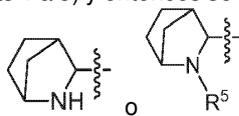


*
donde J es

Como alternativa, los compuestos de Fórmula (I) y subfórmulas de esta, donde R¹ es



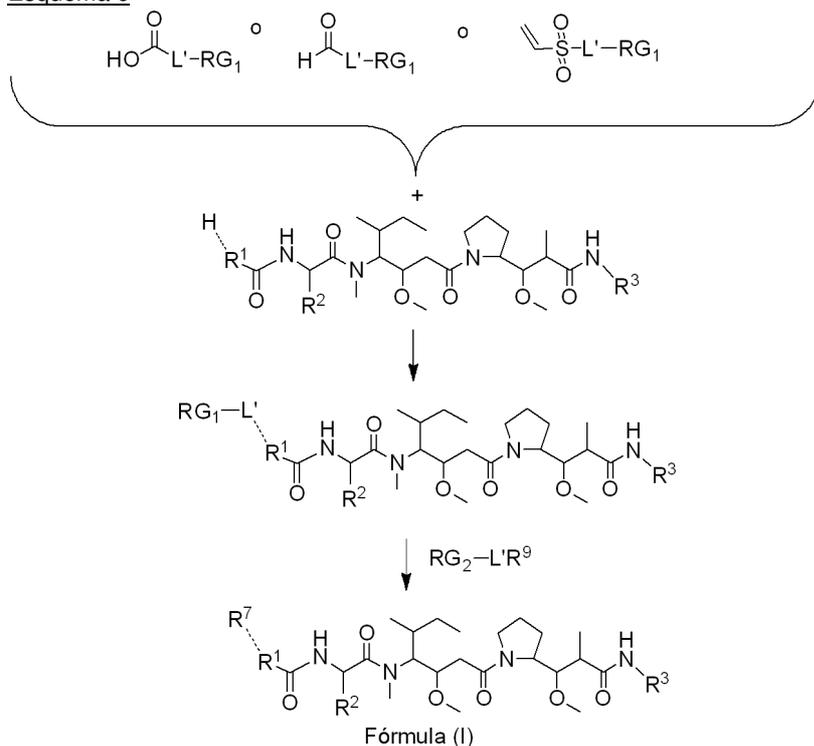
a los Esquemas 1 a 3) y entonces se une posteriormente R⁷ para obtener



C₁-C₂ o R¹ es , donde cada uno se sustituye con un R⁷, se obtienen mediante un proceso de dos pasos tal como se observa en el Esquema 6.

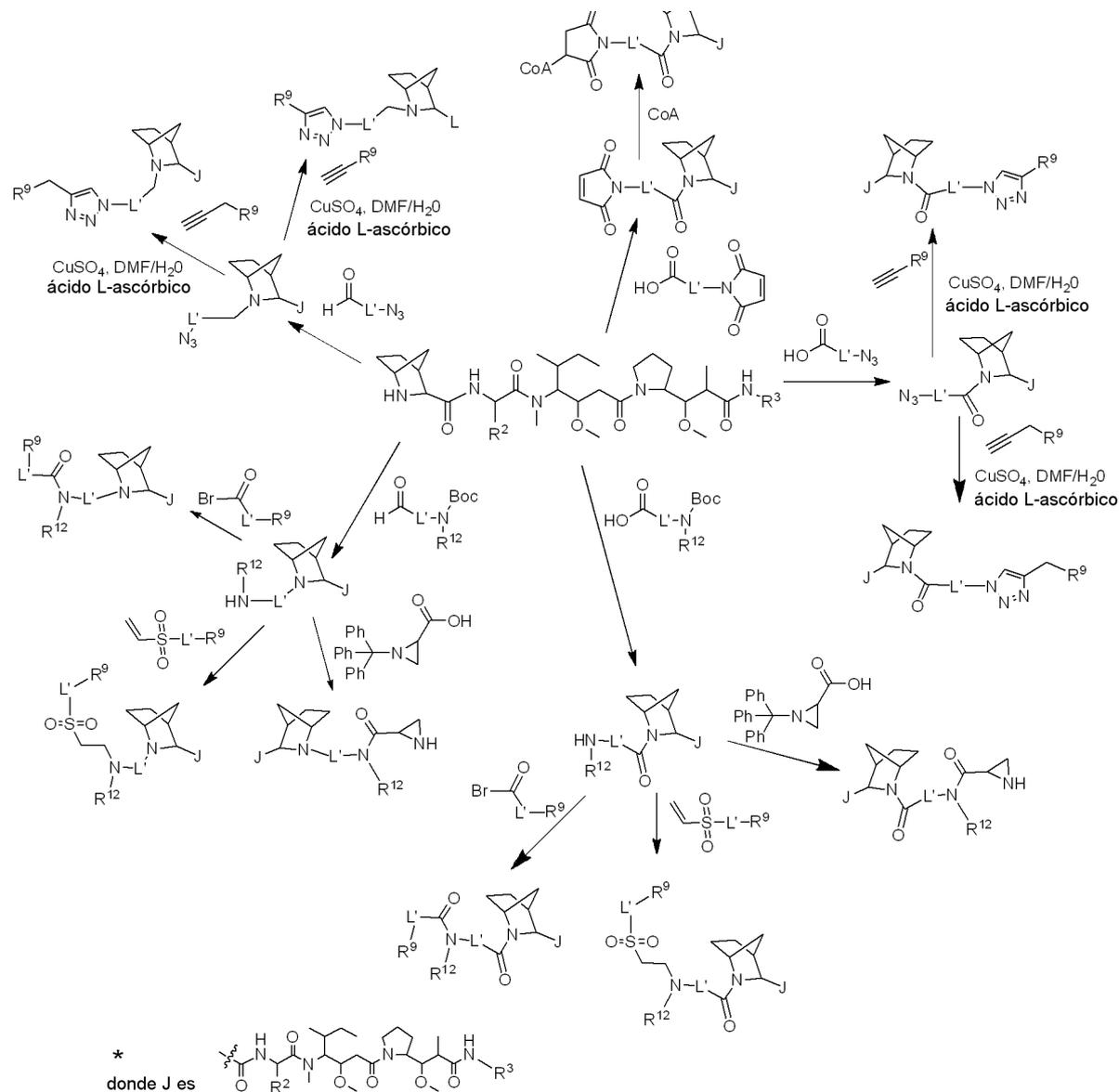
5

Esquema 6

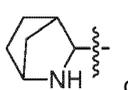
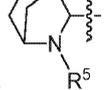


donde RG₁ y RG₂ son grupos reactivos tales como los que se proporcionan en la Tabla 1, y L' es uno o más componentes conectores.

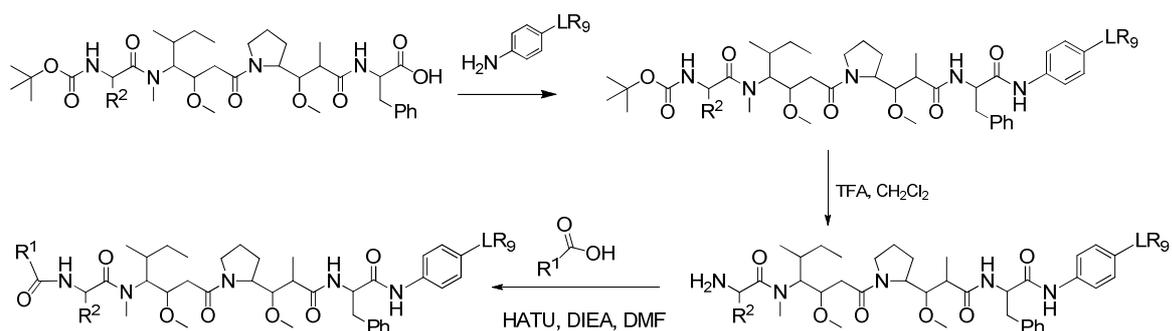
Se muestran ejemplos ilustrativos en el esquema a continuación:



5 L' es uno o más componentes conectores
A continuación, en el Esquema 7 se muestra una estrategia sintética para los compuestos conectados al extremo C

terminal de Fórmula (I), y subfórmulas de esta, donde R¹ es  o .

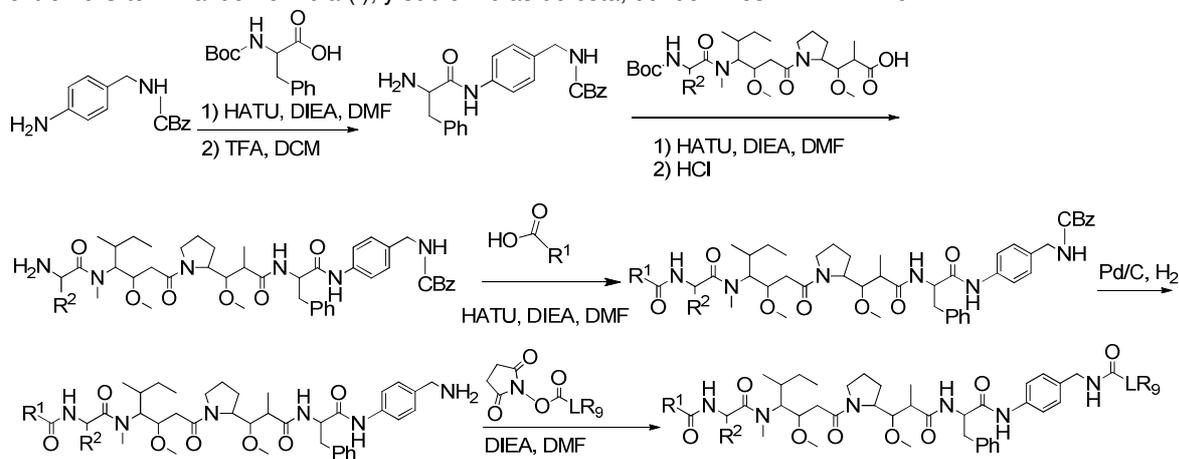
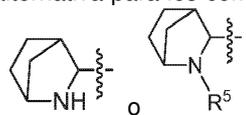
Esquema 7



Esquema 8

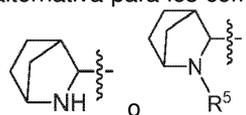
A continuación, en el Esquema 8 se muestra una estrategia sintética alternativa para los compuestos conectados al

5 extremo C terminal de Fórmula (I), y subfórmulas de esta, donde R¹ es



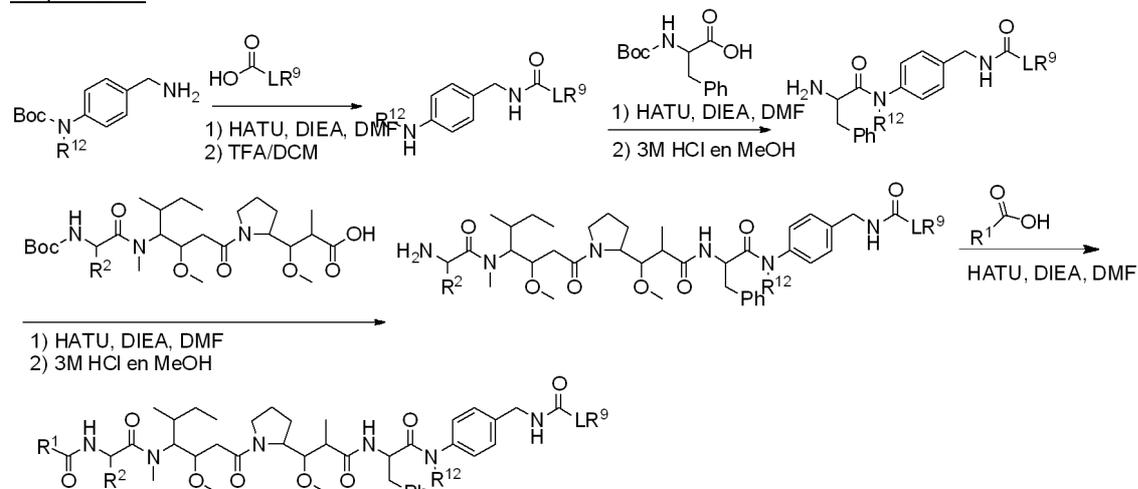
A continuación, en el Esquema 9 se muestra una estrategia sintética alternativa para los compuestos conectados al

10 extremo C terminal de Fórmula (I), y subfórmulas de esta, donde R¹ es



Esquema 9

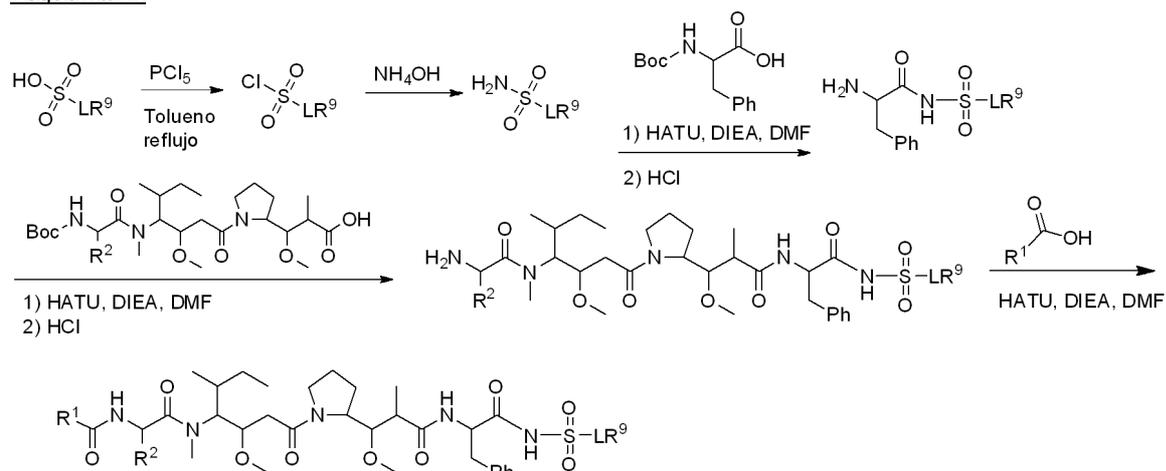
Esquema 10



A continuación, en el Esquema 11 se muestra una estrategia sintética alternativa para los compuestos conectados al

5

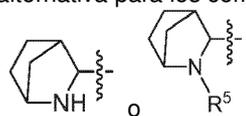
Esquema 11



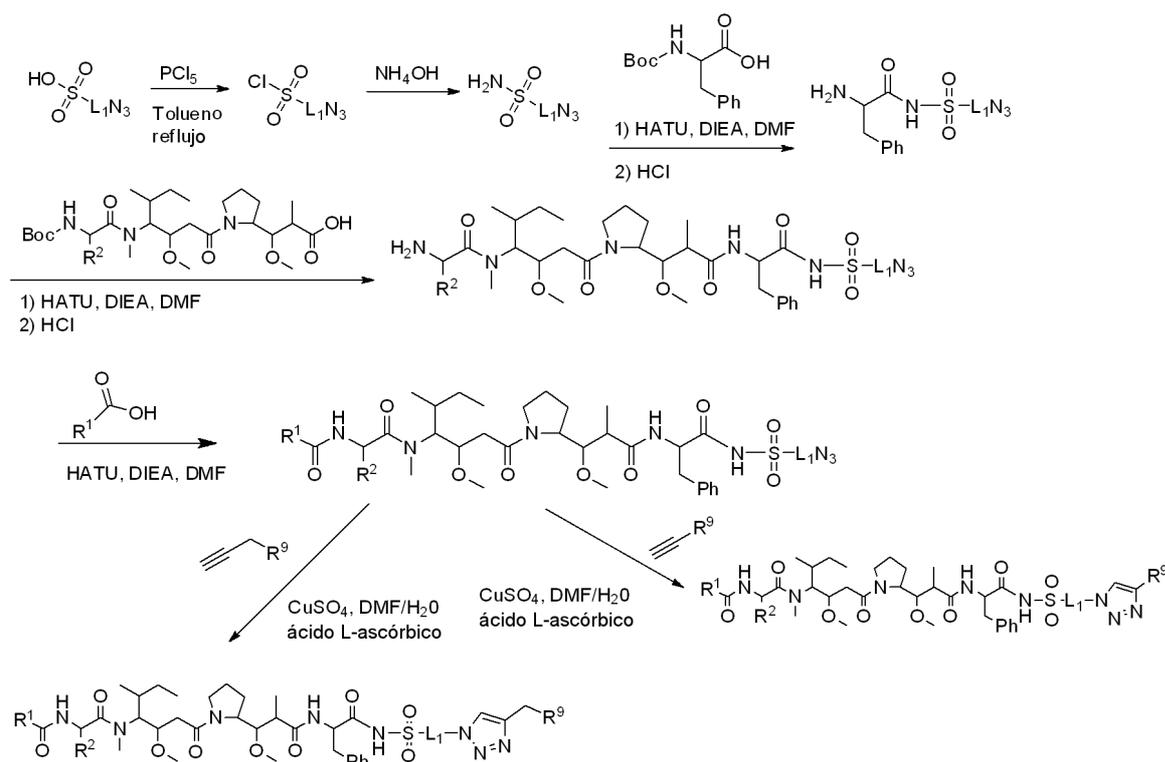
A continuación, en el Esquema 12 se muestra una estrategia sintética alternativa para los compuestos conectados al

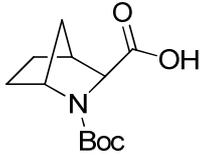
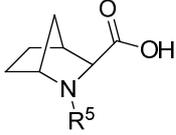
10

Esquema 12



extremo C terminal de Fórmula (I), y subfórmulas de esta, donde R¹ es



En los Esquemas 7 a 12, a modo de ejemplo, R^1 puede ser , que posteriormente se desprotege después del acoplamiento. En el Esquema 1, a modo de ejemplo, R^1 también puede ser 

5 . Como alternativa, en los Esquemas 7 a 12, R^5 se puede unir, después de la desprotección o el R^1

sin sustituir se obtiene mediante reacción posterior con $H-C(=O)-R^5$ o $HO-C(=O)-R^5$.

10 La invención incluye además cualquier variante de los procesos de la presente, en la que se utilice un producto intermedio que se pueda obtener en cualquier etapa de estos como material de partida y se lleven a cabo los pasos restantes o en la que los materiales de partida se formen *in situ* en las condiciones de reacción, o en la que los componentes de reacción se utilicen en forma de sus sales o material ópticamente puro.

15 Los ejemplos siguientes pretenden ilustrar la invención y no se debe interpretar que suponen limitaciones de la misma. Las temperaturas se indican en grados Celsius. Si no se menciona lo contrario, todas las evaporaciones se llevan a cabo a presión reducida, habitualmente entre aproximadamente 15 mm de Hg y 100 mm de Hg (= 20-133 mbar). Las abreviaturas utilizadas son las convencionales en la técnica. Todas las reacciones se llevaron a cabo en nitrógeno utilizando disolventes de grado comercial sin ninguna destilación adicional. Los reactivos se utilizaron como grado comercial sin purificación adicional. La cromatografía en capa fina se llevó a cabo utilizando placas de gel de sílice CCF. La cromatografía en columna se llevó a cabo utilizando un sistema ISCO Combiflash Companion, utilizando columnas Redisep® preempaquetadas de grado flash.

20 La HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema Waters Autopurification utilizando las siguientes condiciones: Columna Sunfire C18 30 x 100 mm, 5 μ m, elución en gradiente con CH_3CN en agua + 0.05% de TFA- CH_3CN a 30 mL/min.

Métodos analíticos

A menos que se indique lo contrario, se utilizaron los siguientes métodos de HPLC y HPLC/MS en la preparación de los Intermedios y los Ejemplos.

5 El análisis LC/MS se llevó a cabo en un sistema Agilent 1200sl/6140.

Columna: Waters Acquity HSS T3 C18, 50x2,0, 1,8µm

Fase móvil: A) H₂O + 0,05% de TFA; B: acetonitrilo + 0,035% de TFA

Método de bombeo:

| Tiempo | A% | B% | Flujo (mL/min) |
|--------|----|-----|----------------|
| 0 | 90 | 10 | 0,9 |
| 1,35 | 0 | 100 | 0,9 |
| 1,36 | 0 | 100 | 0,9 |
| 1,95 | 0 | 100 | 0,9 |
| 1,96 | 90 | 10 | 0,9 |
| 2,0 | 90 | 10 | 0,9 |

10 Detección: Matriz de diodos UV a 190 nm - 400 nm

Análisis MS: 200 - 1350 uma

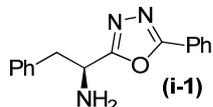
ELSD: 60 °C

Parámetros de MS:

| | |
|-------------------------------|----------|
| Polaridad | Positivo |
| Gas de secado | 12 |
| Presión del nebulizador | 50 |
| Temperatura del gas de secado | 350 |
| Voltaje capilar | 3000 |

15 **Procedimiento sintético para los intermedios**

Síntesis de (S)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanamina (**i-1**)



20 **Paso 1:** Se añadió ácido (S)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (200 mg, 0,754 mmol) a diclorometano (5,5 mL) a 0 °C, seguido de carbonildiimidazol (128 mg, 0,792 mmol). Después de agitar a 0 °C durante 30 min, se añadió benzohidrazida (103 mg, 0,754 mmol). Después de 45 min adicionales a 0 °C, se añadieron tetrabromuro de carbono (497 mg, 1,5 mmol) y trifetilfosfina (198 mg, 0,754 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h a 0 °C y, a continuación, a t.a. durante 16 h. Se añadió agua a la mezcla y se extrajo con DCM (5 mL X3). Las fases orgánicas se combinaron,

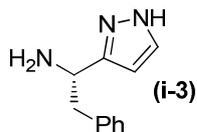
25 se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante una columna en gel de sílice (20-40% de acetato de etilo en hexanos) para obtener [(1S)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil]carbamato de *t*-butilo. MS m/z 366 (M+H). Tiempo de retención 1,351 min. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,03 - 7,85 (m, 2H), 7,62 - 7,38 (m, 3H), 7,33 - 7,16 (m, 3H), 7,18 - 7,04 (m, 2H), 5,35 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 5,15 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 3,28 (d, J = 6,6 Hz, 2H), 1,54 (s, 9H).

30 **Paso 2:** Al compuesto obtenido en el paso 1, (548 mg, 1,5 mmol) en DCM (5 mL) se añadió TFA (1,5 mL). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h y a continuación se concentró para obtener la sal de TFA de (S)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanamina (**i-1**). Se utilizó sin purificación adicional. MS m/z 266 (M+H). Tiempo de retención 0,858 min.

35 Síntesis de 2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etanamina (**i-2**).

Se añadió gota a gota cloruro de bencilmagnesio (1,2 mL, 2,4 mmol) (2 M en THF) a 2-cianopirimidina (210 mg, 2,00 mmol) en tolueno (10 mL) a 0 °C. La reacción se agitó a esta temperatura durante 1 h. A continuación, se añadió 2-butanol (10 mL), seguido de borohidruro sódico (106 mg, 2,80 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 1 h y, a continuación, se desactivó con MeOH (3 mL) y agua. La mezcla se extrajo con EtOAc (2 X 30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-30% de acetonitrilo en agua con un 0,05% de TFA) para obtener 2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etanamina (**i-2**). MS m/z 200,2 (M+H). Tiempo de retención 0,637 min. ¹H RMN (400 MHz, Acetonitrilo-*d*3) δ 8,75 (d, J = 5,0 Hz, 2H), 7,41 (t, J = 4,9 Hz, 1H), 7,27 (m, 3H), 7,14 - 7,05 (m, 2H), 4,84 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 3,45 (dd, J = 14,1, 6,3 Hz, 1H), 3,33 (dd, J = 14,1, 7,1 Hz, 1H).

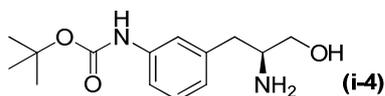
45 Síntesis de (S)-2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etanamina (**i-3**)



Paso 1: Se añadió monohidrato de hidrazina (0,034 mL, 0,69 mmol) a (*S,E*)-(5-(dietilamino)-3-oxo-1-fenilpent-4-en-2-il)carbamato de *t*-butilo (60 mg, 0,17 mmol) en MeOH (5 mL). La reacción se calentó a 70 °C durante 2 h y a continuación 50 °C durante 3 días. La mezcla de reacción se concentró, se recuperó en agua y se extrajo con DCM (5 mL X 2). Las fases de DCM se combinaron, se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante CCF preparativa en gel de sílice (4% de MeOH en DCM) para obtener (*S*)-(2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etil)carbamato de *t*-butilo. MS m/z 288,2 (M+H). Tiempo de retención 1,310 min. 1H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,53 - 7,35 (m, 1H), 7,28 - 6,90 (m, 5H), 6,01 (s, 1H), 5,47 - 5,25 (m, 0,3 H), 5,15 - 4,84 (m, 0,7H), 3,40 (s, 1H), 3,09 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 1,34 (d, J = 31,2 Hz, 9H).

Paso 2: Una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (38 mg, 0,13 mmol) en DCM (2 mL) se trató con TFA (0,5 mL) a t.a. durante 2 h y a continuación se concentró para proporcionar la sal de TFA de (*S*)-(2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etanamina (**i-3**). El producto se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional. MS m/z 188,2 (M+H). Tiempo de retención 0,616 min.

Síntesis de (*S*)-(3-(2-amino-3-hidroxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo (**i-4**)



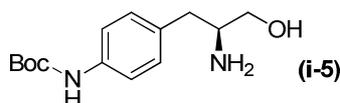
Paso 1: Se añadió BH₃ en THF (1M, 10 mL) a ácido (*S*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-nitrofenil)propanoico (562 mg, 1,81 mmol) en THF (10 mL) con agitación a 0 °C. A continuación, la reacción se agitó a 50 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se desactivó con agua, se diluyó con EtOAc y se lavó con K₂CO₃ acuoso al 10%, se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró. El crudo se purificó mediante una columna en gel de sílice (30-70% de EtOAc-hexanos) para obtener (*S*)-(1-hidroxi-3-(3-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de *t*-butilo como un sólido blanco. MS m/z 319,1 (M+Na). Tiempo de retención 1,183 minutos. 1H RMN (600 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,13 - 8,04 (m, 2H), 7,57 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,46 (dd, J = 8,9, 7,6 Hz, 1H), 4,76 (s, 1H), 3,87 (dc, J = 8,0, 4,6, 4,1 Hz, 1H), 3,69 (dd, J = 10,9, 3,9 Hz, 1H), 3,58 (dd, J = 10,8, 4,7 Hz, 1H), 2,97 (td, J = 13,1, 12,5, 7,3 Hz, 2H), 1,37 (s, 9H).

Paso 2: A (*S*)-(1-hidroxi-3-(3-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de *t*-butilo (0,31 g, 1,0 mmol) en acetonitrilo (5 mL) se añadió ácido clorhídrico al 10% (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 48 h y a continuación se concentró para proporcionar (*S*)-2-amino-3-(3-nitrofenil)propan-1-ol en forma de sal de HCl. MS m/z 197,2 (M+H). Tiempo de retención 0,775 min.

Paso 3: La sal de HCl del (*S*)-2-amino-3-(3-nitrofenil)propan-1-ol (0,243 g, 1,046 mmol) se disolvió en MeOH (10 mL) y se añadió un 10% de paladio sobre carbono (50 mg, 0,047 mmol). Se acopló un globo de hidrógeno de 2 L. La reacción se purgó con H₂ tres veces y a continuación se agitó a t.a. durante 1 h. El LCMS indicó que la reacción era completa. La reacción se filtró a través de un lecho de celite y se concentró para proporcionar (*S*)-2-amino-3-(3-aminofenil)propan-1-ol como una sal de HCl. MS m/z 167,2 (M+H). Tiempo de retención 0,373 min.

Paso 4: Se combinaron la sal de HCl del (*S*)-2-amino-3-(3-aminofenil)propan-1-ol (0,212 g, 1,046 mmol) y Boc₂O (228 mg, 1,05 mmol) y dioxano-agua-AcOH (10:9:1, 20mL) y se agitaron a t.a. durante 3 días. El LCMS indicó que la reacción estaba completa en un 75%. Se añadió Boc₂O adicional (150 mg) y la reacción se continuó agitando durante 6 h. A continuación, la mezcla de reacción se concentró y se purificó con HPLC preparativa (10-40% de acetonitrilo en agua con un 0,05% de TFA) para proporcionar (*S*)-(3-(2-amino-3-hidroxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo (**i-4**) como un aceite. MS m/z 267,2 (M+H). Tiempo de retención 1,011 min.

Síntesis de (*S*)-(4-(2-amino-3-hidroxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo (**i-5**)



Paso 1: A ácido (*S*)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-3-(4-nitrofenil)propanoico (0,80 g, 2,58 mmol) en THF (10 mL) se añadió complejo de sulfuro de dimetilo y borano (1,00 mL, 10,5 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó durante 10 min a 0 °C y, a continuación, a t.a. durante 5 h. A continuación, la reacción se desactivó con agua a 0 °C. La mezcla desactivada se repartió entre DCM y Na₂CO₃ acuoso 1 M. La fase de DCM se separó, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para proporcionar (*S*)-(1-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de *t*-butilo como un sólido blanco.

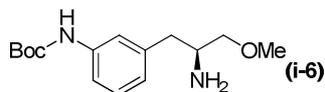
MS m/z 319,1(M+Na). Tiempo de retención 1,031 min. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,10 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,33 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 4,73 (s, 1H), 3,83 (s, 1H), 3,70 - 3,56 (m, 1H), 3,50 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 2,91 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 1,32 (s, 9H).

5 **Paso 2:** Se agitó el (S)-(1-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de *t*-butilo (300 mg, 1,01 mmol) en acetonitrilo (5 mL) y ácido clorhídrico al 10% (5 mL) a t.a. durante 4 h y a continuación se concentró. El residuo se trató con Na₂CO₃ acuoso saturado, y se extrajo con DCM-iPrOH (10:1, 10 mL X3). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron para proporcionar (S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propan-1-ol. MS m/z 197,2 (M+H). Tiempo de retención 0,512 min. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,32 - 7,92 (m, 2H), 7,41 - 7,21 (m, 2H), 4,18 - 4,00 (m, 1H), 3,66 - 3,49 (m, 2H), 3,49-3,36 (m, 1H), 3,25-3,00 (m, 1H), 3,01 - 2,74 (m, 2H), 2,70-2,65 (m, 1H).

15 **Paso 3:** El (S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propan-1-ol (200 mg, 1,019 mmol) se disolvió en MeOH (10 mL) y se añadió un 10% de Pd/C (50 mg). Se acopló un globo de hidrógeno de 2 L. La reacción se purgó con H₂ tres veces y a continuación se agitó a t.a. durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite y, a continuación, se concentró para proporcionar (S)-2-amino-3-(4-aminofenil)propan-1-ol. MS m/z 167,2 (M+H). Tiempo de retención 0,240 min.

20 **Paso 4:** El (S)-2-amino-3-(4-aminofenil)propan-1-ol (168 mg, 1,012 mmol) se disolvió en dioxano (10mL)-agua (9 mL)-AcOH (1 mL) y dicarbonato de *t*-butilo (0,28 g, 1,28 mmol) se combinaron y se agitaron a t.a. durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró entonces y se purificó con ISCO utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-40% de acetonitrilo en agua con un 0,05% de TFA para proporcionar TFA de (S)-(4-(2-amino-3-hidroxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo (**i-5**). MS m/z 267,2 (M+H). Tiempo de retención 0,764 min. ¹H RMN (400 MHz, Acetonitrilo-d₃) δ 7,59 (s, 1H), 7,36 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,16 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,14 (s, 3H), 3,69 (dd, J = 11,7, 3,2 Hz, 1H), 3,57 - 3,36 (m, 2H), 2,86 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 1,47 (s, 9H).

25 Síntesis de (S)-(3-(2-amino-3-metoxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo (**i-6**)



30 **Paso 1:** Se añadió complejo de sulfuro de dimetilo y borano (3,00 mL, 31,6 mmol) a ácido (S)-2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-nitrofenil)propanoico (1,5 g, 4,83 mmol) en THF (10 mL) a 0 °C. La reacción se agitó durante 10 min a 0 °C y, a continuación, a t.a. durante 6 h. A continuación, la reacción se desactivó con agua a 0 °C. La mezcla de reacción desactivada se repartió entre DCM y Na₂CO₃ acuoso 1 M. La fase de DCM se separó, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para proporcionar (S)-(1-hidroxi-3-(3-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de *t*-butilo como un sólido blanco. MS m/z 319,1(M+Na). Tiempo de retención 1,031 min. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,14 - 7,97 (m, 2H), 7,57 (dt, J = 7,7, 1,4 Hz, 1H), 7,46 (dd, J = 8,8, 7,6 Hz, 1H), 4,77 (d, J = 14,5 Hz, 1H), 3,87 (s, 1H), 3,69 (dd, J = 10,9, 3,8 Hz, 1H), 3,58 (dd, J = 10,9, 4,7 Hz, 1H), 2,95 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 1,37 (s, 9H).

40 **Paso 2:** A (S)-(1-hidroxi-3-(3-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de *t*-butilo (0,200 g, 0,675 mmol) en THF/DMF 4:1 (10 mL) a 0°C se añadió NaH (60% en aceite mineral, 0,048 g, 1,2 mmol) lentamente, seguido de yoduro de metilo (0,19 g, 1,3 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 1 h. La reacción se desactivó cuidadosamente mediante la adición lenta de agua hasta que no se observó burbujeo (H₂). El producto crudo se extrajo con EtOAc (10 mL X3). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó con ISCO utilizando una columna C18 y se eluyó con un 30-67% de ACN en agua con un 0,05% de TFA para obtener (S)-(1-metoxi-3-(3-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de *t*-butilo como un sólido blanco. MS m/z 333,1(M+Na). Tiempo de retención 1,205 min. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-d) δ 8,10 (dd, J = 4,5, 2,5 Hz, 2H), 7,59 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,48 (dd, J = 8,8, 7,6 Hz, 1H), 4,96 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 4,07 - 3,88 (m, 1H), 3,43 - 3,28 (m, 5H), 2,98 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,40 (s, 9H).

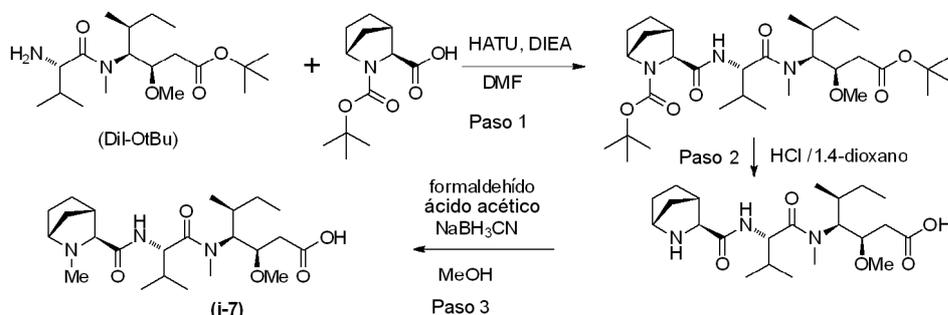
50 **Paso 3:** Se agitó el (S)-(1-metoxi-3-(3-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de *t*-butilo (124 mg, 0,400 mmol) en acetonitrilo (3 mL) y ácido clorhídrico al 10% (3 mL) a t.a. durante 4 h y a continuación se concentró. Se añadió Na₂CO₃ acuoso saturado al residuo y la mezcla resultante se extrajo con DCM-iPrOH (10:1, 10 mL X3). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron para proporcionar (S)-1-metoxi-3-(3-nitrofenil)propan-2-amina. MS m/z 211,2 (M+H). Tiempo de retención 0,622 min.

55 **Paso 4:** La (S)-1-metoxi-3-(3-nitrofenil)propan-2-amina se disolvió en MeOH (10 mL) y se añadió un 10% de Pd/C (50 mg). Se acopló un globo de hidrógeno de 2 L. La reacción se purgó con H₂ tres veces y a continuación se agitó a t.a. durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite y a continuación se concentró para proporcionar (S)-3-(2-amino-3-metoxipropil)anilina. MS m/z 181,2 (M+H). Tiempo de retención 0,282 min.

60 **Paso 5:** La (S)-3-(2-amino-3-metoxipropil)anilina (62,6 mg, 0,347 mmol) en dioxano (3 mL)-agua (3 mL)-AcOH (0,6 mL) y dicarbonato de *t*-butilo (0,093 mL, 0,4 mmol) se combinaron y se agitaron a t.a. durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró entonces y se purificó con ISCO utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-40% de acetonitrilo en agua con un 0,05% de TFA para proporcionar la sal de TFA del (S)-(3-(2-amino-3-

metoxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo (**i-6**). MS m/z 281,2 (M+H). Tiempo de retención 0,856 min. ¹H RMN (400 MHz, Acetonitrilo-d₃) δ 7,61 (s, 1H), 7,40 - 7,12 (m, 3H), 6,89 (dt, J = 7,4, 1,5 Hz, 1H), 6,78 (s, 3H), 3,59 (m, 1H), 3,50 (dd, J = 10,6, 3,4 Hz, 1H), 3,38 (dd, J = 10,6, 6,9 Hz, 1H), 3,33 (s, 3H), 2,90 (d, J=7,5 Hz, 3H), 1,48 (s, 9H).

Síntesis de ácido (3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoico (**i-7**)

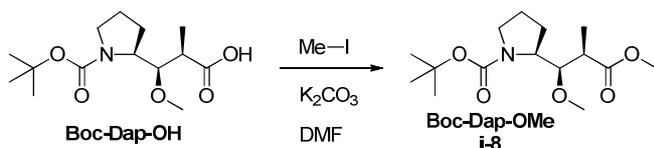


Paso 1: Sal de HCl de Di-OtBu (388 mg, 0,982 mmol), ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*t*-butoxicarbonil)-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (287 mg, 1,19 mmol), HATU (411 mg, 1,08 mmol) y DIEA (0,42 mL, 2,38 mmol) y DMF (5 mL) se combinaron y se agitaron a t.a. durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con agua (10 mL) y se purificó con RP-C18 ISCO para proporcionar (3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoato de *t*-butilo. MS (m+1) = 582,5, TR de pico de HPLC = 1,542 min

Paso 2: El producto obtenido en el paso 1 (540 mg, 0,93 mmol) en HCl 4 M en 1,4-dioxano (10 mL) se agitó a t.a. durante la noche. La mezcla de reacción se concentró en para proporcionar ácido (3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoico. MS (m+1) = 426,2, TR de pico de HPLC = 0,736 min

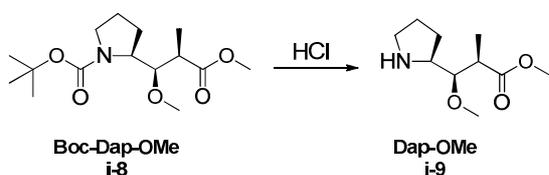
Paso 3: El producto obtenido en el paso 2 (430 mg, 0,93 mmol), solución de formaldehído al 37% (0,38 mL, 4,7 mmol), ácido acético (0,27 mL, 4,65 mmol), NaBH₃CN (585 mg, 9,31 mmol) y MeOH (10 mL) se combinaron y agitaron a t.a. durante 30 min y después se concentraron. El residuo se purificó con RP-C18 ISCO para proporcionar 450 mg de ácido (3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoico como una sal de TFA. La sal de TFA se trató con 10 mL de solución de HCl 12 N y se concentró dos veces para proporcionar la sal de HCl del ácido (3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoico (**i-7**). MS (m+1) = 440,2, TR de pico de HPLC = 0,754 min

Síntesis de Boc-Dap-OMe: ((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1,3-dimetoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidino-1-carboxilato de *tert*-butilo) (**i-8**)



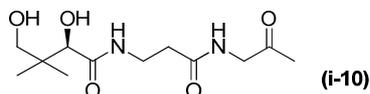
Se combinaron Boc-Dap-OH (Small Molecules Inc., 3,11 g, 10,8 mmol), K₂CO₃ (2,99 g, 21,6 mmol), yodometano (2,95 g) y acetona (55 mL). La reacción se agitó a 20 °C durante 2 h. Se añadió un yoduro de metilo adicional (2,28 g) a la reacción y la reacción se agitó a 40 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se repartió entre 200 mL de EtOAc y 100 mL de H₂O. La fase orgánica se separó, se lavó con 50 mL de NaCl ac. saturado, se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró, lo que proporcionó Boc-Dap-OMe (**i-8**) como un aceite amarillo. MS (ESI+) m/z calc 324,2, encontrado 324,2 (M+23). Tiempo de retención 1,245 min.

Síntesis de Dap-OMe: ((2*R*,3*R*)-3-metoxi-2-metil-3-((*S*)-pirrolidin-2-il)propanoato de metilo) (**i-9**)



Se combinó Boc-Dap-OMe (3,107 g, 10,3 mmol) con HCl en éter dietílico (2 M, 10 mL) y se concentró. Esta operación se repitió. La reacción fue completa después del 7º tratamiento. Se obtuvo la sal de HCl de Dap-OMe (**i-9**) como un sólido blanco después de concentrarla. MS (ESI+) m/z calc 202,1, found 202,2 (M+1). Tiempo de retención 0,486 min. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4,065-4,041 (m, 1H), 3,732 (a.s, 1H), 3,706 (s, 3H), 3,615 (s, 3H), 3,368 (a.s, 1H), 3,314 (a.s, 1H), 2,795 (c, 1H, J=6,8Hz), 2,085-1,900 (m, 4H), 1,287 (d, 3H, J=7,2Hz).

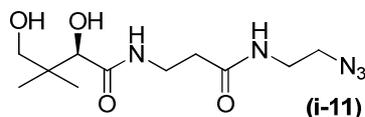
Síntesis de (*R*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-oxo-3-((2-oxopropil)amino)propil)butanamida (**i-10**)



Paso 1: Se disolvió ácido pantoteico (50 mg, 0,23 mmol) en DMF (5 mL) y se añadieron azida de difenilfosforilo (98 µL, 0,46 mmol) y 2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)etanamina (40 mg, 0,34 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se añadió trietilamina (79 µL, 0,57 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 min, y a continuación se agitó a t.a. durante 24 h. Se añadió EtOAc (50 mL) y se lavó con solución de HCl 0,1 N (20 mL), solución de NaOH 0,1 N (20 mL), salmuera (20 mL), se secó con Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante HPLC y se liofilizó para proporcionar (*R*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-((2-metil-1,3-dioxolan-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)butanamida. MS (m+1) = 319,2, TR de pico de HPLC = 0,466 min

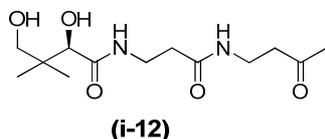
Paso 2: La (*R*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-((2-metil-1,3-dioxolan-2-il)metil)amino)-3-oxopropil)butanamida (46 mg, 0,14 mmol) se disolvió en THF (5 mL) y solución de HCl 3N (3mL) y se agitó a t.a. durante 4 h. Después de enfriar hasta 0 °C, la mezcla de reacción se neutralizó con solución de NaOH 1 N y se concentró a la mitad del volumen al vacío. La mezcla de reacción se purificó con ISCO RP-C18 y se liofilizó para proporcionar (*R*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-oxo-3-((2-oxopropil)amino)propil)butanamida (**i-10**). MS (m+1) = 275,2, TR de pico de HPLC = 0,337 min, ¹H-RMN (MeOD, 400 MHz) δ 3,99 (s, 2H), 3,84 (s, 1H), 3,42~4,47 (m, 2H), 3,42 (d, 1H, J = 11,2 Hz), 3,34 (d, 1H, J = 11,2 Hz), 2,45 (t, 2H, J = 6,8 Hz), 2,10 (s, 3H), 0,87 (s, 6H).

Síntesis de (*R*)-*N*-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oxopropil)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanamida (**i-11**)



Se disolvió ácido pantoteico (50 mg, 0,23 mmol) en DMF (5 mL) y se añadieron azida de difenilfosforilo (98 µL, 0,46 mmol) y 2-azidoetanamina (30 mg, 0,34 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se añadió trietilamina (79 µL, 0,57 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 min, y a continuación se agitó a t.a. durante 24 h. Se añadió EtOAc (50 mL) y se lavó con solución de HCl 0,1 N (20 mL), solución de NaOH 0,1 N (20 mL), salmuera (20 mL), se secó con Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante HPLC y se liofilizó para proporcionar (*R*)-*N*-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oxopropil)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanamida (**i-11**). MS (m+1) = 288,2, TR de pico de HPLC = 0,504 min, ¹H-RMN (MeOD, 400 MHz) δ 3,84 (s, 1H), 3,41~4,47 (m, 3H), 3,31~3,35 (m, 5H), 2,40 (t, 2H, J = 6,8 Hz), 0,87 (s, 6H).

Síntesis de (*R*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-oxo-3-((3-oxobutil)amino)propil)butanamida (**i-12**)

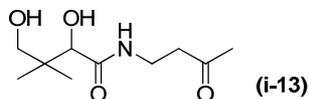


Paso 1: Se disolvió sal hemicálcica del ácido pantoteico (100 mg, 0,390 mmol) en CH₃CN (10 mL) y se intercambió por ácido pantoteico utilizando una resina de ácido sulfúrico. Se disolvió ácido pantoteico (10 mg, 0,046 mmol) en DMF (2 mL) y se añadieron azida de difenilfosforilo (20 µL, 0,091 mmol) y 2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)etanamina (7 mg, 0,005 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y se añadió trietilamina (16 µL, 0,114 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 min, y a continuación se agitó a t.a. durante 24 h. Se añadió EtOAc (50 mL) y se lavó con solución de HCl 0,1 N (20 mL), solución de NaOH 0,1 N (20 mL), salmuera (20 mL), se secó con Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante HPLC y se liofilizó para proporcionar (*R*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-((2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)etil)amino)-3-oxopropil)butanamida. MS (m+1) = 333,2, TR de pico de HPLC = 0,512 min

Paso 2: La (*R*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-((2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)etil)amino)-3-oxopropil)butanamida (6 mg, 0,018 mmol) se disolvió en THF (2 mL) y solución de HCl 3N (1mL) y se agitó a t.a. durante 4 h. Después de enfriar hasta 0 °C, la mezcla de reacción se neutralizó con solución de NaOH 1 N y se concentró a la mitad del volumen al

vacío. La mezcla de reacción se purificó con ISCO RP-C18 y se liofilizó para proporcionar (*R*)-2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-oxo-3-((3-oxobutil)amino)propil)butanamida (**i-12**). MS (*m*+1) = 289,2, TR de pico de HPLC = 0,362 min, 1H-RMN (MeOD, 400 MHz) δ 3,83 (s, 1H), 3,37~4,45 (m, 3H), 3,34 (d, 2H, *J* = 7,2 Hz), 3,32 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz), 2,65 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz), 2,34 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz), 2,10 (s, 3H), 0,87 (s, 6H).

5 Síntesis de 2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-oxobutil)butanamida (**i-13**)



10 **Paso 1:** Se disolvió hidruro de litio y aluminio (583 mg, 15 mmol) en THF (100 mL) y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió una solución de (±)-pantolactona (1g, 8 mmol) en THF (50 mL) a 0 °C y se agitó a t.a. durante 4h. Se añadió a la mezcla de reacción sulfato sódico anhidro lentamente, seguido de EtOAc (50 mL). La mezcla de reacción se filtró sobre un lecho corto de celite y el filtrado se concentró. El residuo se purificó con ISCO (de un 5% a un 20% de MeOH en CH₂Cl₂) para proporcionar 3,3-dimetilbutano-1,2,4-triol. 1H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 3,71~3,74 (m, 1H), 3,65 (dd, 1H, *J* = 4,8 y 7,6 Hz), 3,57 (dd, 1H, *J* = 2,4 y 4,8 Hz), 3,54 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 3,48 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 0,95 (s, 3H), 0,93 (s, 3H).

15 **Paso 2:** Se disolvió 3,3-dimetilbutano-1,2,4-triol (570 mg, 4 mmol) y 1-(dimetoximetil)-4-metoxibenceno (1,16 g, 6 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL) y se añadió ácido (7,7-dimetil-2-oxobicyclo[2.2.1]heptan-1-il)metanosulfónico (99 mg, 0,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2 h y se añadió trietilamina (0,29 mL, 2 mmol). Después de la concentración, el residuo se purificó con ISCO (de un 0% a un 30% de EtOAc en *n*-hexano) para proporcionar 2-(4-metoxifenil)-5,5-dimetil-1,3-dioxan-4-il)metanol. 1H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,44 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 6,91 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 5,47 (s, 1H), 3,90 (s, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,59~3,70 (m, 5H), 1,14 (s, 3H), 0,84 (s, 3H).

20 **Paso 3:** Se disolvió DMSO (0,27 mL, 4 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (20 mL) y se añadió cloruro de oxalilo (0,25 mL, 3 mmol) a -78 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 15 min a -78 °C y se añadió lentamente una solución de 2-(4-metoxifenil)-5,5-dimetil-1,3-dioxan-4-il)metanol (485 mg, 2 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 30 min y se añadió trietilamina (1,34 mL, 10 mmol). Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta t.a. y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se repartió entre agua (50 mL) y CH₂Cl₂ (100 mL), y la fase orgánica se lavó con NaHCO₃ sat. (50 mL) y salmuera (50 mL), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó con ISCO (de un 20% a un 50% de EtOAc en *n*-hexano) para proporcionar 2-(4-metoxifenil)-5,5-dimetil-1,3-dioxano-4-carbaldehído. MS (*m*+1) = 251,2, TR de pico de HPLC = 1,105 min.

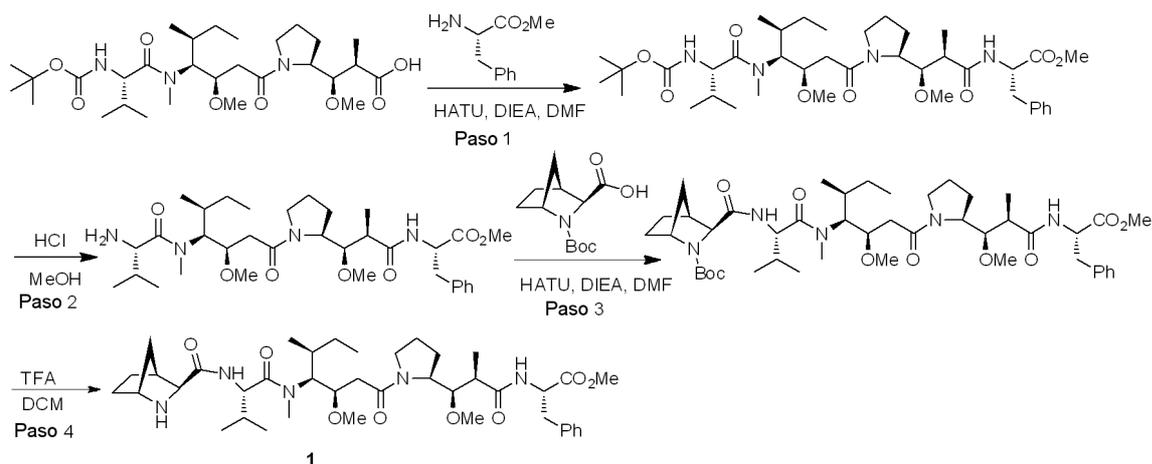
25 **Paso 4:** Se disolvió 2-(4-metoxifenil)-5,5-dimetil-1,3-dioxano-4-carbaldehído (289 mg, 1 mmol) en acetona/CH₂Cl₂ (3:1, 20 mL) y se añadió una solución recién preparada de NaH₂PO₄·H₂O (1593 mg, 12 mmol) y NaCl₂O (528 mg, 6 mmol) en agua (5 mL) a t.a. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a t.a. y se concentró. El residuo se purificó con ISCO (C18) para proporcionar ácido 2-(4-metoxifenil)-5,5-dimetil-1,3-dioxano-4-carboxílico. MS (*m*+1) = 267,2, TR de pico de HPLC = 0,957 min.

30 **Paso 5:** Se disolvió ácido 2-(4-metoxifenil)-5,5-dimetil-1,3-dioxano-4-carboxílico (40 mg, 0,2 mmol) en DMF (3 mL) y se añadieron HATU (39 mg, 0,2 mmol) y DIEA (0,05 mL, 0,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 min a t.a. y se añadió 2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)etanamina (40 mg, 0,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar 2-(4-metoxifenil)-5,5-dimetil-*N*-(2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)etil)-1,3-dioxano-4-carboxamida. MS (*m*+1) = 380,2, TR de pico de HPLC = 1,102 min, 1H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,44 (d, 2H, *J* = 5,6 Hz), 7,33 (s, 1H), 6,90 (d, 2H, *J* = 5,2 Hz), 5,46 (s, 1H), 4,08 (s, 1H), 3,82~3,88 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,75 (m, 1H), 3,68 (dd, 2H, *J* = 7,6 y 16,0 Hz), 3,38 (m, 2H), 1,86 (m, 4H), 1,31 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), 1,09 (s, 3H).

35 **Paso 6:** Se disolvió 2-(4-metoxifenil)-5,5-dimetil-*N*-(2-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)etil)-1,3-dioxano-4-carboxamida (10 mg, 0,03 mmol) en HCl 3 M en MeOH (1 mL) y se añadió agua (0,1 mL). La mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó con ISCO (C18) para proporcionar 2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-*N*-(3-oxobutil)butanamida (**i-13**). MS (*m*+1) = 218,2, TR de pico de HPLC = 0,400 min, 1H-RMN (MeOD-*d*₄, 400 MHz) δ 3,84 (s, 1H), 3,31~3,44 (m, 4H), 2,70 (t, 2H, *J* = 4,0 Hz), 2,12 (s, 3H), 0,88 (s, 3H).

Procedimiento sintético para los péptidos no conectados

40 **Ejemplo 1:** (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (**1**)



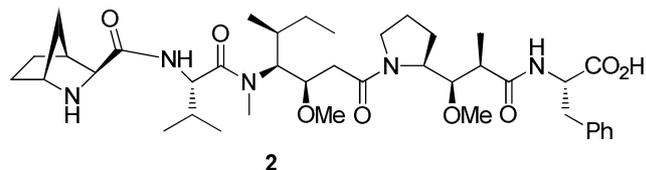
Paso 1: A una solución de BocVal-Dil-Dap-OH (1,00 g, 1,75 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (DMF, 20,0 mL) a 0°C se añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA, 0,677 g, 5,25 mmol) y hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio-3-óxido (HATU)(0,731 g, 1,93 mmol). A continuación, la solución resultante se agitó durante 5 minutos y se añadió a una solución de sal de HCl del éster metílico de L-fenilalanina (0,377 g, 1,75 mmol) y DIEA (0,226 g, 1,75 mmol) en DMF (5,0 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente, se agitó durante 30 minutos adicionales y después se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando el sistema ISCO, columna C18, se eluyó con un 20-90% de acetonitrilo-agua para obtener BocVal-Dil-Dap-PheOMe: MS *m/z* 733,4 (M+1); tiempo de retención 1,47 minutos.

Paso 2: A una solución de BocVal-Dil-Dap-PheOMe (0,683 g, 0,932 mmol) obtenida en el paso 1 en metanol (20 mL) se añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 16 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas y se concentró. El residuo se disolvió en dioxano y se liofilizó para obtener la sal de HCl de Val-Dil-Dap-PheOMe: MS *m/z* 633,4 (M+1); tiempo de retención 0,96 minutos.

Paso 3: Se disolvió ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-boc-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (12,6 mg, 0,052 mmol) en DMF (1 mL) en un matraz de fondo redondo de 15 mL. Se añadieron DIEA (12,3 mg, 0,095 mmol) y HATU (19 mg, 0,050 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos y se añadió la sal de HCl de Val-Dil-Dap-PheOMe (30 mg, 0,090 mmol) en DMF (1,0 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. El análisis LCMS indicó que la reacción estaba completa. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18, se eluyó con un 20-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-(((*S*)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoyl)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo: MS *m/z* 856,6 (M+1); tiempo de retención 1,67 minutos.

Paso 4: El producto obtenido en el paso 3 se disolvió en diclorometano (DCM) (2,0 mL) y se trató con TFA (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El análisis LCMS mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró con un evaporador rotatorio para proporcionar el compuesto **1** como una sal de TFA: MS *m/z* 756,6 (M+1); tiempo de retención 1,22 minutos.

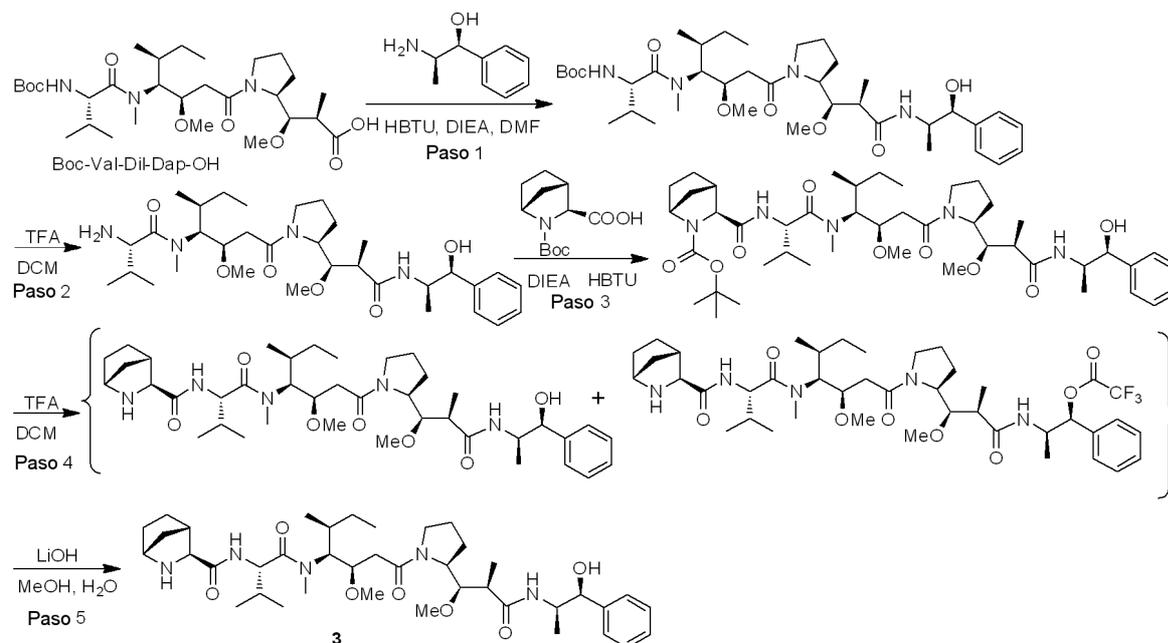
Ejemplo 2: Ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.2]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**)



En un matraz de fondo redondo de 25 mL se añadieron la sal de TFA del (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (**1**) (38,4 mg, 0,044 mmol), LiOH monohidratado (50,0 mg, 1,19 mmol) y una mezcla de disolventes de MeOH-H₂O (2:1, 4,0 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. El análisis LC-MS indicó que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con acetonitrilo-H₂O (10-70%) que contenía un 0,05% de TFA.

Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto **2** como una sal de TFA, MS m/z 742,5 (M+1). Tiempo de retención 1,15 minutos.

- 5 **Ejemplo 3:** (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**3**)



- 10 **Paso 1:** A una solución de Boc-Val-Dil-Dap-OH (20,0 mg, 0,035 mmol) en DMF (1,0 mL) en un matraz de fondo redondo de 15 mL se añadió DIEA (9,0 mg, 0,070 mmol), seguida de hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)uronio (HBTU) (13,3 mg, 0,035 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos antes de añadir (1*S*,2*R*)-2-amino-1-fenilpropan-1-ol (6,4 mg, 0,042 mmol) en DMF (1,0 mL) a la mezcla de reacción. La reacción se agitó durante 1 hora. El análisis LCMS indicó que la reacción estaba completa. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-70% de acetonitrilo- H_2O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener ((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *tert*-butilo, MS m/z 705,4 (M+1). Tiempo de retención 1,39 minutos.

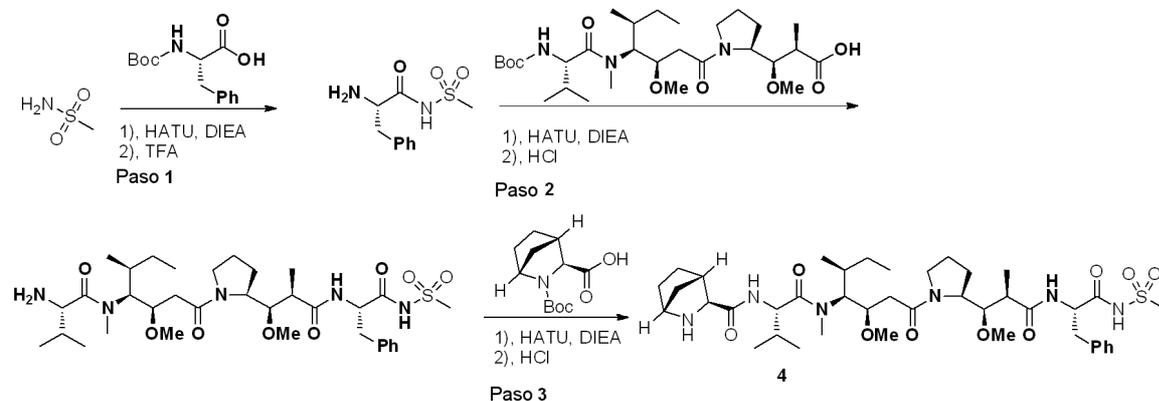
- 15 **Paso 2:** A una solución de ((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *tert*-butilo (24,7 mg, 0,035 mmol) en DCM (2,0 mL) se añadió TFA (1,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró para obtener una mezcla de (*S*)-2-amino-*N*-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-*N*,3-dimetilbutanamida (MS m/z 605,4 (M+1) Tiempo de retención 0,96 minutos y el éster de TFA de este (MS m/z 701,4 (M+1)), Tiempo de retención 1,17 minutos. La mezcla se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

- 20 **Paso 3:** A una solución de ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (8,4 mg, 0,035 mmol) en DMF (1,0 mL) se añadieron DIEA (0,024 ml, 0,14 mmol) y HBTU (13,3 mg, 0,035 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos y se añadió a una solución de la mezcla de productos obtenida en el paso 2 (25,2 mg, 0,035 mmol) (que contenía el éster de TFA) en DMF (0,5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 18 horas y a continuación el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 30-90% de acetonitrilo- H_2O , que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían los productos deseados se concentraron para obtener una mezcla de (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *tert*-butilo (MS m/z 828,5 (M+1)) Tiempo de retención 1,42 minutos y el éster de TFA de este (MS m/z 924,4 (M+1)) Tiempo de retención 1,61 minutos.

Paso 4: A una solución de la mezcla obtenida en el paso 3 en DCM (1,5 mL) se añadió TFA (1,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se concentró para obtener una mezcla de (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (MS *m/z* 728,4 (M+1)), tiempo de retención 0,99 minutos y 2,2,2-trifluoroacetato de (1*S*,2*R*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropilo (MS *m/z* 824,5 (M+1)), tiempo de retención 1,31 minutos. Esta mezcla se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

Paso 5: A una solución de la mezcla obtenida en el paso 4 en MeOH-H₂O (1:1, 3,0 mL) se añadió LiOH (10,0 mg, 0,418 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y, a continuación, se concentró hasta un volumen total de aproximadamente 1 mL. La mezcla cruda se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-35% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener el compuesto **3**, MS *m/z* 728,4 (M+1). Tiempo de retención 0,99 minutos.

Ejemplo 4: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-*N*-1-(metilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**4**)



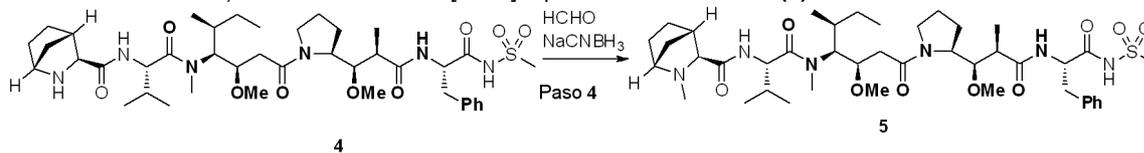
Paso 1: Se disolvió ácido (*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (132,5 mg, 0,50 mmol) en DMF (4 mL). Se añadieron DIEA (0,523 mL, 3,0 mmol) y HATU (475 mg, 1,25 mmol). Después de 15 minutos, se añadió metanosulfonamida (143 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. El producto se purificó mediante Prep-HPLC, columna C18, se eluyó con un 20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener un sólido blanco. MS *m/z* 243,1 (M+1). Tiempo de retención 1,023 minutos. El producto se disolvió en DCM (2 mL). Se añadió TFA (2 mL) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El análisis LC/MS indicó que la reacción estaba completa. El producto desprotegido también se purificó mediante Prep-HPLC, se eluyó con un 10-40% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener un sólido blanco. MS *m/z* 243,1 (M+1). Tiempo de retención 0,403 minutos. RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,41-7,30 (m, 5H), 4,10-4,06 (m, 1H), 3,32-3,25 (m, 1H), 3,19 (s, 3H), 3,12-3,07 (m, 1H).

Paso 2: Se disolvió Boc-Val-Dil-Dap (65,5 mg, 0,115 mmol) en DMF (2mL). Se añadieron DIEA (59,2 mg, 80 μL) y HATU (27,7 mg, 0,099 mmol). Después de 10 minutos, se añadió (*S*)-2-amino-*N*-(metilsulfonil)-3-fenilpropanamida (18,5 mg, 0,076 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. El producto se purificó mediante Prep-HPLC, columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener un sólido blanco. MS *m/z* 796,4 (M+1). Tiempo de retención 1,388 minutos. El producto se disolvió en HCl en MeOH (3 M, 3 mL). El disolvente se eliminó lentamente. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. MS *m/z* 696,3 (M+1). Tiempo de retención 1,046 minutos.

Paso 3: Se disolvió ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)-2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (14,23 mg, 0,059 mmol) en DMF (2mL). Se añadieron DIEA (22,9 mg, 0,177 mmol) y HATU (20,19 mg, 0,053 mmol). Después de 10 minutos, se añadió el producto del paso previo (21,6 mg, 0,029 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. El producto se purificó mediante Prep-HPLC, columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener un sólido blanco. MS *m/z* 919,5 (M+1). Tiempo de retención 1,370 minutos. El producto se disolvió en HCl en MeOH (3 M, 3 mL). El disolvente

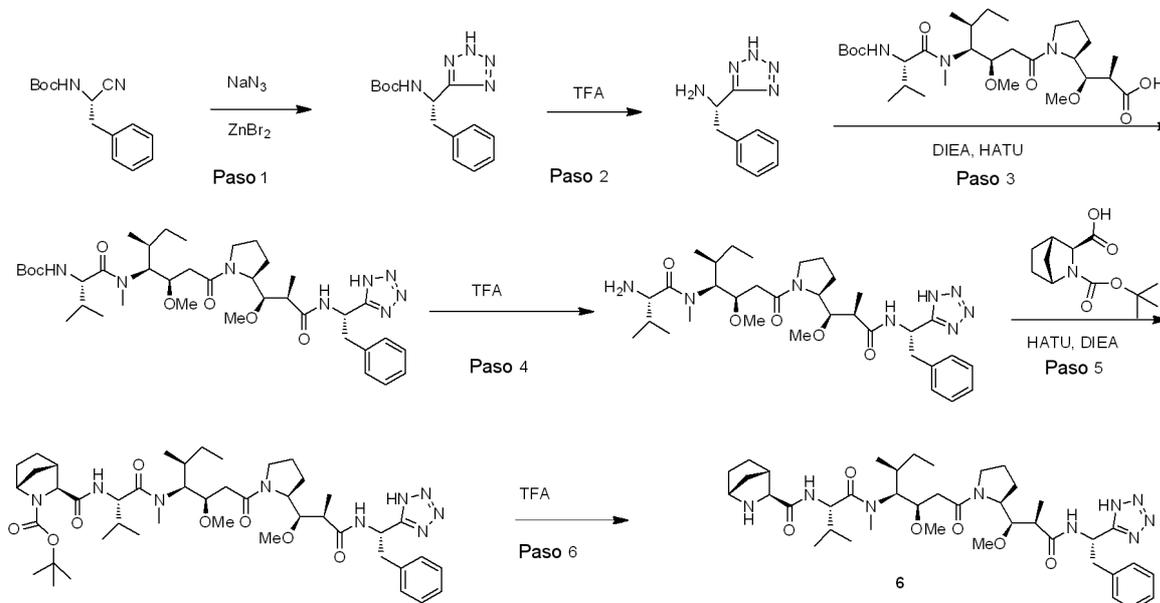
se eliminó lentamente. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. MS m/z 819,5 (M+1). Tiempo de retención 1,096 minutos.

Ejemplo 5: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-*N*-1-(metilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**5**)



El compuesto **4** (5 mg, 0,00584 mmol) se disolvió en MeOH (2,0 mL). Se añadieron paraformaldehído (5,97 mg, 0,199 mmol) y ácido acético (6,0 μ L). Se añadió cianoborohidruro sódico (12,5 mg, 0,199 mmol) y la mezcla de reacción se calentó hasta 50 °C y se agitó durante 1 hora. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. El producto se purificó mediante Prep-HPLC, columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo- H_2O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener un sólido blanco. MS m/z 833,5 (M+1). Tiempo de retención 0,983 minutos.

Ejemplo 6: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**6**)



Paso 1: Se disolvieron *N*-Boc-aminonitrilo (0,5 g, 2,03 mmol), azida sódica (0,264 g, 4,06 mmol) y bromuro de zinc (0,229 g, 1,02 mmol) en una mezcla de disolventes 2-propanol-agua (1:1, 60 mL) y la mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 16 horas. Después de que la reacción se completase, se añadieron 5 mL de ácido cítrico al 10% y 30 mL de acetato de etilo y la agitación se continuó hasta que no quedó sólido. La fase acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con agua y se secó con Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se eliminó y el residuo se purificó mediante columna en gel de sílice, se eluyó con metanol al 10% en DCM. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron, se redisolviaron en acetato de etilo, se lavaron con salmuera, se secaron y se concentraron para proporcionar (*S*)-2-fenil-1-(2*H*-tetrazol-5-il)etil)carbamato de *tert*-butilo MS m/z 290,2 (M+1). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,40 - 7,24 (m, 3H), 7,22 - 7,12 (m, 2H), 5,22 - 5,02 (m, 2H), 3,49 - 3,24 (m, 2H), 1,40 (s, 9H).

Paso 2: En un matraz de fondo redondo de 15 mL se añadió (*S*)-2-fenil-1-(2*H*-tetrazol-5-il)etil)carbamato de *tert*-butilo (30 mg, 0,104 mmol), TFA (2 mL) y DCM (4 mL) para proporcionar una solución transparente que se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El LCMS mostró que el grupo Boc se había escindido. La solución se concentró para obtener (*S*)-2-fenil-1-(2*H*-tetrazol-5-il)etanamina crudo en forma de sal de TFA (M+1 190,2), que se utilizó sin purificación adicional en el siguiente paso.

Paso 3: En un matraz de fondo redondo de 15 mL se añadió Boc-Val-Dil-Dap-OH (59,3 mg, 0,104 mmol) y DIEA (0,072 mL, 0,415 mmol) en DMF (2 mL) proporciona una solución transparente. Se añadió HATU (43,4 mg, 0,114 mmol) y la mezcla de reacción se agitó entonces durante 5 minutos y a continuación se añadió la sal de TFA de (*S*)-2-fenil-

1-(2*H*-tetrazol-5-il)etanamina obtenida en el paso 2 (0,104 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 10-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener

5 ((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *tert*-butilo MS *m/z* 743,5 (M+1). Tiempo de retención 1,325 minutos.

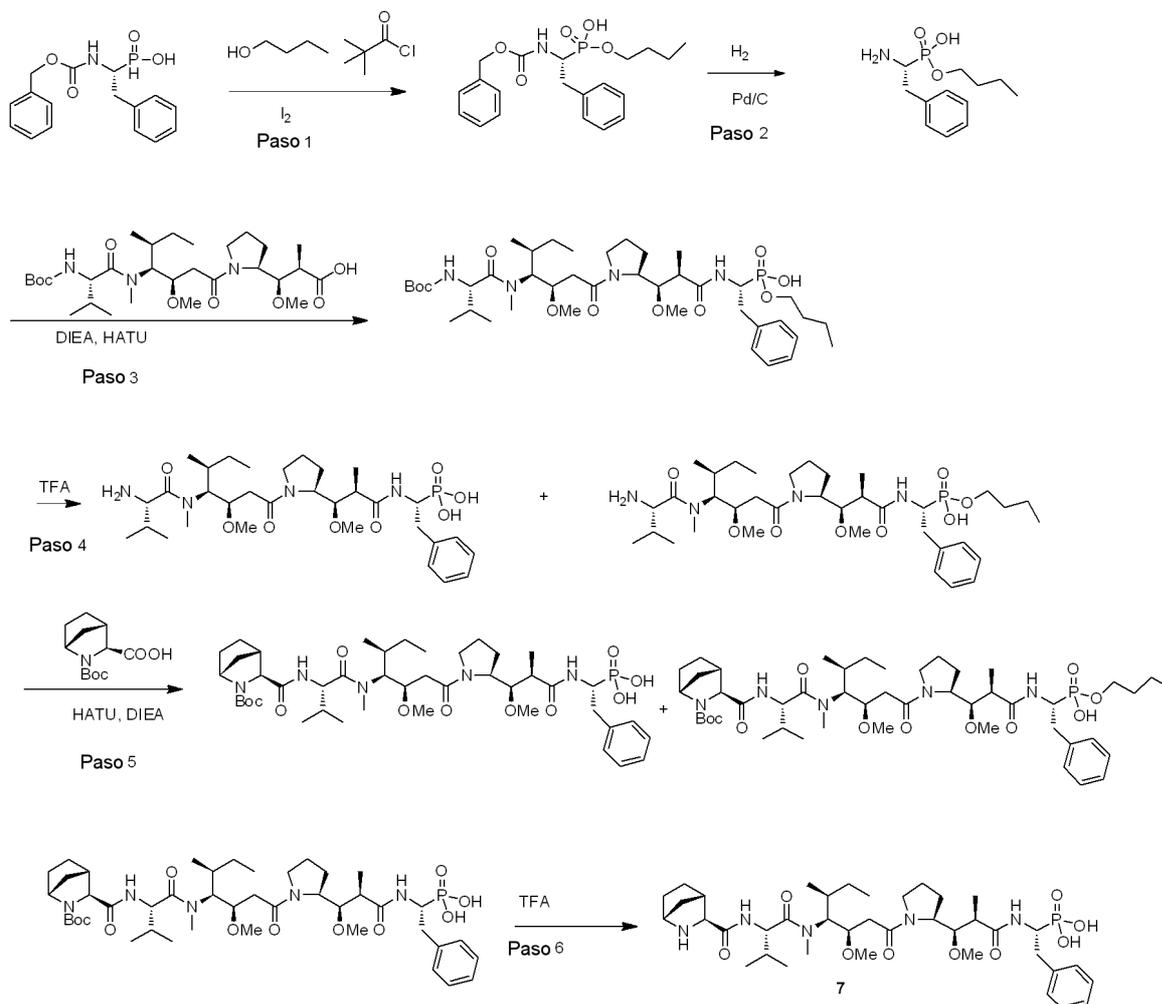
Paso 4: En un matraz de fondo redondo de 15 mL se añadió ((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *tert*-butilo (46 mg, 0,056mmol), TFA (2 mL) y DCM (4 mL) para proporcionar una solución transparente que se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El LCMS mostró que el grupo Boc se había escindido. La solución se concentró para obtener la sal de TFA de (*S*)-2-amino-*N*-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-*N*,3-dimetilbutanamida cruda. MS *m/z* 643,5 (M+1). Tiempo de retención 0,947 minutos, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

15 **Paso 5:** A una solución de ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (7,6 mg, 0,032 mmol) en DMF (1 mL) se añadió DIEA (0,014 mL, 0,079 mmol) y HATU (12 mg, 0,032 mmol), que a continuación se añadió a una solución de la sal de TFA de (*S*)-2-amino-*N*-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-*N*,3-dimetilbutanamida (20 mg, 0,026 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 30-70% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo como sal de TFA MS *m/z* 866,6 (M+1). Tiempo de retención 1,407 minutos.

20 **Paso 6:** A una solución de la sal de TFA de (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo (10,2 mg, 0,012 mmol) en DCM (2 mL) se añadió TFA (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se concentró para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**6**) como sal de TFA. MS *m/z* 766,6 (M+1). Tiempo de retención 0,985 minutos.

35 **Ejemplo 7:** Ácido (*R*)-1-((-2*R*,3*R*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico. (**7**)

40



Paso 1: El ácido ((*R*)-1-((benciloxi)carbonil)amino)-2-feniletilfosfónico (100 mg, 0,313 mmol), (sintetizado por el siguiente procedimiento descrito en *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1984, 2845) se disolvió en piridina (5 mL) y se añadió *n*-BuOH (35 mg, 0,46 mmol), seguido de cloruro de pivaloilo (70 mg, 0,58 mmol). El LCMS indicó que la reacción estaba incompleta, por lo tanto, se añadieron tres porciones más de *n*-BuOH y cloruro de pivaloilo hasta que se consumió todo el ácido fosfónico. A continuación, se añadió una solución de yodo (160 mg, 0,630 mmol) en 2 mL de piridina-H₂O (10% de agua) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos. El LCMS mostró que la reacción estaba completa. La piridina se eliminó al vacío. Se añadió solución de tiosulfato acuosa y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. A continuación, la fase de EtOAc se secó, se concentró y se purificó con ISCO (columna C18 de 5,5 g), se eluyó con un 10%-60% de acetonitrilo en agua con un 0,5% de TFA para obtener ((*1R*)-1-(butoxi(hidroxi)fosforil)-2-feniletil)carbamato de bencilo como un sólido blanco. MS *m/z* 392,1 (*M*+1). Tiempo de retención 1,179 minutos. ¹H RMN (400 MHz, CD₃CN) δ 7,42 - 7,18 (m, 8H), 7,18 - 7,00 (m, 2H), 6,10 (s, 1H), 5,07 - 4,59 (m, 2H), 4,20-4,35 (m, 1H), 4,13 - 3,93 (m, 2H), 3,15-3,30 (m, 1H), 2,85-2,75 (s, 1H), 1,71 - 1,47 (m, 2H), 1,47 - 1,23 (m, 2H), 0,89 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Paso 2: A una solución de ((*1R*)-1-(butoxi(hidroxi)fosforil)-2-feniletil)carbamato de bencilo (84,7 mg, 0,216 mmol) en MeOH (5 mL) se añadió un 10% de Pd/C (26 mg). Se acopló un globo de hidrógeno y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de Celite, y los filtrados se evaporaron hasta sequedad para proporcionar ((*R*)-1-amino-2-feniletil)fosfonato de hidrógeno y butilo. MS *m/z* 258,1 (*M*+1). Tiempo de retención 0,789 minutos, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación.

Paso 3: En un matraz de fondo redondo de 15 mL se añadió Boc-Val-Dip-Dap-OH (80 mg, 0,140 mmol) y DIEA (62,9 mg, 0,487 mmol) en DMF (2 mL) para obtener una solución transparente. Se añadió HATU (53 mg, 0,139 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y a continuación se añadió ((*R*)-1-amino-2-feniletil)fosfonato de hidrógeno y butilo (41,9 mg, 0,163 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 40-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener ((*2S*)-1-(((*3R,4S,5S*)-1-(*2S*)-2-((*1R,2R*)-3-(((*1R*)-1-(butoxi(hidroxi)fosforil)-2-feniletil)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-

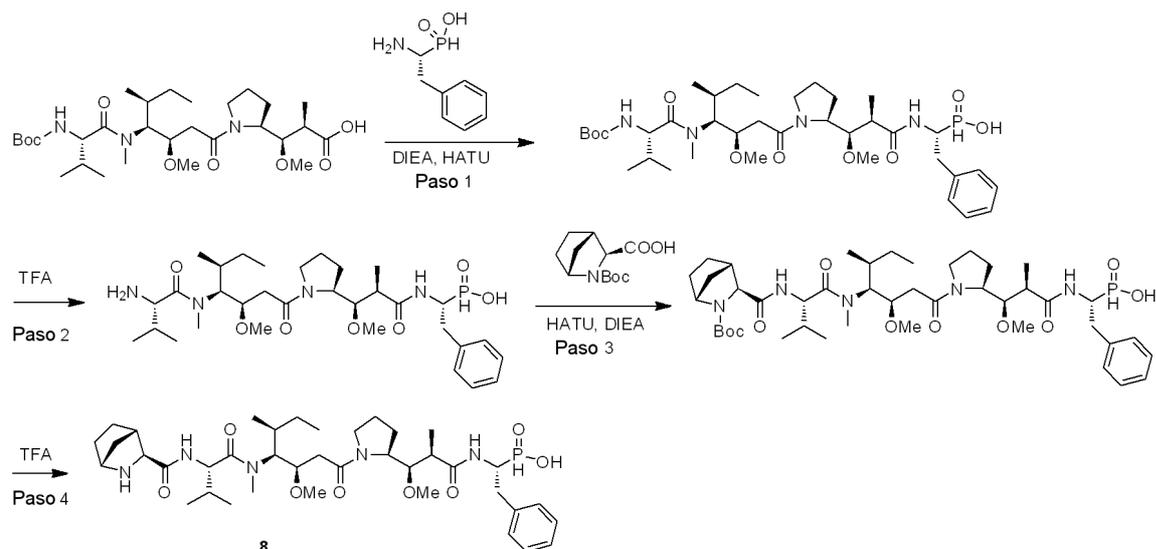
metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *tert*-butilo. MS m/z 811,4 (M+1). Tiempo de retención 1,376 minutos.

Paso 4: A una solución de ((2*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((2*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*R*)-1-(butoxi(hidroxi)fosforil)-2-feniletil)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *tert*-butilo (106 mg, 0,131 mmol) en DCM (3 mL) se añadió TFA (1 mL), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se concentró. Aproximadamente 2/3 se convirtieron al ácido fosfónico ácido (1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico. MS m/z 655,3 (M+1). Tiempo de retención 0,957 minutos. El otro 1/3 era (1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfonato de hidrógeno y butilo. MS m/z 711,4 (M+1). Tiempo de retención 1,038 minutos. La mezcla se utilizó en el paso siguiente sin separación.

Paso 5: A una solución de ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (3,8 mg, 0,016 mmol) en DMF (1 mL) se añadió DIEA (6,1 mg, 0,047 mmol) y después HATU (5,9 mg, 0,016 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y a continuación se añadió a una mezcla de la amina del paso 4 (12 mg, 0,016 mmol) que contenía principalmente el ácido fosfónico. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El crudo se purificó con ISCO utilizando una columna C18, 4,5 g, se eluyó con un 10-70% de acetonitrilo en agua con un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico MS m/z 878,5 (M+1). Tiempo de retención 1,307 minutos, y (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((2*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((2*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*R*)-1-(butoxi(hidroxi)fosforil)-2-feniletil)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo MS m/z 934,5 (M+1). Tiempo de retención 1,447 minutos.

Paso 6: A una solución de ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico (11,0 mg, 0,012 mmol) en DCM (2 mL) se añadió TFA (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se concentró para obtener ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico (**7**). MS m/z 778,4 (M+1). Tiempo de retención 0,973 minutos.

Ejemplo 8: Ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico (**8**)



Paso 1: En un matraz de fondo redondo de 15 mL se añadió Boc-Val-Dip-Dap-OH (50 mg, 0,087 mmol) y DIEA (33,9 mg, 0,262 mmol) en DMF (2 mL) para obtener una solución transparente. Se añadió HATU (33,3 mg, 0,087 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y a continuación se añadió a ácido ((*R*)-1-amino-2-feniletil)fosfónico (41 mg, 0,154 mmol), (sintetizado siguiendo el procedimiento descrito en *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1984, 2845). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El LCMS indicó la formación del producto deseado. El

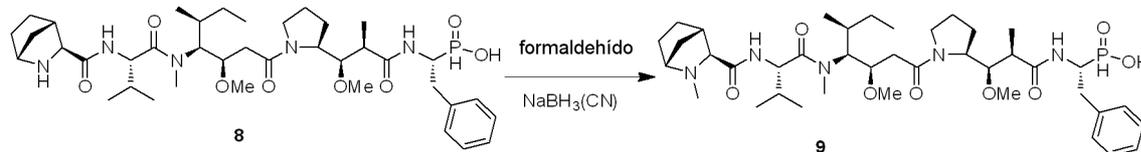
crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 30-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico. MS *m/z* 739,4 (*M*+1). Tiempo de retención 1,248 minutos.

Paso 2: A una solución de ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (69,1 mg, 0,094 mmol) en DCM (2 mL) se añadió TFA (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se concentró para obtener ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (MS *m/z* 639,3 (*M*+1); tiempo de retención 0,851 minutos) que se utilizó sin purificación adicional en el paso siguiente.

Paso 3: A una solución de ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (11,3 mg, 0,047 mmol) en DMF (1 mL) se añadió DIEA (0,033 mL, 0,188 mmol), seguido de HATU (17,9 mg, 0,047 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos y a continuación se añadió a una solución de ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (35,4 mg, 0,047 mmol) en DMF (1 mL). El LCMS indicó que la reacción se completó en 10 minutos. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 30-55% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico. MS *m/z* 862,5 (*M*+1). Tiempo de retención 1,372 minutos.

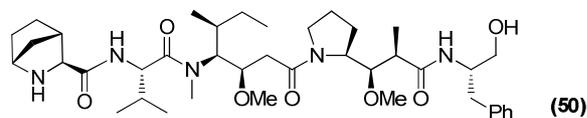
Paso 4: A una solución de ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (60 mg, 0,070 mmol) en DCM (2 mL) se añadió TFA (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se concentró para proporcionar ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (**8**). MS *m/z* 762,5 (*M*+1). Tiempo de retención 1,220 minutos.

Ejemplo 9: Ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (**9**)



A una solución de ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (**8**) (20 mg, 0,023 mmol) en MeOH (2 mL) se añadió paraformaldehído (10 mg, 0,33 mmol) y ácido acético (0,019 mL, 0,333 mmol), seguido de cianoborohidruro sódico (20 mg, 0,32 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 1 hora y después a temperatura ambiente durante 2 días. El LCMS mostró que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite para eliminar el residuo insoluble y el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 10-50% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (**9**). MS *m/z* 776,4 (*M*+1). Tiempo de retención 0,944 minutos.

Ejemplo 10: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**50**)

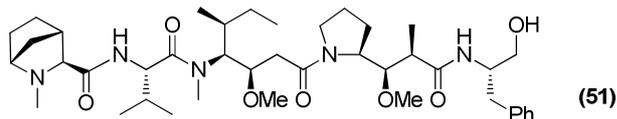


Paso 1: Se añadieron DIEA (0,013 mL, 0,075 mmol) y HATU (18,5 mg, 0,049 mmol) a ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (9,8 mg, 0,040 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 5 min y después se añadió a Val-Dil-Dap-OH (17,7 mg, 0,038 mmol) en DMF. La reacción se agitó a t.a. durante 16 h. A continuación, el crudo se purificó mediante HPLC preparativa (30-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*t*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico. MS m/z 695,4 (M+H). Tiempo de retención 1,376 min.

Paso 2: Al producto obtenido en el paso 1 (5,9 mg, 0,008 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron DIEA (1,1 mg, 0,008 mmol) y HATU (3,8 mg, 0,010 mmol). Después de agitar la reacción durante 5 min, se añadió (*S*)-2-(*S*)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol (1,9 mg, 0,013 mmol) en DMF. La reacción se agitó a t.a. durante 1 h. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (20-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *t*-butilo. MS m/z 828,5 (M+H). Tiempo de retención 1,388 min.

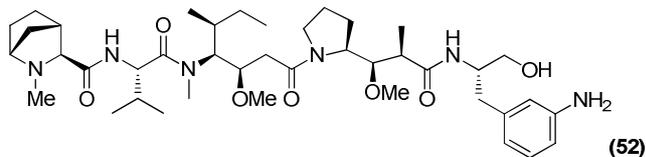
Paso 3: El producto obtenido en el paso 2 (4 mg, 0,005 mmol) en DCM (3 mL) se trató con TFA (1 mL) a t.a. durante 1 h y a continuación se concentró para proporcionar el compuesto (**50**) como sal de TFA. MS m/z 728,5 (M+H). Tiempo de retención 1,008 min.

Ejemplo 11: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**51**)



Se combinaron (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**50**) (6,1 mg, 0,008 mmol), MeOH (2 mL), ácido acético (0,005 mL, 0,09 mmol), paraformaldehído (3 mg, 0,1 mmol), y cianoborohidruro sódico (5 mg, 0,08 mmol) a t.a. y a continuación se agitaron a 50 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió entonces hasta t.a., se filtró y se purificó mediante HPLC preparativa (20-40% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**51**) como sal de TFA. MS m/z 742,5 (M+H). Tiempo de retención 1,008 min.

Ejemplo 12: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(3-aminofenil)-3-hidroxiopropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**52**)



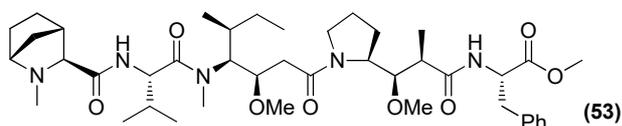
Paso 1: Se añadieron DIEA (0,105 mL, 0,60 mmol) y HATU (45,5 mg, 0,12 mmol) a ácido (3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoico (**i-7**) (57 mg, 0,12 mmol) en DMF (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 5 min y después se añadió DapOMe (**i-9**) (28,5 mg, 0,12 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h y después se purificó mediante HPLC preparativa (10-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoato de metilo. MS m/z 623,5 (M+H). Tiempo de retención 1,225 min.

Paso 2: Se añadió LiOH (30 mg, 1,25 mmol) al producto obtenido en el paso 1 (43,2 mg, 0,059 mmol) en MeOH-H₂O (1:1, 4 mL). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 h, se concentró y se acidificó con HCl (1 N, 1 mL). El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-38% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico como sal de TFA. MS m/z 609,5 (M+H). Tiempo de retención 0,962 min.

Paso 3: Al producto obtenido en el paso 2 (45,7 mg, 0,063 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron DIEA (0,055 mL, 0,32 mmol) y HATU (24,0 mg, 0,063 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 10 min y a continuación se añadió a la sal de TFA del (S)-3-(2-amino-3-hidroxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo (**i-4**) (24,1 mg, 0,063 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h y después se concentró. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener 3-((S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-hidroxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo como sal de TFA. MS *m/z* 857,5 (M+H). Tiempo de retención 1,145 min.

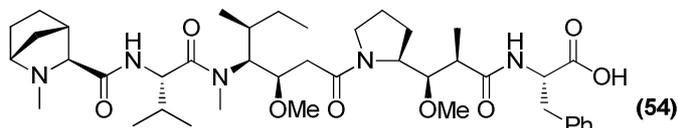
Paso 4: Una solución del producto obtenido en el paso 3 (61,4 mg, 0,063 mmol) en acetonitrilo-agua (1:1, 4 mL) con un 5% de HCl se agitó a t.a. durante 24 h. A continuación, la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa (10-30% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para proporcionar el compuesto (**52**) como sal de TFA. MS *m/z* 757,5 (M+H). Tiempo de retención 0,744 min.

Ejemplo 13: (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (**53**)



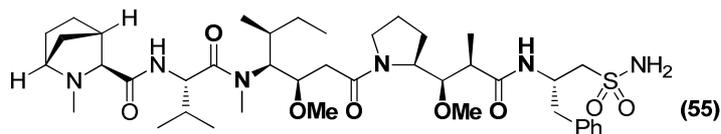
A la sal de TFA de (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (**1**) (55,4 mg, 0,064 mmol) en MeOH (5 mL) se añadieron ácido acético (0,009 mL, 0,2 mmol), paraformaldehído (24 mg, 0,79 mmol) y a continuación cianoborohidruro sódico (25 mg, 0,40 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 16 h, se filtró, se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa (10-45% de acetonitrilo-agua con un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**53**) como sal de TFA. MS *m/z* 770,3 (M+H). Tiempo de retención 1,100 min.

Ejemplo 14: Ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**9d**)



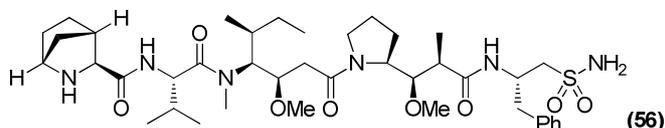
Se disolvió la sal de TFA del compuesto (**53**) (50,8 mg, 0,057 mmol) en MeOH-H₂O (1:1, 5 mL) y se añadió LiOH (20 mg, 0,835 mmol). La reacción se agitó a 40 °C durante 1 h. Se eliminó el MeOH mediante evaporación. Se añadió agua al residuo y se acidificó con AcOH (0,040 mL). El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (27-33% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**54**) como sal de TFA. MS *m/z* 756,5 (M+H). Tiempo de retención 0,985 min.

Ejemplo 15: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((S)-1-fenil-3-sulfamoylpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**55**)



Se añadieron DIEA (10,2 mg, 0,014 mL) y HATU (7,7 mg, 0,020 mmol) a la sal de TFA del ácido (2*R*, 3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (Paso 2, Ejemplo 12) (12,3 mg, 0,017 mmol) en DMF (1 mL). La reacción se agitó durante 15 min, y posteriormente se añadió (S)-2-amino-3-fenilpropano-1-sulfonamida (4,3 mg, 0,020 mmol) en DMF (0,5 mL). La reacción se agitó a t.a. durante 1 h adicional. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**55**). MS *m/z* 805,5 (M+1). Tiempo de retención 0,965 min.

Ejemplo 16: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**56**)



Paso 1: A Boc-Dap-OH (21,6 mg, 0,075 mmol) en DMF (2 mL) se añadieron DIEA (48,5 mg, 0,066 mL) y HATU (26,2 mg, 0,069 mmol). La reacción se agitó durante 15 min, y posteriormente se añadió (*S*)-2-amino-3-fenilpropano-1-sulfonamida (13,4 mg, 0,063 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2 h y después se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-carboxilato de *t*-butilo. MS *m/z* 484,2 (*M*+1). Tiempo de retención 1,130 min.

Paso 2: Se disolvió (*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-carboxilato de *t*-butilo (28,5 mg, 0,059 mmol) en HCl metanólico (3 M, 3 mL). El disolvente se eliminó lentamente bajo una corriente de N₂ seguida de presión reducida durante la noche para proporcionar (2*R*,3*R*)-3-metoxi-2-metil-*N*-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)-3-((*S*)-pirrolidin-2-il)propanamida como sal de HCl. MS *m/z* 384,2 (*M*+1). Tiempo de retención 0,630 min.

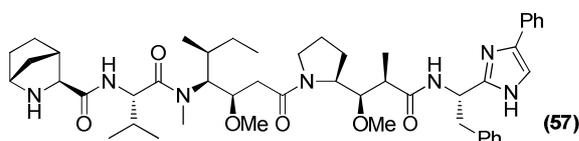
Paso 3: A Cbz-Val-Dil-OH (28,7 mg, 0,066 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron DIEA (0,048 mL) y HATU (22,9 mg, 0,060 mmol). La reacción se agitó durante 15 min, y posteriormente se añadió (2*R*,3*R*)-3-metoxi-2-metil-*N*-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)-3-((*S*)-pirrolidin-2-il)propanamida (23 mg, 0,055 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2 h y se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener ((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de bencilo. MS *m/z* 802,4 (*M*+1). Tiempo de retención 1,298 min.

Paso 4: El producto obtenido en el paso 3 (24,6 mg, 0,031 mmol), 10% de Pd-C (32,7 mg) y EtOAc (3 mL) se combinaron y se agitaron en hidrógeno durante 8 h a t.a. La mezcla de reacción se filtró y se concentró para proporcionar (*S*)-2-amino-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-*N*,3-dimetilbutanamida. MS *m/z* 668,4 (*M*+1). Tiempo de retención 0,888 min.

Paso 5: Se combinaron ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*t*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (7,0 mg, 0,029 mmol), DMF (1 mL), DIEA (0,021 mL) y HATU (10,1 mg, 0,027 mmol) y se agitaron a t.a. durante 15 min, y a continuación se añadió el producto obtenido en el paso 4 (16,2 mg, 0,024 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2 h y se purificó mediante HPLC preparativa (30-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *t*-butilo. MS *m/z* 891,5 (*M*+1). Tiempo de retención 1,319 min.

Paso 6: El producto obtenido en el paso 5 (13,2 mg, 0,015 mmol) se disolvió en HCl metanólico (3 M, 3 mL). El disolvente se eliminó lentamente bajo una corriente de N₂ seguido de presión reducida durante la noche para proporcionar (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**56**) en forma de sal de HCl. MS *m/z* 791,5 (*M*+1). Tiempo de retención 0,923 min.

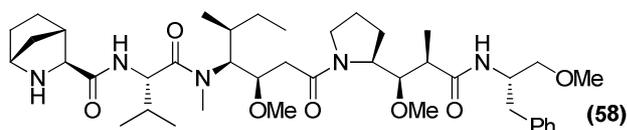
Ejemplo 17: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**57**)



Se añadieron DIEA (33 mg, 0,26 mmol) y HATU (19 mg, 0,051 mmol) al ácido (2*R*,3*R*)-3-(((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*t*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-

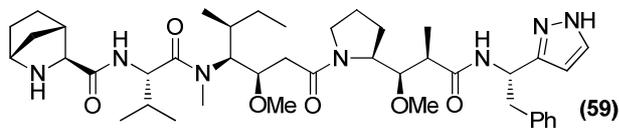
metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (40 mg, 0,043 mmol) en DMF (2 mL). La reacción se agitó a t.a. durante 15 min, y posteriormente se añadió (S)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina (22,4 mg, 0,085 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 1 h. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((S)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *t*-butilo. MS *m/z* 940,5 (M+1). Tiempo de retención 1,333 min. Este producto (13,9 mg, 0,015 mmol) se disolvió en HCl metanólico (3 M, 3 mL). El disolvente se eliminó lentamente bajo una corriente de N₂ seguido de presión reducida durante la noche para proporcionar el compuesto (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((S)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**57**) en forma de sal de HCl. MS *m/z* 840,5 (M+1). Tiempo de retención 0,936 min.

Ejemplo 18: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-(((S)-1-metoxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**58**)



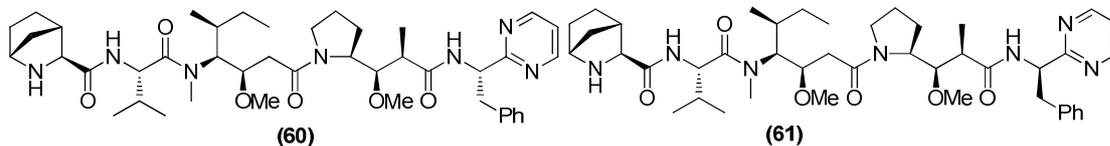
El compuesto (**58**) se preparó mediante el procedimiento descrito para el compuesto (**57**) utilizando la sal de HCl de la (S)-1-metoxi-3-fenilpropan-2-amina en lugar de (S)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina. MS *m/z* 742,5 (M+1). Tiempo de retención 0,997 min.

Ejemplo 19: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((S)-2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**59**)



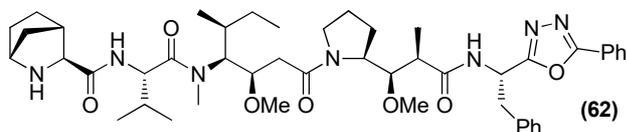
El compuesto (**59**) se preparó mediante el procedimiento descrito para el compuesto (**57**) utilizando la sal de HCl de la (S)-2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etanamina en lugar de (S)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina. MS *m/z* 764,5 (M+1). Tiempo de retención 0,959 min.

Ejemplo 20: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-Metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((S)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**60**), y (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*R*)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**61**)



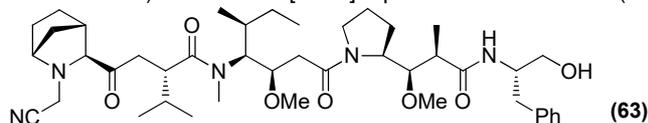
Los compuestos (**60**) y (**61**) se prepararon mediante el procedimiento descrito para el compuesto (**57**) utilizando 2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etanamina en lugar de (S)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina. Los compuestos (**60**) y (**61**) protegidos con Boc se separaron en HPLC preparativa (30-65% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA). La eliminación del grupo Boc de los compuestos (**60**) y (**61**) protegidos con Boc proporcionó ((1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((S)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**60**) y (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*R*)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**61**) en forma de sal de HCl, respectivamente. MS *m/z* 776,5 (M+1). Tiempo de retención 1,001 min (**60**) y 1,016 min (**61**).

Ejemplo 21: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**62**)



El compuesto (**62**) se preparó en el procedimiento descrito para el compuesto (**57**) utilizando la (*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanamina en lugar de (*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina con en el paso 1. Después de la eliminación del grupo Boc, se obtuvo el compuesto (**62**) como sal de HCl. MS *m/z* 842,5 (M+1). Tiempo de retención 1,112 min.

Ejemplo 22: (1*R*,3*S*,4*S*)-2-Cianometil)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**63**)



Paso 1: Se añadieron DIEA (104 mg, 0,80 mmol) y HATU (122 mg, 0,32 mmol) a una solución de ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (78 mg, 0,32 mmol) en DMF (3 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 5 min y después se añadió a Val-Dil-Dap-OMe (130 mg, 0,27 mmol) en DMF (2 mL). A continuación, la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h y se concentró. Se añadió solución de bicarbonato sódico saturada (5 mL) al residuo y el producto se extrajo con DCM (10 mL X 3). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1,3-dimetoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo. El producto se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional. MS *m/z* 710,5 (M+H). Tiempo de retención 1,440 min.

Paso 2: El producto obtenido en el paso 1 (190 mg, 0,27 mmol) en DCM (10 mL) se trató con TFA (2 mL) a t.a. durante 3 h, y a continuación se concentró para proporcionar (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoato de metilo en forma de sal de TFA. MS *m/z* 610,5 (M+H). Tiempo de retención 1,003 min. El producto se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

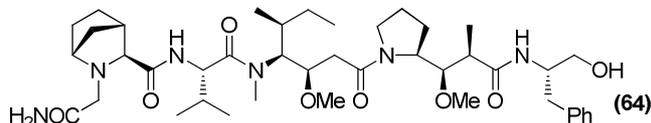
Paso 3: Al producto obtenido en el paso 2 (193 mg, 0,27 mmol) en MeOH (10 mL) se añadieron ácido acético (0,015 mL, 0,27 mmol), paraformaldehído (40 mg, 1,3 mmol) y cianoborohidruro sódico (84 mg, 1,4 mmol). La reacción se agitó a 50 °C durante 16 h. El LCMS indicó que aproximadamente un 90% se había convertido en el compuesto cianometilado y aproximadamente un 10% se convirtió en el compuesto metilado. La mezcla de reacción se filtró y se purificó mediante HPLC preparativa (20-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA). Las fracciones que contenían el aducto ciano se recogieron y se concentraron para proporcionar (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(cianometil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoato de metilo en forma de sal de TFA. MS *m/z* 648,5 (M+H). Tiempo de retención 1,261 min.

Paso 4: Al producto (0,12 g, 0,16 mmol) obtenido en el paso 3 en MeOH-H₂O (1:1, 5 mL) se añadió LiOH (50 mg, 2,09 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 16 h y después se acidificó con 0,2 mL de HCl al 10%. El grupo ciano se hidrolizó parcialmente para formar un producto carbamoilmetilado además del producto cianometilado. La reacción se concentró y los dos productos se aislaron mediante HPLC preparativa (20-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(cianometil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico, MS *m/z* 634,4 (M+H), tiempo de retención 1,138 min, y ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(2-amino-2-oxoetil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico en forma de sales de TFA. MS *m/z* 652,4 (M+H). Tiempo de retención 0,888 min.

Paso 5: A la sal de TFA del ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(cianometil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (6 mg, 0,008 mmol) en DMF se añadió DIEA (3,1 mg, 0,024 mmol) y HATU (3,7 mg, 0,0096 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 5 min, y posteriormente se añadió (*S*)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol (2,4 mg, 0,016

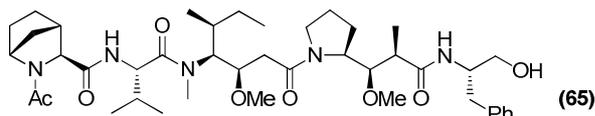
mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 1 h. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto **(63)** en forma de sal de TFA. MS m/z 767,5 (M+H). Tiempo de retención 1,189 min.

- 5 **Ejemplo 23:** (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(2-amino-2-oxoetil-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**64**)



A la sal de TFA del ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(2-amino-2-oxoetil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (paso 4, Ejemplo 22) (6,1 mg, 0,008 mmol) en DMF se añadieron DIEA (3,1 mg, 0,024 mmol) y HATU (3,7 mg, 0,0096 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 5 min, y posteriormente se añadió (*S*)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol (2,4 mg, 0,016 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 1 h. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto **(64)** en forma de sal de TFA. MS m/z 785,5 (M+H). Tiempo de retención 0,951 min.

- 15
20 **Ejemplo 24:** (1*R*,3*S*,4*S*)-2-Acetil-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**65**)

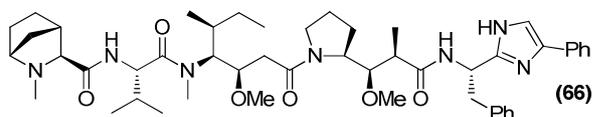


- 25 **Paso 1:** A la sal de TFA del (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoato de metilo (paso 2, Ejemplo 63) (13 mg, 0,021 mmol) en DCM (2 mL) se añadieron DIEA (0,014 mL, 0,082 mmol) y anhídrido acético (0,0039 mL, 0,041 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 1 h. Se añadió Na₂CO₃ acuoso (2 M) y la mezcla de reacción se extrajo con DCM (5 mL X 3). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y a continuación se concentraron para obtener (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-acetil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoato de metilo. El producto se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional. MS m/z 651,5 (M+H). Tiempo de retención 1,188 min.

- 35 **Paso 2:** Al producto obtenido en el paso 1 en MeOH:H₂O (1:1, 2 mL) se añadió LiOH (10 mg, 0,42 mmol). La reacción se llevó a cabo a t.a. durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró y se añadieron 0,040 mL de HOAc. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-acetil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico. MS m/z 637,4 (M+H). Tiempo de retención 1,158 min.

- 40 **Paso 3:** A una solución del producto obtenido en el paso 2 (5 mg, 0,008 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron DIEA (2,7 mg, 0,021 mmol) y HATU (3,9 mg, 0,010 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 5 min, y posteriormente se añadió (*S*)-2-amino-3-fenilpropan-1-ol (1,6 mg, 0,010 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 1 h y a continuación el crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto **(65)**. MS m/z 770,5 (M+H). Tiempo de retención 1,121 min.

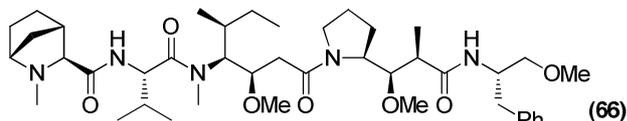
- 45 **Ejemplo 25:** (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,4*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(4-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**66**)



- 55 Se añadieron DIEA (0,0097 mL) y HATU (3,2 mg, 0,0083 mmol) a la sal de TFA del ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-

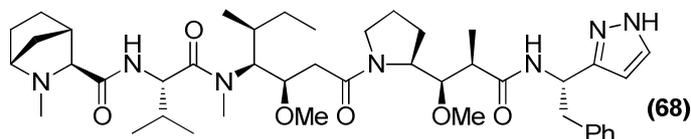
metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (Paso 2, Ejemplo 12) (4,0 mg, 0,0055 mmol) en DMF (0,5 mL). La reacción se agitó durante 15 min a t.a., y se añadió (*S*)-2-fenil-1-(4-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina (2,9 mg, 0,011 mmol) en DMF (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a t.a. y a continuación se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto

5 **(66)**. MS *m/z* 854,5 (M+1). Tiempo de retención 0,980 min.
Ejemplo 26: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-(((*S*)-1-metoxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**67**)



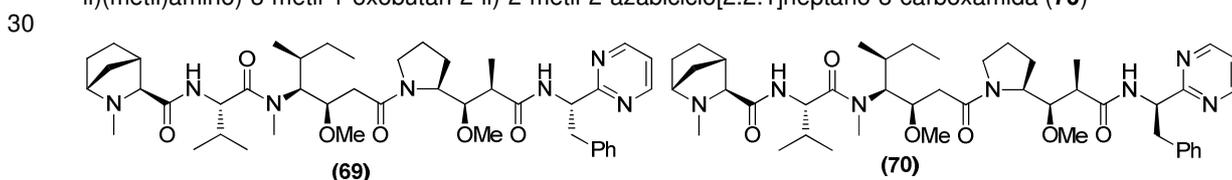
10 El compuesto **(67)** se obtuvo mediante el método descrito para el compuesto **(66)** utilizando la sal de HCl de la (*S*)-1-metoxi-3-fenilpropan-2-amina en lugar de (*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina. MS *m/z* 756,5 (M+1). Tiempo de retención 1,046 min.

15 **Ejemplo 27:** (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**68**)



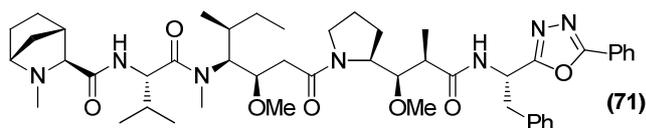
20 El compuesto **(68)** se preparó mediante el método descrito para el compuesto **(66)** utilizando la sal de HCl de la (*S*)-2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etanamina en lugar de (*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina. MS *m/z* 778,5 (M+1). Tiempo de retención 0,998 min.

25 **Ejemplo 28:** (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-Metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**69**), y (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*R*)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**70**)



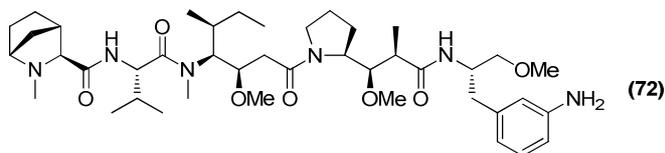
35 Los compuestos **(69)** y **(70)** se obtuvieron mediante el método descrito para el compuesto **(66)** utilizando 2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etanamina en lugar de (*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina después de una separación por HPLC preparativa (30-55% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) de los dos diastereoisómeros. MS *m/z* 790,5 (M+1). Tiempo de retención 1,016 min y 1,043 min para los compuestos **(69)** y **(70)**, respectivamente.

40 **Ejemplo 29:** (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**71**)



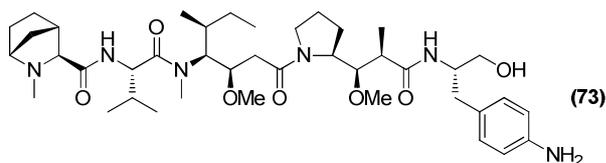
45 El compuesto **(71)** se obtuvo mediante el método descrito para el compuesto **(66)** utilizando la (*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanamina en lugar de (*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etanamina. MS *m/z* 856,5 (M+1). Tiempo de retención 1,120 min.

Ejemplo 30: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(3-aminofenil)-3-metoxipropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**72**)



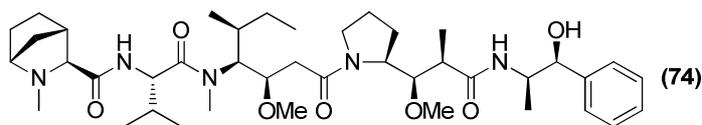
Se añadieron DIEA (0,012 mL, 0,069 mmol) y HATU (7,89 mg, 0,021 mmol) al ácido (2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (Paso 2, Ejemplo 12) (10 mg, 0,014 mmol) en DMF (2 mL). La reacción se agitó a t.a. durante 5 min y a continuación se añadió la sal de TFA del (*S*)-(3-(2-amino-3-metoxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo (10,9 mg, 0,028 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 1 h y después el crudo se purificó mediante HPLC preparativa (20-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener ácido 3-((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-metoxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo como sal de TFA. MS *m/z* 871,5 (M+H). Tiempo de retención 1,157 min. A este producto (13,6 mg, 0,014 mmol) en acetonitrilo (2 mL) se añadió ácido clorhídrico al 10% (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2 h y a continuación se concentró para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-(3-aminofenil)-3-metoxipropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**72**) como sal de HCl. MS *m/z* 771,5 (M+H). Tiempo de retención 0,883 min.

Ejemplo 31: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-(4-aminofenil)-3-hidroxiopropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**73**)



El compuesto (**73**) se preparó mediante el método descrito para el compuesto (**72**) utilizando la sal de TFA del (*S*)-(4-(2-amino-3-hidroxiopropil)fenil)carbamato de *t*-butilo en lugar de la sal de TFA del (*S*)-(3-(2-amino-3-metoxipropil)fenil)carbamato de *t*-butilo. MS *m/z* 757,5 (M+H). Tiempo de retención 0,787 min.

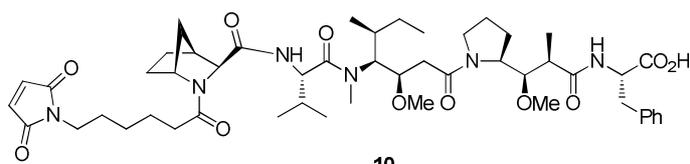
Ejemplo 32: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**74**)



Se añadieron DIEA (0,006 mL, 0,035 mmol) y HATU (4,0 mg, 0,010 mmol) al ácido (2*R*, 3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (5 mg, 0,007 mmol) en DMF (1 mL). La reacción se agitó a t.a. durante 5 min, y posteriormente se añadió (1*S*,2*R*)-(+)-norefedrina (3 mg, 0,02 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h y después se purificó mediante HPLC preparativa (20-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se añadió ácido clorhídrico al 10%. La concentración proporcionó el compuesto (**74**) en forma de sal de HCl. MS *m/z* 742,5 (M+H). Tiempo de retención 1,005 min.

Procedimiento sintético para los compuestos de Fórmula (I) conectados en el extremo N terminal ejemplo de Carga

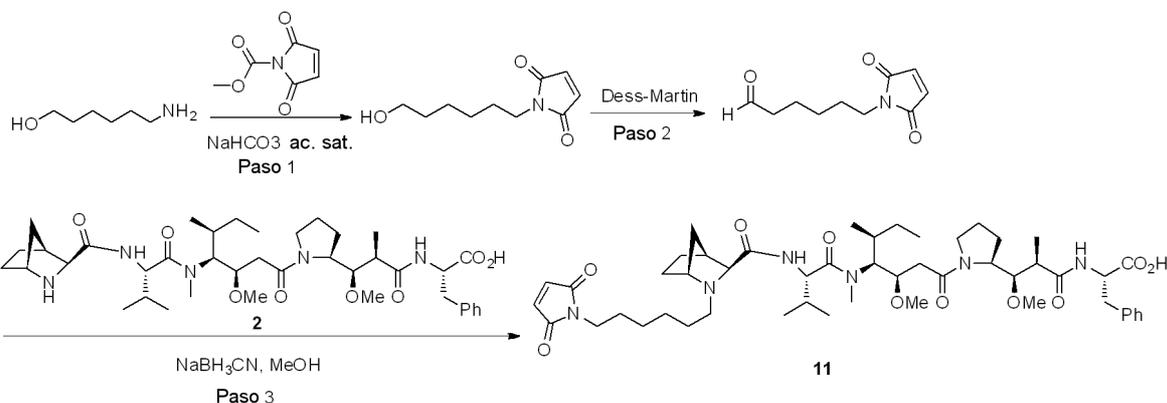
Ejemplo de carga 33: Ácido (*S*)-2-((-2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**10**)



10

5 A una solución de ácido 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoico (EMCA)(1,2 mg, 0,0058 mmol) en DMF (1,0 mL) en un matraz de fondo redondo de 15 mL se añadió DIEA (3,0 mg, 0,023 mmol), seguida de HATU (2,7 mg, 0,0070 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos antes de añadir una solución de la sal de TFA del ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) (5,0 mg, 0,0058 mmol) en DMF (1,0 mL) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. El análisis LCMS indicó que la reacción estaba completa. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-80% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto se concentraron para obtener el compuesto **10**, MS *m/z* 935,6 (M+1). Tiempo de retención 1,17 minutos.

15 **Ejemplo de carga 34:** Ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**11**)

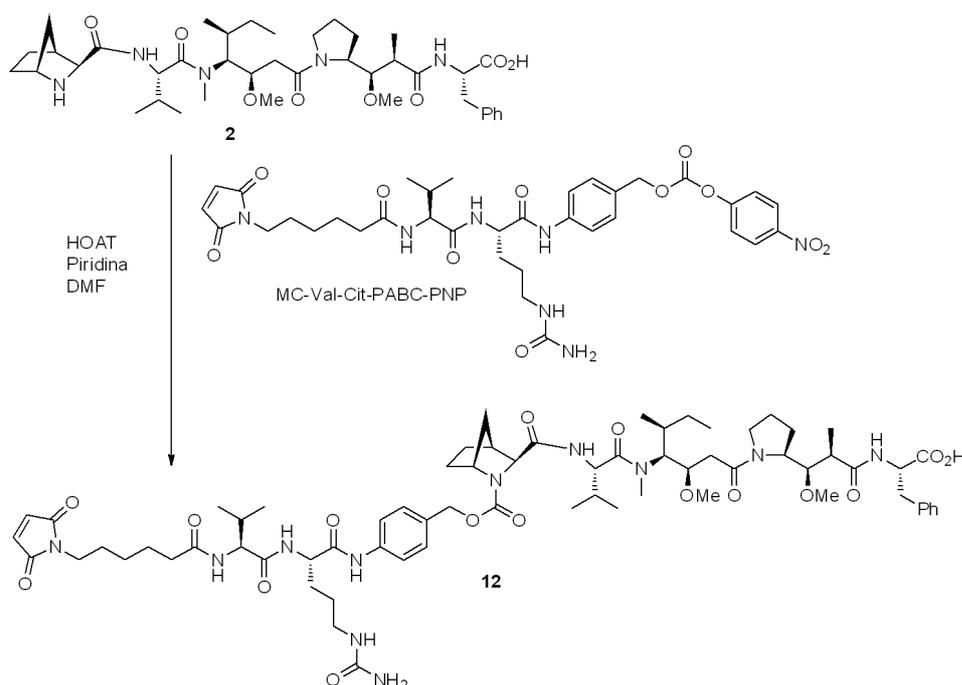


20 **Paso 1:** A un matraz de fondo redondo de 100 mL se añadió 6-amino-1-hexanol (1,00 g, 6,44 mmol) en una solución de NaHCO₃ acuoso saturado (12,0 mL). La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió *N*-metoxicarbonilmaleimida (0,750 g, 6,44 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1,5 horas. Después, la mezcla de reacción se acidificó a 0 °C con HCl 2 M hasta pH 1. La mezcla de reacción acidificada se extrajo con acetato de etilo (AcOEt). La fase orgánica se concentró. El residuo se disolvió en DCM, se cargó en una columna de gel de sílice, y se eluyó con MeOH/DCM (0-4%) para obtener 1-(6-hidroxihexil)-1*H*-pirrol-2,5-diona como un sólido blanco, MS *m/z* 198,2 (M+1). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6,68 (s, 2H), 3,63 (t, d = 6,4 Hz, 2H), 3,52 (t, d = 7,2 Hz, 2H), 1,63-1,52 (m, 4H), 1,43-1,28 (m, 4H).

30 **Paso 2:** Se agregó reactivo de Dess-Martin (618 mg, 1,44 mmol) a 1-(6-hidroxihexil)-1*H*-pirrol-2,5-diona (237 mg, 1,20 mmol) en DCM (10,0 mL). Después de 1 hora a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con DCM (10 mL) y se filtró. El filtrado se concentró y se purificó mediante ISCO (gel de sílice, 0-20% de EtOAc/Hexano) para proporcionar 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanal como un aceite incoloro, MS *m/z* 196,2 (M+1). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9,76 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 6,69 (s, 2H), 3,52 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,43 (td, J = 7,2 Hz, 1,6 Hz, 2H), 1,70-1,56 (m, 4H), 1,36-1,28 (m, 2H).

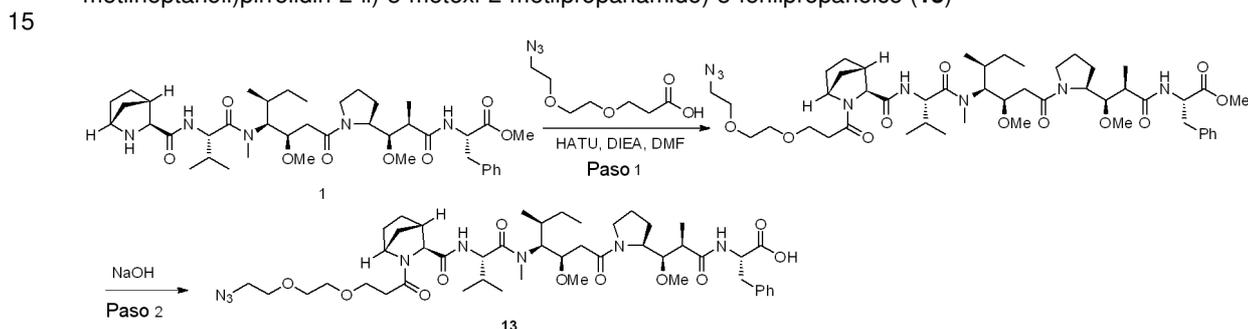
35 **Paso 3:** El compuesto **2** (5,0 mg, 0,0067 mmol) y 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanal (6,6 mg, 0,034mmol) se disolvieron en MeOH (1,0 mL). Se añadió cianoborohidruro sódico (4,2 mg, 0,067 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico **11**, MS *m/z* 921,6 (M+1). Tiempo de retención 1,07 minutos.

45 **Ejemplo de carga 35:** Ácido ((S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encil)oxi)carbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**12**)



En un matraz de fondo redondo de 15 mL a temperatura ambiente se añadieron MC-Val-Cit-PABC-PNP (5,2 mg, 0,0070 mmol), sal de TFA del ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) (5,0 mg, 0,0058 mmol) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAT) (0,6 mg, 0,005 mmol), seguido de piridina-DMF (1:4, 1,25 mL). A la solución resultante se añadió DIEA (2,3 mg, 0,018 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 72 horas, momento en el que el compuesto **2** ya se había consumido. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-80% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener el compuesto **12**, MS *m/z* 1340,7 (M+1). Tiempo de retención 1,15 minutos.

Ejemplo de carga 36: Ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**13**)

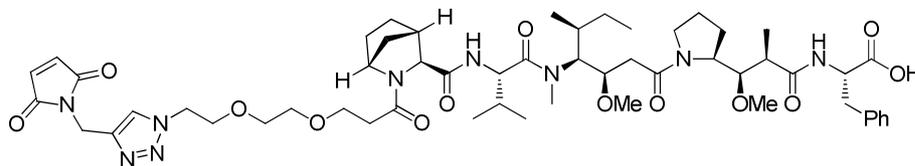


Paso 1: Al ácido 3-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)propanoico (6,6 mg, 0,033 mmol) en DMF (2 mL) se añadieron DIEA (0,011 mL, 0,065 mmol) y HATU (10,3 mg, 0,027 mmol). Después de 15 minutos, se añadió el compuesto **1** (8,2 mg, 0,010 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(3-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (MS *m/z* 941,3 (M+1). Tiempo de retención 1,30 minutos.

Paso 2: El producto éster del paso 1 se disolvió en acetonitrilo (0,3 mL) y H₂O (0,2 mL). Se añadió NaOH acuoso (1,0 N, 0,15 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **13** ácido (S)-

2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(3-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (MS m/z 927,5 (M+1). Tiempo de retención 1,21 minutos.

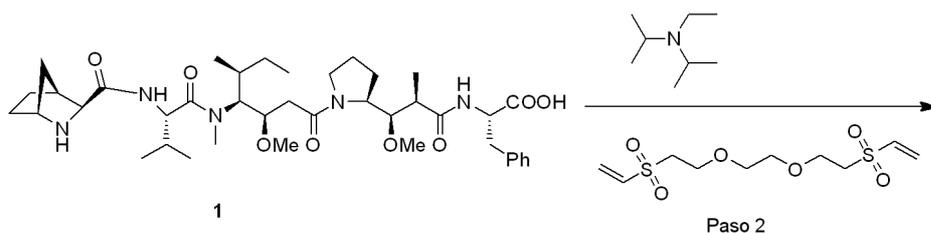
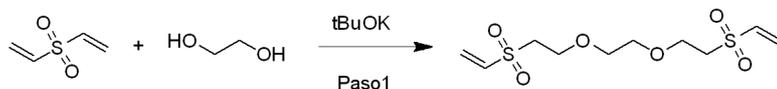
- 5 **Ejemplo de carga 37:** Ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(3-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**14**)



14

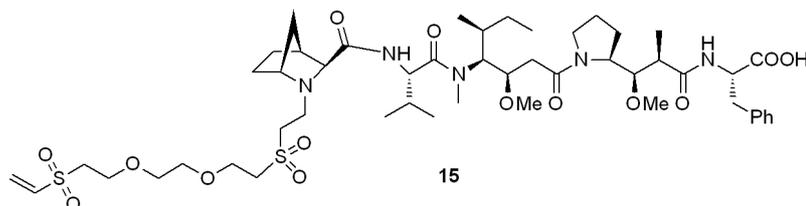
- 10 Una solución de ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(3-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**13**) (5,4 mg, 0,058 mmol), 1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirrol-2,5-diona (1,6 mg, 0,012 mmol) y CuSO₄ (0,7 mg, 0,005 mmol) en DMF (1,2 mL) y H₂O (0,3 mL) se trató con la sal sódica del ácido L-ascórbico (2,6 mg, 0,015 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(3-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico **14**, MS m/z 1062,5 (M+1). Tiempo de retención 1,15 minutos.

- 25 **Ejemplo de carga 38:** Ácido (*S*)-2-((2*R*,2*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(((2-(2-(2-(vinilsulfonil)etoxi)etoxi)etil)sulfonil)etil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**15**)



1

Paso 2

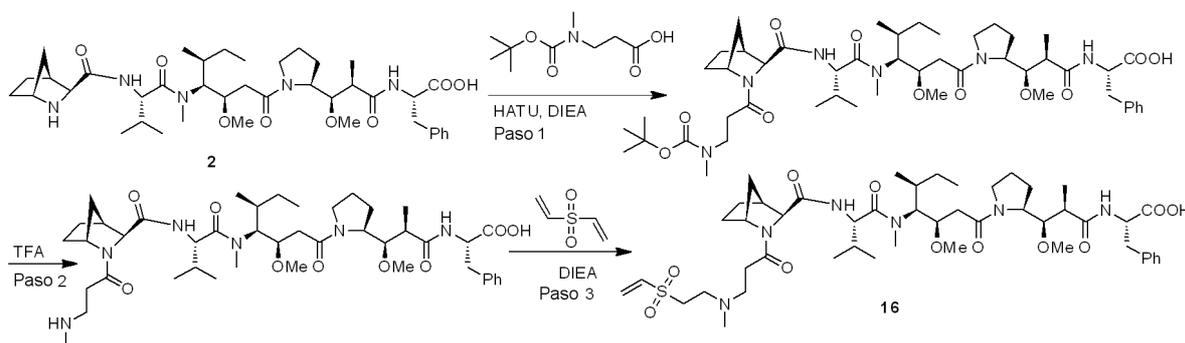


15

- 30 **Paso 1:** se añadió *t*-BuOK (119 mg, 1,10 mmol) a una solución de divinilsulfona (1,60 g, 13,5 mmol) y etilenglicol (330 mg, 5,32 mmol) en THF (100 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar un crudo que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EtOAc-Hexanos 2:1 a 3:1) para obtener ((2-(2-(2-(vinilsulfoniletoxi)etoxi)etil)sulfonil)eteno como un jarabe incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6,75 (dd, *J* = 9,9 Hz, 16,6 Hz, 2H), 6,39 (d, *J* = 16,6 Hz, 2H), 6,09 (d, *J* = 9,9 Hz, 2H), 3,88 (t, *J* = 5,7 Hz, 4H), 3,61 (s, 4H), 3,24 (t, *J* = 5,7 Hz, 4H).

Paso 2: A una solución de ((2-(2-(2-vinilsulfoniletoxi)etoxi)etil)sulfonil)eteno (13,3 mg, 0,045 mmol) en DCM-i-PrOH (2:1) se añadieron la sal de TFA del ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) (10,0 mg, 0,012 mmol) y DIEA (0,0020 mL, 0,012 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 80 °C durante 18 horas, momento en el que el análisis LCMS indicó que la reacción estaba completa en un 70-80%. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 10-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto **15** como una sal de TFA, MS *m/z* 1040,4 (M+1). Tiempo de retención 1,03 minutos.

Ejemplo de carga 39: Ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((1R,3S,4S)-2-(3-(metil(2-(vinilsulfonil)etil)amino)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**16**)

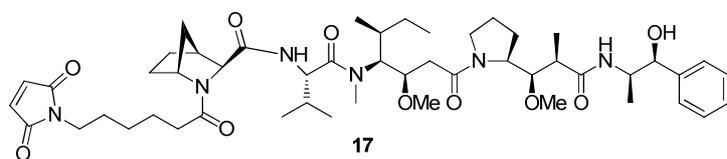


Paso 1: A una solución de ácido 3-((*tert*-butoxicarbonil)(metil)amino)propanoico (5,4 mg, 0,027 mmol) en DMF (1,0 mL) se añadieron DIEA (0,0070 mL, 0,040 mmol) y HATU (9,1 mg, 0,024 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y se añadió sal de TFA del ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) (11,4 mg, 0,013 mmol). La reacción se completó en 1 hora a juzgar por el análisis LCMS. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 10-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener el ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-(3-((*tert*-butoxicarbonil)(metil)amino)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico MS *m/z* 927,5 (M+1). Tiempo de retención 1,28 minutos.

Paso 2: A una solución del producto obtenido en el paso 1 (6,4 mg, 0,0069 mmol) en DCM (2,0 mL) se añadió TFA (1,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se concentró para obtener la sal de TFA del ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((1R,3S,4S)-2-(3-(metilamino)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico. MS *m/z* 827,4 (M+1). Tiempo de retención 0,99 minutos. Este producto se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

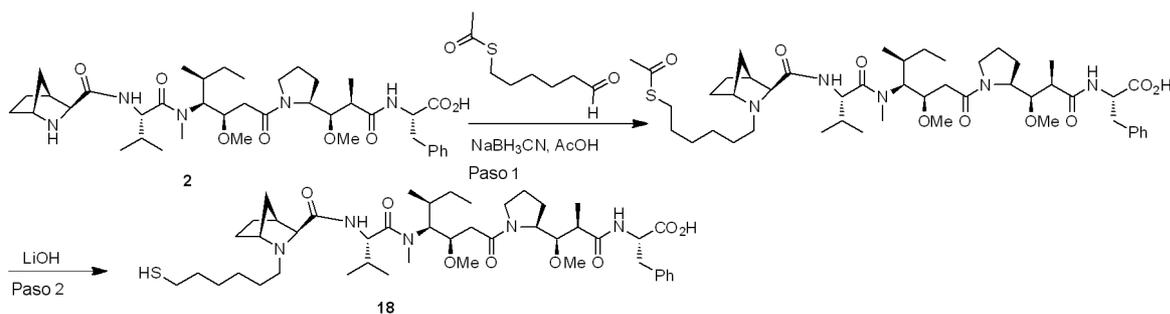
Paso 3: A una solución de la sal de TFA del producto obtenido en el paso 2 (6,5 mg, 0,0069 mmol) en i-PrOH (2,0 mL) se añadieron divinilsulfona (20,0 mg, 0,169 mmol) y DIEA (0,010 mL, 0,057 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 1 hora, momento en el que la reacción estaba completa a juzgar por el análisis LCMS y la mezcla de reacción se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 10-60% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener el compuesto **16**, MS *m/z* 945,4 (M+1). Tiempo de retención 0,99 minutos.

Ejemplo de carga 40: (1R,3S,4S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-N-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**17**)



Este compuesto se sintetizó utilizando el mismo método tal como se ha descrito para el compuesto **(4)** (en el Ejemplo 4) a partir de EMCA (5,5 mg, 0,026 mmol), DIEA (10,0 mg, 0,078 mmol), HBTU (9,8 mg, 0,026 mmol) y la sal de TFA de la (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**(3)**) (21,8 mg, 0,026 mmol). El compuesto **(17)** se obtuvo después de la purificación mediante HPLC en fase inversa, MS *m/z* 921,5 (M+1). Tiempo de retención 1,25 minutos.

Ejemplo de carga 41: Ácido (S)-2-((-2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-mercaptohexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**(18)**)

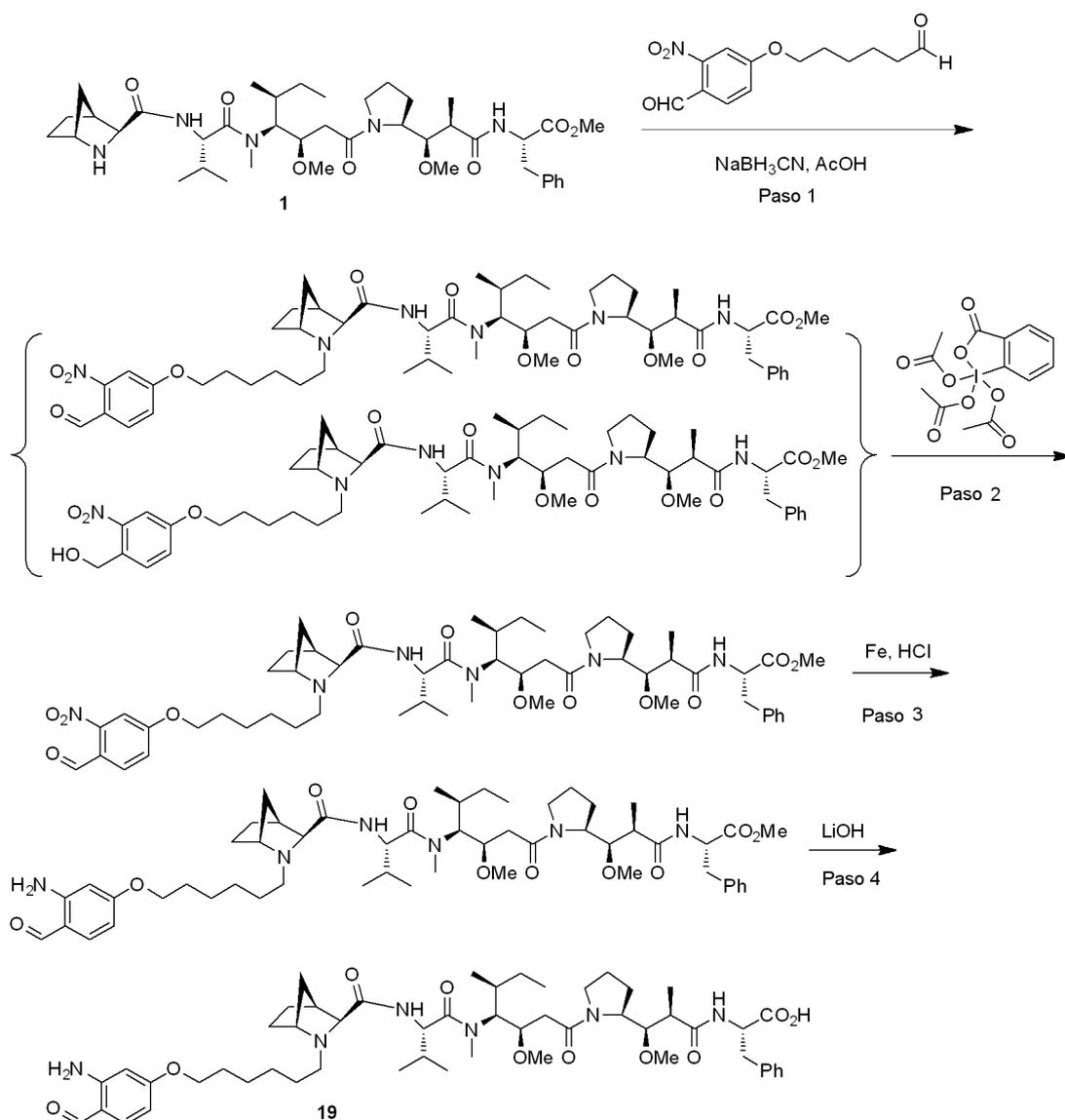


Paso 1: A una solución de etanoato de *S*-(6-oxohexilo) (4,28 mg, 0,025 mmol) y sal de TFA del ácido (S)-2-((-2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**(2)**) (7,0 mg, 0,0082 mmol) en MeOH (2,0 mL) se añadió ácido acético (0,0050 mL, 0,083 mmol) y cianoborohidruro sódico (2,57 mg, 0,041 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 2 horas y el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-70% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron, lo que proporcionó ácido (S)-2-((-2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(acetiltio)hexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico MS *m/z* 900,5 (M+1), tiempo de retención 1,17 minutos.

Paso 2: El producto obtenido en el paso 1 se disolvió en MeOH:H₂O (2:1, 3,0 mL). A la solución se añadió hidróxido de litio (5,0 mg, 0,21 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas y, a continuación, se concentró hasta aproximadamente 1,5 mL. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener el compuesto **(18)**, MS *m/z* 858,5 (M+1). Tiempo de retención 1,16 minutos.

Ejemplo de carga 42: Ácido (S)-2-((-2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(3-amino-4-formilfenoxi)hexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**(19)**)

35



Paso 1: A una solución de 2-nitro-4-((6-oxohexil)oxi)benzaldehído (20,1 mg, 0,076 mmol) y (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (**1**) (16,5 mg, 0,019 mmol) en DMF (2,0 mL) se añadió ácido acético (0,0076 mL, 0,13 mmol) y cianoborohidruro sódico (11,9 mg, 0,190 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 2 horas y el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-70% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contienen el aldehído deseado (MS *m/z* 1005,5 (M+1), tiempo de retención 1,27 minutos) y los intermedios del alcohol deseado (MS *m/z* 1007,5 (M+1), tiempo de retención 1,21 minutos) se combinaron y se concentraron y utilizaron en el paso siguiente.

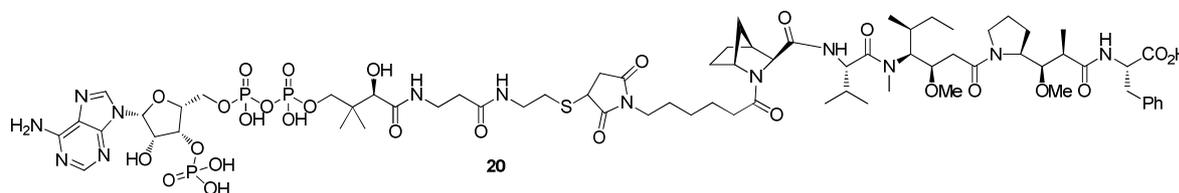
Paso 2: La mezcla obtenida del paso 1 que contenía el aldehído y el alcohol se disolvió en DCM (2,0 mL) y se añadió peryodinano de Dess-Martin (4,0 mg, 0,0095 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se lavó entonces con solución de Na₂S₂O₃ acuosa y se extrajo con DCM. La fase de DCM se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para proporcionar la sal de TFA de (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(4-formil-3-nitrofenoxi)hexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo, MS *m/z* 1005,5 (M+1). Tiempo de retención 1,27 minutos. El producto también contenía algo de ácido hidrolizado, MS *m/z* 991,5 (M+1). Tiempo de retención 1,22 minutos.

Paso 3: A una solución del producto obtenido en el paso 2 (16,9 mg, 0,015 mmol) en EtOH al 70% en agua se añadieron hierro en polvo (0,8 mg, 0,02 mmol) y HCl (0,1 N, 0,15 mL, 0,015 mmol). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 18 horas. Se formó un precipitado marrón. La mezcla se filtró a través de un lecho de Celite y el filtrado se concentró. El crudo se purificó con ISCO, columna C18, se eluyó con un 30-100% de acetonitrilo-H₂O. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener

(*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(3-amino-4-formilfenoxi)hexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo, MS *m/z* 975,5 (M+1). Tiempo de retención 1,23 minutos.

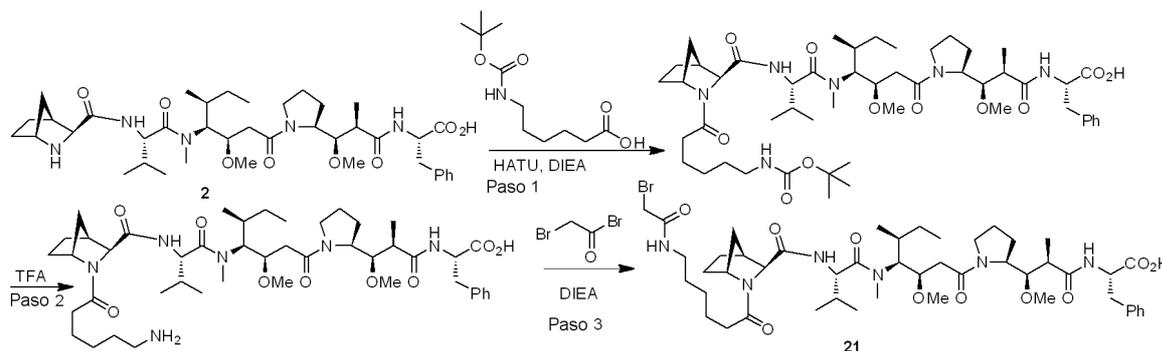
Paso 4: A una solución del producto obtenido en el paso 3 (4,6 mg, 0,0047 mmol) en MeOH-H₂O (1,5:1, 2,5 mL) se añadió hidróxido de litio (10,0 mg, 0,435 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente un 50% del volumen y se acidificó con HCl 1N hasta pH 5. El crudo se purificó con ISCO, columna C18, se eluyó con un 30-75% de acetonitrilo-H₂O. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, se neutralizaron con 0,3 mg de LiOH, y se liofilizaron para obtener el compuesto **19**, MS *m/z* 961,5 (M+1). Tiempo de retención 1,15 minutos.

Ejemplo de carga 43: Aducto con coenzima A del ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**20**)



A una solución de sal de trilitio de la coenzima A (CoA) (7,6 mg, 0,0096 mmol) en tampón de fosfato 100 mM que contiene EDTA 5 mM a pH 7,5 se añadió una solución de ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**17**) (9,0 mg, 0,0096 mmol) en DMSO (0,048 mL). La mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, momento en el que la reacción estaba completa a juzgar por el análisis LCMS. La muestra se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-60% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener el aducto de CoA **20**, MS *m/z* 852 (M/2+1). Tiempo de retención 0,98 minutos.

Ejemplo de carga 44: Ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2-bromoacetamido)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**21**)



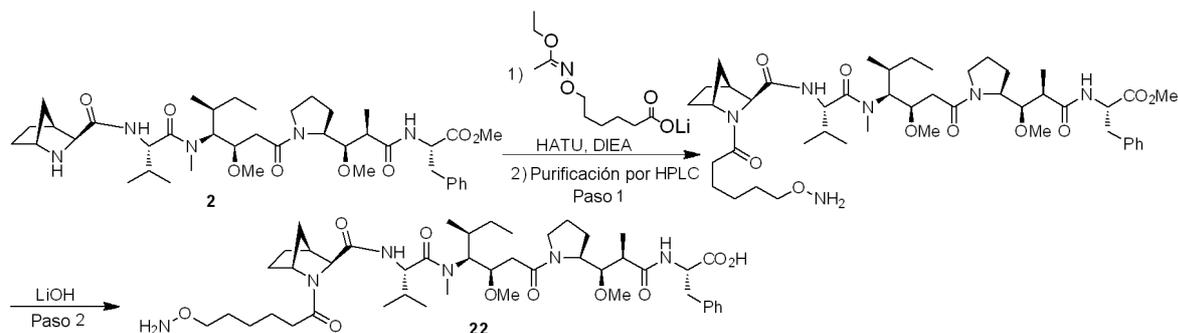
Paso 1: A una solución de ácido 6-((*tert*-butoxicarbonil)amino)hexanoico (12 mg, 0,051 mmol) en DMF (2,0 mL) se añadieron DIEA (18 mg, 0,14 mmol) y HATU (18 mg, 0,047 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de añadir ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**2**) (40 mg, 0,047 mmol). La reacción se completó en media hora. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-((*tert*-butoxicarbonil)amino)hexanoil)-2-

azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico, MS m/z 955,5 (M+1). Tiempo de retención 1,32 minutos.

Paso 2: A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (15,6 mg, 0,016 mmol) en DCM (2,0 mL) se añadió TFA (1,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se concentró para obtener la sal de TFA del ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-aminoheptanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico, MS m/z 855,5 (M+1). Tiempo de retención 1,01 minutos.

Paso 3: La sal de TFA del ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-aminoheptanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (20 mg, 0,021 mmol) se disolvió en DCM y se trató con DIEA (12 mg, 0,093 mmol). La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C. A continuación, se añadió a la mezcla de reacción una solución de bromuro de 2-bromoacetilo (9,0 mg, 0,045 mmol) en DCM (0,2 mL) con agitación. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 min y el análisis LCMS mostró que el material de partida de amina se había consumido. Se añadió NaHCO₃ acuoso saturado para desactivar la reacción. La mezcla de reacción se extrajo con DCM (5 mL X 3). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 30-45% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones se combinaron y se concentraron para obtener el compuesto **21**, MS m/z 975,3 (M+1). Tiempo de retención 1,19 minutos.

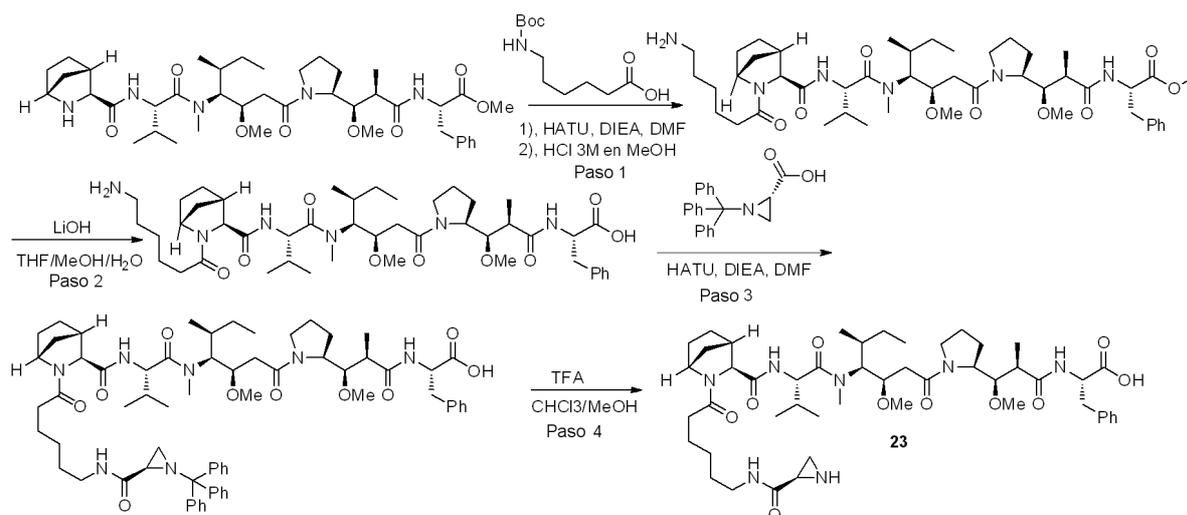
Ejemplo de carga 45: Ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(aminooxi)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**22**)



Paso 1: A una solución de 6-(((1-etoxtielideno)amino)oxi)hexanoato de litio (6,3 mg, 0,028 mmol) en DMF (1,0 mL) se añadió HATU (8,9 mg, 0,023 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de añadir la mezcla de reacción completa a una solución de la sal de TFA de (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (**1**) (20 mg, 0,021 mmol) y DIEA (6,0 mg, 0,047 mmol) en DMF (1,0 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla de reacción se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 40-80% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron. El análisis LCMS reveló que el grupo protector en el resto alcoxilamina se eliminó para proporcionar la sal de TFA de (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(aminooxi)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo, MS m/z 885,5 (M+1). Tiempo de retención 1,10 minutos.

Paso 2: A una solución del compuesto obtenido en el Paso 1 (24,3 mg, 0,023 mmol) en MeOH-H₂O (1:1, 2,0 mL) se añadió hidróxido de litio (20 mg, 0,84 mmol). La reacción se monitorizó por LCMS. Tras la finalización, el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-40% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener la sal de TFA del compuesto **22**, MS m/z 871,5 (M+1). Tiempo de retención 1,03 minutos.

Ejemplo de carga 46: Ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-((S)-aziridina-2-carboxamido)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**23**)



Paso 1: En un vial de 7 mL, se disolvió ácido 6-((*tert*-butoxicarbonil)amino)hexanoico (16 mg, 0,069 mmol) en DMF anhidra (2 mL). Se añadieron DIEA (0,036 mL, 0,21 mmol) y HATU (24 mg, 0,062 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 min antes de añadir (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (1, sal de HCl, 30 mg, 0,034 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. El LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de ACN-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-((*tert*-butoxicarbonil)amino)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo. MS *m/z* 969,6 (M+1). Tiempo de retención 1,42 minutos. El producto así obtenido (21 mg, 0,022 mmol) se disolvió en HCl en MeOH (3 M, 2 mL). El disolvente se eliminó lentamente a presión reducida. El análisis LCMS del residuo indicó la eliminación completa del grupo Boc. El residuo se recuperó en acetonitrilo y agua y se liofilizó para obtener (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-amino)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo como sal de HCl. MS *m/z* 869,5 (M+1). Tiempo de retención 1,01 minutos.

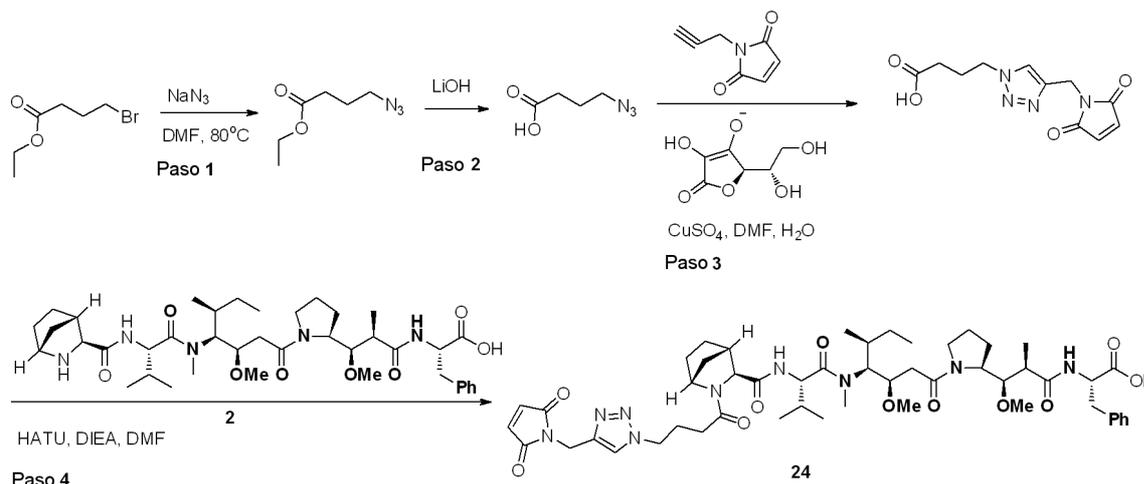
Paso 2: El producto del paso previo (10 mg, 0,012 mmol) se disolvió en THF (0,8 mL), MeOH (0,1 mL) y H₂O (0,1 mL). Se añadió hidróxido de litio monohidratado (4,83 mg, 0,115 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. El LCMS indicó que la reacción se había completado. Los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se neutralizó utilizando ácido clorhídrico 0,1 N, se recuperó en acetonitrilo y H₂O, y se liofilizó para obtener ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-amino)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico que contenía algo de LiCl. MS *m/z* 855,6 (M+1). Tiempo de retención 0,98 minutos.

Paso 3: En un vial de 7 mL, se disolvió ácido (S)-1-tritiaziridina-2-carboxílico (7,6 mg, 0,023 mmol) en DMF anhidra (2 mL). Se añadieron DIEA (0,010 mL, 0,021 mmol) y HATU (7,9 mg, 0,021 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos antes de ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-amino)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (10 mg, 0,012 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas más. El LCMS indicó que la reacción se había completado. El disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo se purificó con ISCO en fase inversa, utilizando una columna C18ac. (5,5 g), se eluyó con un 10-100% de acetonitrilo-H₂O. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para proporcionar ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-((S)-1-tritiaziridina-2-carboxamido)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico. MS *m/z* 1166,5 (M+1). Tiempo de retención 1,49 minutos.

Paso 4: El producto del Paso 3 (4,0 mg, 0,0034 mmol) se disolvió en MeOH/CHCl₃ (1:1, 1 mL) y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió TFA (0,0040 mL, 0,051 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. El LCMS indicó que la reacción estaba completa en aproximadamente un 60%. Se añadió de nuevo TFA (0,0040 mL, 0,051 mmol). Después de otra 1 hora a temperatura ambiente, el LCMS indicó que la reacción estaba completa. Los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo se disolvió en MeOH y se purificó con ISCO en fase inversa, utilizando una columna C18ac. (5,5 g), se eluyó con un 10-100% de acetonitrilo-

H₂O. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para proporcionar ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-((*S*)-aziridina-2-carboxamido)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**23**). MS *m/z* 924,6 (M+1). Tiempo de retención 1,012 minutos.

5 **Ejemplo de carga 47:** Ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(4-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)butanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**24**)



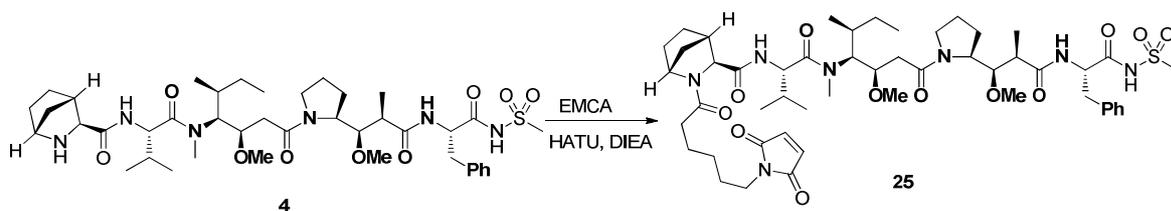
Paso 1: A una solución de 4-bromobutanoato de etilo (3,4 g, 0,0174 mol) en DMF (100mL) se añadió azida sódica (1,7 g, 0,0262 mol). La mezcla se calentó hasta 80 °C y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo 3 veces con éter. La fase orgánica se lavó con agua 3 veces, se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró para proporcionar el producto crudo que se utilizó directamente en el paso siguiente sin purificación adicional.

15 **Paso 2:** Se disolvió 4-azidobutanoato de etilo (157 mg, 1,0 mmol) en THF (4 mL), MeOH (0,5mL) y agua (0,5 mL). A continuación, se añadió LiOH·H₂O (168 mg, 4,0 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El LCMS indicó que la reacción se había completado. La reacción se detuvo, el pH se ajustó a 2-3 utilizando HCl 1 N y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La fase orgánica combinada se secó con MgSO₄, se concentró para proporcionar el producto crudo que se utilizó directamente en el paso siguiente sin purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 3,36 (t, J=6,8 Hz, 2H), 2,39 (t, J=7,2 Hz, 2H), 1,89-1,82 (m, 2H).

25 **Paso 3:** Una solución de ácido 4-azidobutanoico (19 mg, 0,147 mmol), 1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirrol-2,5-diona (39,8 mg, 0,294 mmol) y CuSO₄ (17,62 mg, 0,11 mmol) en DMF (3,0 mL) y H₂O (0,75mL) se trató con sal sódica del ácido L-ascórbico (72,9 mg, 0,368 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante Prep-HPLC, columna C18, se eluyó con un 20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener un sólido blanco. MS *m/z* 265,1 (M+1). Tiempo de retención 0,642 minutos. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,94 (s, 1H), 6,86 (s, 2H), 4,77 (s, 2H), 4,43 (t, J=7,0 Hz, 2H), 2,31 (t, J=7,2 Hz, 2H), 2,17-2,13 (m, 2H).

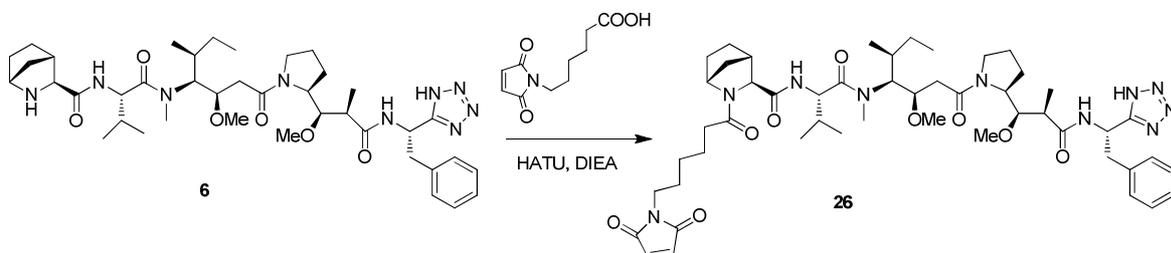
35 **Paso 4:** Se disolvió ácido 4-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)butanoico (4,5 mg, 0,017 mmol) en DMF (1 mL). Se añadieron DIEA (9,9 uL, 0,057 mmol) y HATU (5,61 mg, 0,015 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 minutos antes de la adición de **2** (9,72 mg, 0,011 mmol). La mezcla de reacción se agitó entonces durante 1 hora a temperatura ambiente. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. El producto se purificó mediante Prep-HPLC, columna C18, se eluyó con un 20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado **24** se combinaron y se liofilizaron para obtener un sólido blanco. MS *m/z* 988,5.1 (M+1). Tiempo de retención 1,074 minutos.

40 **Ejemplo de carga 48:** (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-((*S*)-*N*-1-(metilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**25**)



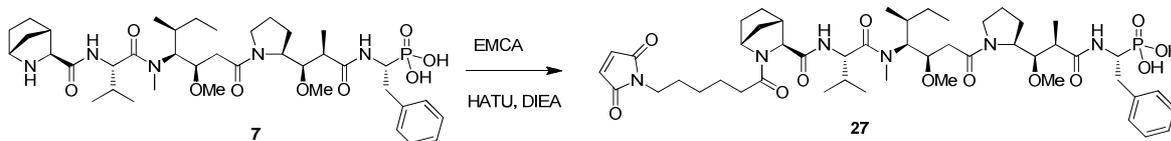
Se disolvió EMCA (4,1 mg, 0,019 mmol) en DMF (2 mL). Se añadieron DIEA (8,31 mg, 0,064 mmol) y HATU (5,87 mg, 0,015 mmol) y después de 10 minutos se añadió el compuesto **4** (11 mg, 0,013 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. El producto se purificó mediante Prep-HPLC, columna C18, se eluyó con un 30-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el producto deseado **25** como un sólido blanco. MS *m/z* 1012,5 (M+1). Tiempo de retención 1,222 minutos.

Ejemplo de carga 49: (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-*N*-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**26**)



A una solución de EMCA (2,5 mg, 0,012 mmol) en DMF (1 mL) se añadió DIEA (6,2 uL, 0,035 mmol) y después HATU (4,5 mg, 0,012 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y a continuación se añadió a la sal de TFA de (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-tetrazol-5-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (6,7 mg, 0,0076 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-60% de acetonitrilo-H₂O, que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener el compuesto **26**, MS *m/z* 959,5 (M+1). Tiempo de retención 1,220 minutos.

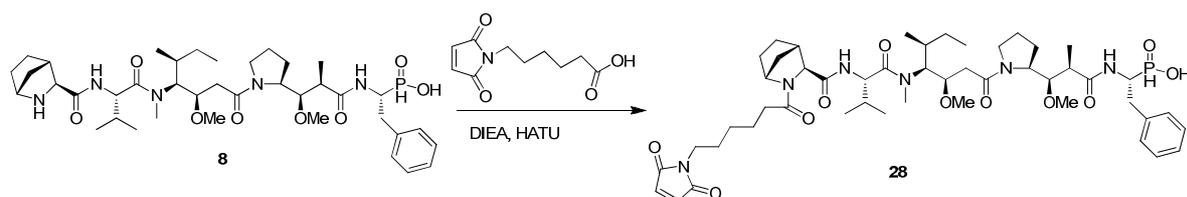
Ejemplo de carga 50: Ácido (*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico (**27**)



A una solución de EMCA (3,3 mg, 0,016 mmol) en DMF (1 mL) se añadió DIEA (2,7 uL, 0,016 mL) y después HATU (5,93 mg, 0,016 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y a continuación se añadió a una solución de ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico **7** (10 mg, 0,011 mmol) en DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora.

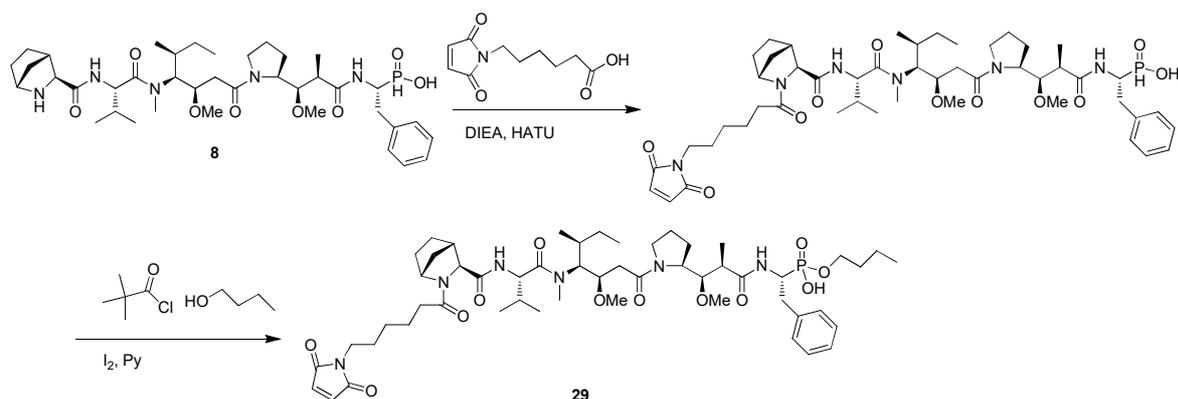
El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 30-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener ácido (*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico **27**. MS *m/z* 971,5 (M+1). Tiempo de retención 1,181 minutos.

Ejemplo de carga 51: Ácido (*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico (**28**)



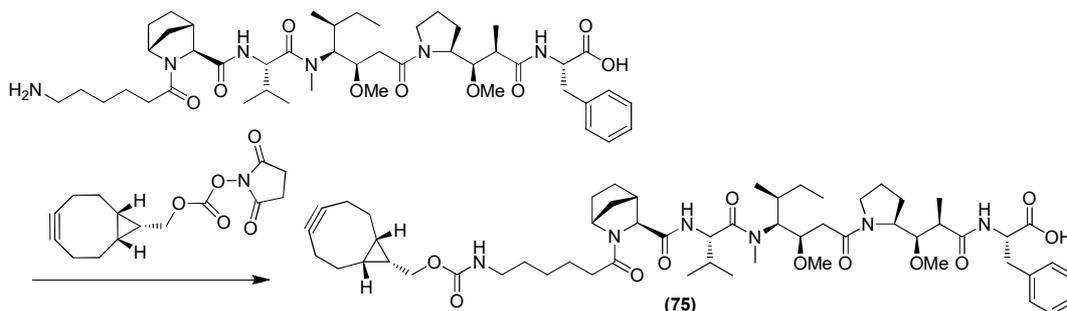
5 A una solución de EMCA (2,4 mg, 0,011 mmol) en DMF (1 mL) se añadió DIEA (6,6 μ L, 0,038 mmol) y HATU (4,0 mg, 10,42 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y a continuación se añadió a una solución de ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico **8** (8,3 mg, 0,0095 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se completó en 10 minutos y el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 30-55% de acetonitrilo- H_2O , que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico **28**. MS m/z 955,5 (M+1). Tiempo de retención 1,151 minutos.

15 **Ejemplo de carga 52:** ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfonato de butilhidrógeno (**29**)



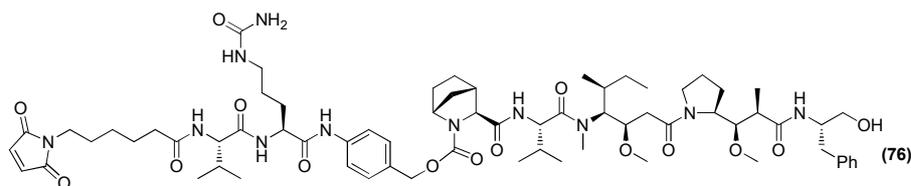
20 A una solución de ácido ((*R*)-1-((1*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfónico (**8**) (4,2 mg, 0,0044 mmol) en piridina (1 mL) se añadió *n*-BuOH (3,3 mg, 0,044 mmol) y después cloruro de pivaloilo (5,3 mg, 0,044 mmol). La reacción se monitorizó mediante LCMS hasta que todo el ácido fosfórico se convirtió en el éster. A continuación, se añadió una solución de yodo recién preparada (11 mg, 0,044 mmol) en piridina húmeda-agua (10:1, 1 mL). La reacción se monitorizó mediante LCMS hasta su finalización. La piridina se eliminó al vacío y el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 30-55% de acetonitrilo- H_2O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfonato de butilhidrógeno **29**. MS m/z 1027,5 (M+1). Tiempo de retención 1,300 minutos. El éster es proclive a la hidrólisis en condiciones ácidas.

35 **Ejemplo de carga 53:** Ácido ((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(((1*R*,8*S*,9*s*)-bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetoxi)carbonil)amino)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**75**)



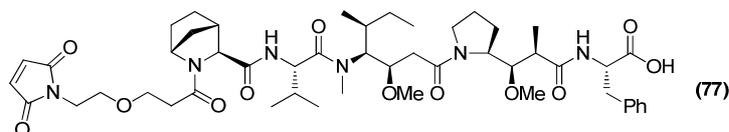
Al ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,2*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-aminoheptanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (paso 2, Ejemplo 44) (5 mg, 0,005 mmol) en DMF-THF (1:1, 2 mL) se añadió (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato de (1*R*,8*S*,9*S*)-bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetilo (1.5 mg, 0,005 mmol) y DIEA (0,0025 mL, 0,014 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 30 min y después se purificó mediante HPLC preparativa (40-65% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**75**). MS *m/z* 1031,6 (M+H). Tiempo de retención 1,337 min.

10 Ejemplo de carga 54: (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo (**76**)



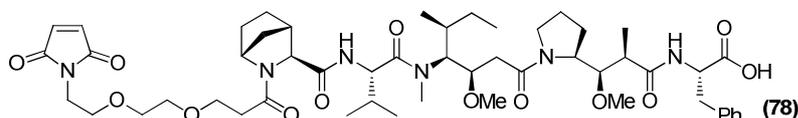
A una solución de MC-Val-Cit-PAB-PNP (1,9 mg, 0,0026 mmol), sal de TFA del compuesto (**50**) (1,8 mg, 0,002 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron piridina (0,25 mL), HOAT (0,29 mg, 0,002 mmol) y DIEA (0,0054 mL, 0,031 mmol). La reacción se agitó a 40 °C durante 2 h y después a 30 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa (20-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**76**). MS *m/z* 664,0 (M/2+H). Tiempo de retención 1,165 min.

25 Ejemplo de carga 55: Ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**77**)



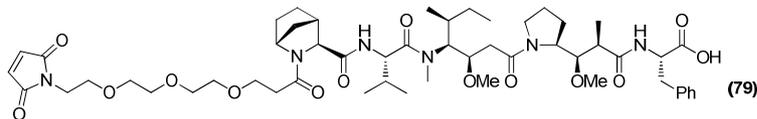
A una solución de ácido 3-(2-(maleimido)etoxi)propanoico (2,2 mg, 0,010 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron HATU (3,7 mg, 0,0098 mmol) y DIEA (3,6 mg, 0,028 mmol). La reacción se agitó durante 5 minutos y después se añadió ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (8 mg, 0,0093 mmol) en DMF (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 h y después se concentró. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**77**). MS *m/z* 937,5 (M+H). Tiempo de retención 1,138 min.

40 Ejemplo de carga 56: Ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**78**)



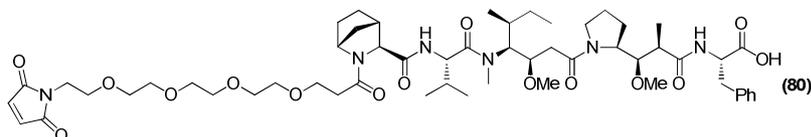
El compuesto (78) se preparó mediante el método descrito para el compuesto (77) utilizando ácido 3-(2-(2-(maleimido)etoxi)etoxi)propanoico (2,6 mg, 0,010 mmol) en lugar de ácido 3-(2-(maleimido)etoxi)propanoico. MS *m/z* 981,5 (M+H). Tiempo de retención 1,140 min.

- 5 **Ejemplo de carga 57:** Ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)propanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (79)



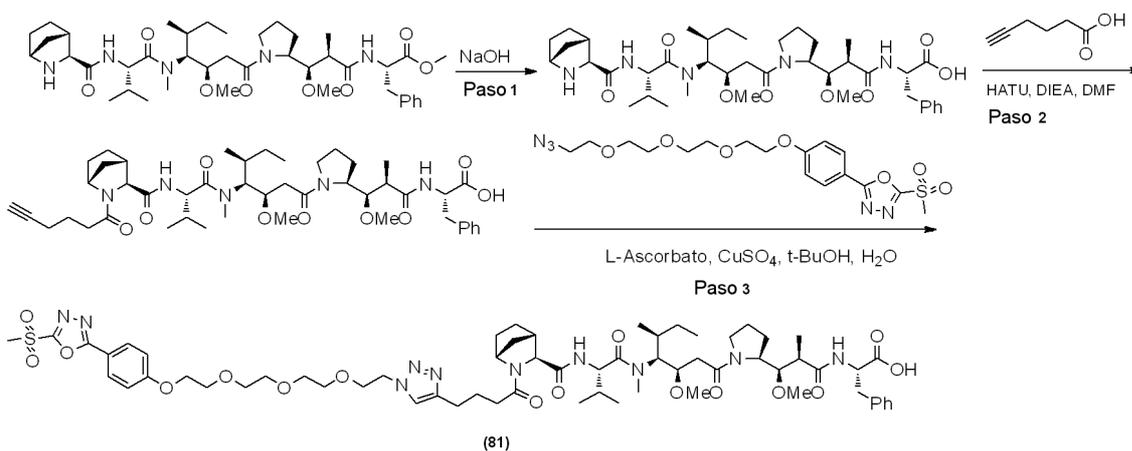
- 10 El compuesto (79) se preparó mediante el método descrito para el compuesto (77) utilizando ácido 3-(2-(2-(2-(maleimido)etoxi)etoxi)etoxi)propanoico (3,1 mg, 0,010 mmol) en lugar de ácido 3-(2-(maleimido)etoxi)propanoico. MS *m/z* 1025,5 (M+H). Tiempo de retención 1,143 min.

- 15 **Ejemplo de carga 58:** Ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oi)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (80)



- 20 El compuesto (80) se preparó mediante el método descrito para el compuesto (77) utilizando ácido 1-(maleimido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oico (3,6 mg, 0,010 mmol) en lugar de ácido 3-(2-(maleimido)etoxi)propanoico. MS *m/z* 1069,5 (M+H). Tiempo de retención 1,144 min.

- 25 **Ejemplo de carga 59:** Ácido (S)-2-((2*R*,2*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(4-(1-(2-(2-(2-(4-(5-(metilsulfonyl)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)butanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (81)



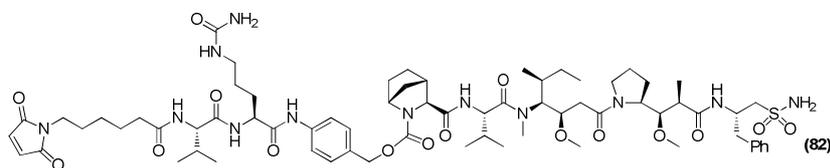
- 30 **Paso 1:** Se disolvió (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoato de metilo (1) (63 mg, 0,080 mmol) en ACN (0,75 mL) y agua (0,5 mL). Se añadió NaOH (1 M, 0,35 mL). La reacción se agitó 2 h a t.a. Después de neutralizarla con HCl 1 N hasta aproximadamente pH 5, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se liofilizó para proporcionar ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico crudo. MS *m/z* 742,4 (M+1). Tiempo de retención 1,010 min. El producto se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

- 40 **Paso 2:** A una solución de ácido hex-5-inoico (5,4 mg, 0,049 mmol) en DMF (2 mL) se añadió DIEA (26,1 mg, 0,35 mmol) y HATU (16,9 mg, 0,044 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 15 min. A continuación, se añadió el producto

obtenido en el paso 1 (30 mg, 0,040 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 2 h. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener ácido (*S*)-2-(2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(hex-5-inoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico. MS *m/z* 836,5 (*M*+1). Tiempo de retención 1,224 min.

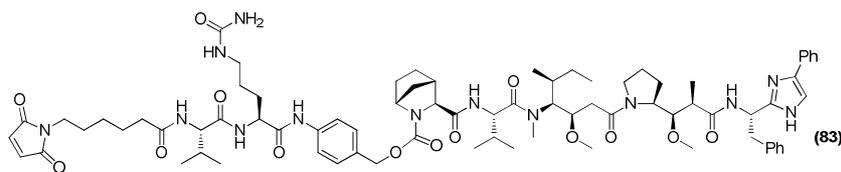
Paso 3: Se suspendieron ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(hex-5-inoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (7 mg, 0,0084 mmol) y 2-(4-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)fenil)-5-(metilsulfonyl)-1,3,4-oxadiazol (3,7 mg, 0,0084 mmol) en *t*-BuOH (1 mL) y agua (1 mL). Se añadieron L-ascorbato sódico (1,7 mg, 0,0084 mmol) en 0,3 mL de H₂O y CuSO₄ (0,3 mg, 0,0017 mmol) en 0,3 mL de H₂O secuencialmente utilizando una jeringa y la reacción se agitó a t.a. durante 3 h. La mezcla de reacción se purificó mediante preparativa (10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**81**) como un sólido blanco. MS *m/z* 639,4 (*M*/2+1). Tiempo de retención 1,196 min.

Ejemplo de carga 60: (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-Metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo (**82**)



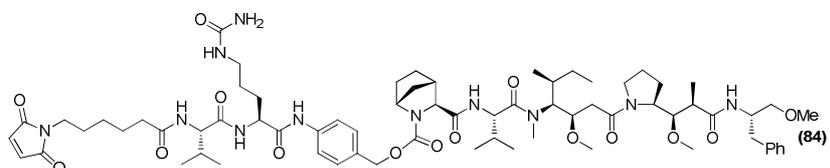
Se combinaron (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**56**), 8,7 mg, 0,011 mmol), MC-Val-Cit-PABC-PNP (9,7 mg, 0,013 mmol), HOAT (1,7 mg, 0,011 mmol) y DIEA (0,013 ml, 0,077 mmol) en piridina (0,5 mL) y DMF (2 mL). La reacción se agitó durante 4 h a t.a. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa (10-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (**82**) como un sólido blanco. MS *m/z* 695,5 (*M*/2+1). Tiempo de retención 1,139 min.

Ejemplo de carga 61: (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-Metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(4-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo (**83**)



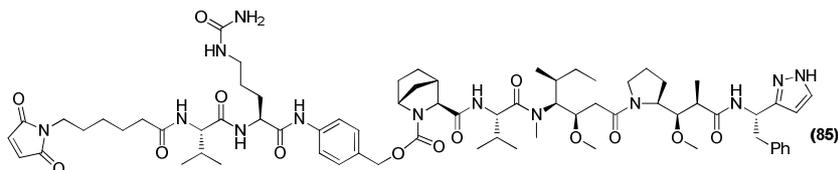
El compuesto (**83**) se preparó mediante el método descrito para el compuesto (**82**) utilizando (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1*H*-imidazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**57**) en lugar del compuesto (**56**). MS *m/z* 720,0 (*M*/2+1). Tiempo de retención 1,169 min.

Ejemplo de carga 62: (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-(((*S*)-1-metoxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo (**84**)



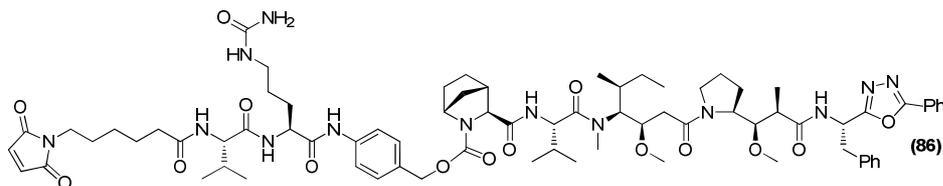
El compuesto **(84)** se preparó mediante el método descrito para el compuesto **(82)** utilizando (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-3-(((*S*)-1-metoxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **(58)** en lugar del compuesto **(56)**. MS *m/z* 671,0 (*M*/*2*+1). Tiempo de retención 1,236 min.

Ejemplo de carga 63: (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo **(85)**



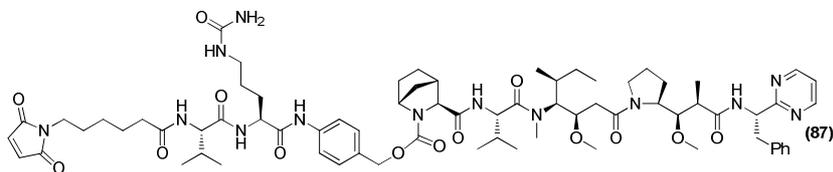
El compuesto **(85)** se preparó mediante el método descrito para el compuesto **(82)** utilizando (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(1*H*-pirazol-3-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **(59)** en lugar del compuesto **(56)**. MS *m/z* 682,1 (*M*/*2*+1). Tiempo de retención 1,172 min.

Ejemplo de carga 64: (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo **(86)**



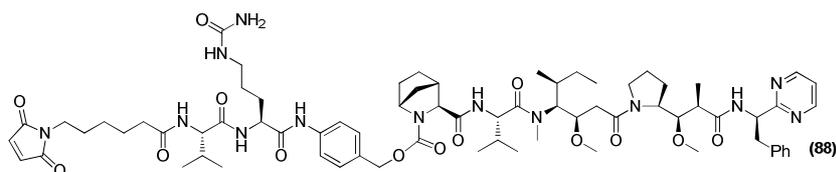
El compuesto **(86)** se preparó mediante el método descrito para el compuesto **(83)** utilizando (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **(62)** en lugar del compuesto **(56)**. MS *m/z* 721,1 (*M*/*2*+1). Tiempo de retención 1,280 min.

Ejemplo de carga 65: (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo **(87)**



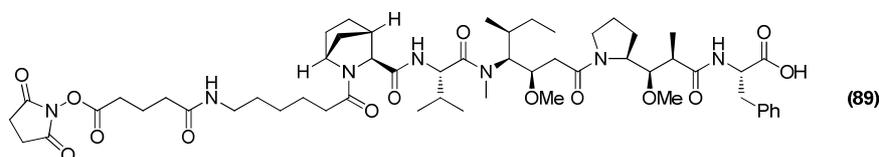
El compuesto **(87)** se preparó mediante el método descrito para el compuesto **(82)** utilizando (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*S*)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **(60)** en lugar del compuesto **(56)**. Tiempo de retención 1,204 min.

Ejemplo de carga 66: (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-Metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((*R*)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo **(88)**



El compuesto (**88**) se preparó mediante el método descrito para el compuesto (**82**) utilizando (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-((*R*)-2-fenil-1-(pirimidin-2-il)etil)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**61**) en lugar del compuesto (**56**). MS *m/z* 688,0 (*M*+1). Tiempo de retención 1,221 min.

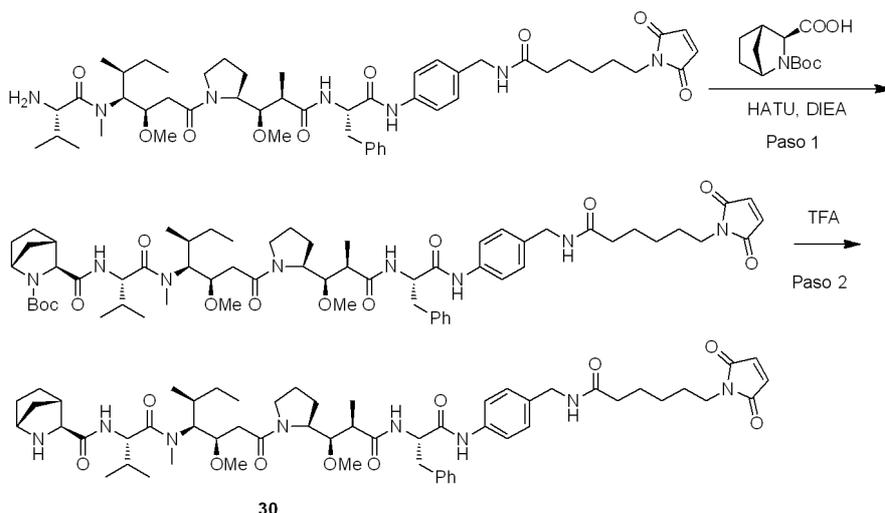
Ejemplo de carga 67: Ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(5-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-5-oxopentanamido)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**89**)



Una solución de ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-aminoheptanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (paso 2, Ejemplo 44) 20 mg, 0,021 mmol) y DIEA (0,018 mL, 0,10 mmol) en DMF (1 mL) se añadió a glutarato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-il) (10,1 mg, 0,031 mmol) y DIEA (0,018 mL) en DMF (1 mL). La reacción se agitó durante 2 h a t.a. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener ácido (S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(5-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-5-oxopentanamido)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**89**). MS *m/z* 1066,5 (*M*+1). Tiempo de retención 1,103 min.

Procedimiento sintético para los compuestos de Fórmula (I) conectados en el extremo C terminal ejemplo de Carga

Ejemplo de carga 68: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((S)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**30**)



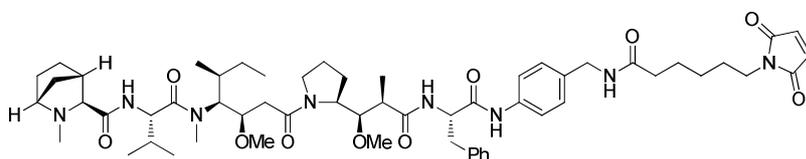
Paso 1: En un matraz de fondo redondo de 15 mL, se añadieron ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (12 mg, 0,050 mmol) y DIEA (0,032 mL, 0,18 mmol) en DMF (2,0 mL), seguidos de HATU (19 mg, 0,050 mmol). La solución resultante se agitó durante 5 minutos. A continuación, se añadió la sal de TFA de *N*-(4-((S)-2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-

metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)bencil)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida (48,5 mg, 0,047 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 10-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener

(1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo, MS *m/z* 1139,6 (M+1). Tiempo de retención 1,39 minutos.

Paso 2: En un matraz de fondo redondo de 15 mL se añadieron el producto obtenido en el paso 1 (42,6 mg, 0,037 mmol), TFA (2,0 mL) y DCM (4,0 mL), que dan como resultado una solución transparente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, momento en el cual un análisis LCMS mostró que el Boc se había eliminado completamente. La mezcla de reacción se concentró para obtener el compuesto **30** como sal de TFA, MS *m/z* 1039,6 (M+1). Tiempo de retención 1,06 minutos.

Ejemplo de carga 69: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**31**)

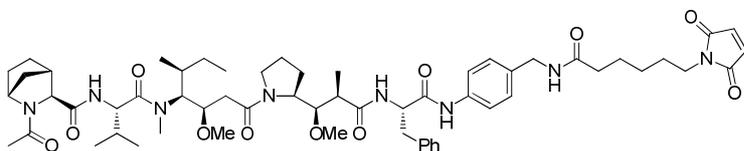


31

En un matraz de fondo redondo de 15 mL, se añadieron la sal de TFA de (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**30**) (20 mg, 0,017 mmol), paraformaldehído (5,9 mg, 0,21 mmol) y ácido acético (0,0029 mL, 0,050 mmol) en MeOH (2,0 mL). A la suspensión resultante se añadió NaCNBH₃ (6,6 mg, 0,11 mmol).

La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadieron formaldehído y NaCNBH₃ adicionales y la mezcla de reacción se calentó hasta 50 °C durante 1 hora hasta completar la reacción. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 10-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener el compuesto **31** como sal de TFA, MS *m/z* 1053,7 (M+1)). Tiempo de retención 1,07 minutos.

Ejemplo de carga 70: (1*R*,3*S*,4*S*)-2-Acetil-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**32**)

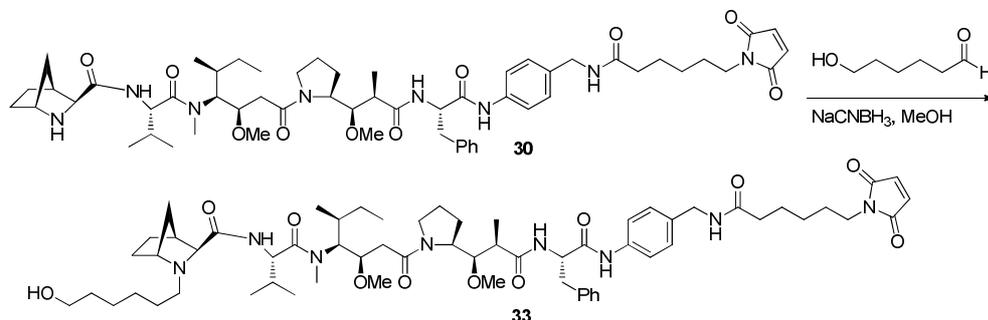


32

En un matraz de fondo redondo de 15 mL, se añadieron ácido acético (0,79 mg, 0,013 mmol), DIEA (1,7 mg, 0,013 mmol) y DMF (1,0 mL), seguidos de HBTU (2,2 mg, 0,0058 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos antes de añadir la sal de TFA de (2*S*,3*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3-metilpirrolidin-2-carboxamida (**30**) (5,5 mg, 0,0048 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener el compuesto **32**, MS *m/z* 1081,3 (M+1). Tiempo de retención 1,22 minutos.

Ejemplo de carga 71: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(6-hidroxi-hexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**33**)

5



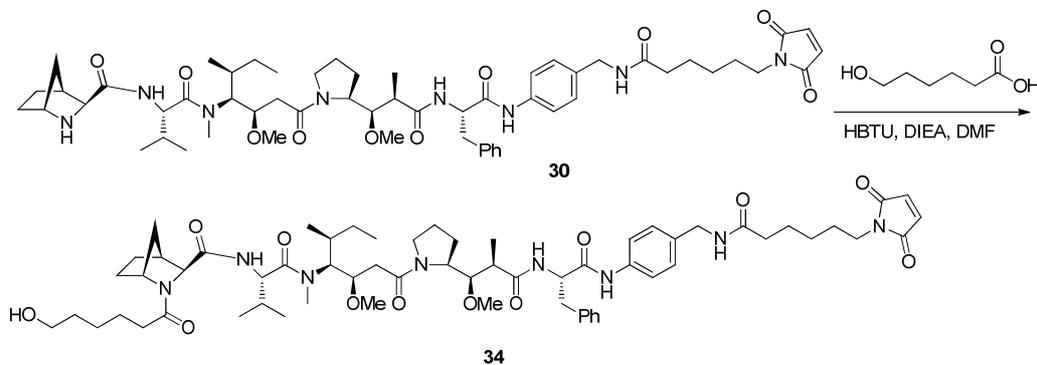
Al compuesto **30** (3,0 mg, 0,0029 mmol) en MeOH (1,0 mL) se añadió 6-hidroxi-hexanal (6,7 mg, 0,058 mmol), seguido de NaBH₃CN (9,1 mg, 0,14 mmol). Después de 30 minutos, se añadió NaBH₃CN (9,1 mg, 0,14 mmol) adicional. Después de otros 30 minutos, el análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(6-hidroxi-hexil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **33**, MS *m/z* 1139,6 (M+1). Tiempo de retención 1,10 minutos.

10

15

Ejemplo de carga 72: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(6-hidroxi-hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**34**)

20



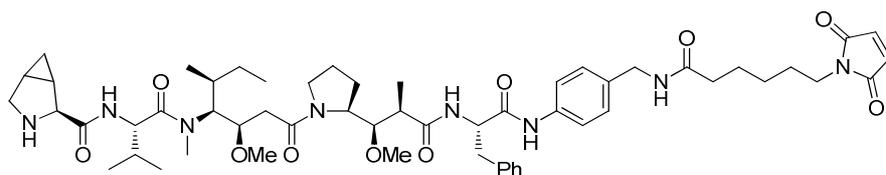
25

30

Al ácido 6-hidroxi-hexanoico (3,8 mg, 0,029 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron DIEA (7,5 mg, 0,058 mmol) y HBTU (9,1 mg, 0,024 mmol). Después de 10 minutos, se añadió el compuesto **30** (10 mg, 0,0096 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora, momento en el que el análisis LCMS indicó que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **34**, MS *m/z* 1153,5 (M+1). Tiempo de retención 1,20 minutos.

Ejemplo de carga 73: (2*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxamida (**35**)

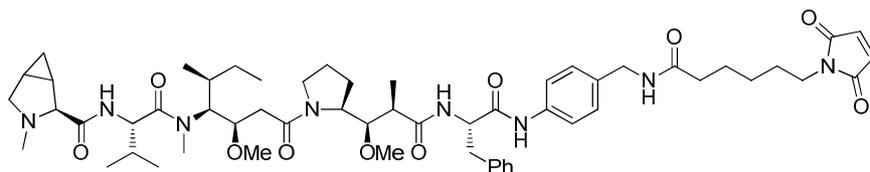
35



35

Este compuesto se sintetizó utilizando el mismo método que el descrito para el compuesto **30** utilizando ácido 3-(*tert*-butoxicarbonil)-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico (12,5 mg, 0,055 mmol), DIEA (28,5 mg, 0,22 mmol), HATU (21 mg, 0,055 mmol) y la sal de TFA de *N*-(4-((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)encil)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida (11 mg, 0,011 mmol). Después de la purificación, se obtuvo el intermedio protegido con Boc, MS *m/z* 1125,5 (*M*+1). Tiempo de retención 1,34 minutos. El producto así obtenido (10 mg, 0,0089 mmol) se trató con TFA (2,0 mL) en DCM (4,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y el análisis LCMS mostró que el Boc se había eliminado completamente. La solución se concentró para obtener el compuesto **35** como sal de TFA, MS *m/z* 1025,5 (*M*+1). Tiempo de retención 1,06 minutos.

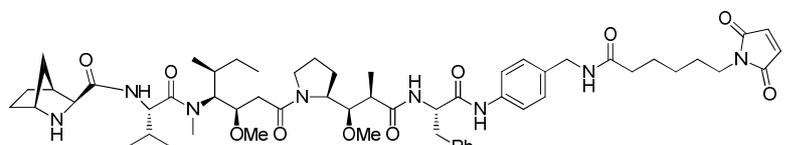
Ejemplo de carga 74: (2*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3-metil-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxamida (**36**)



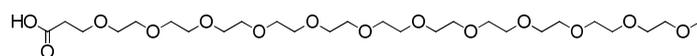
36

A la sal de TFA de la (2*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-2-carboxamida (**35**) (7,9 mg, 0,0062 mmol) y paraformaldehído (2,7 mg, 0,089 mmol) en MeOH (2,0 mL) se añadió NaCNBH₃ (11 mg, 0,018 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 horas. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 20-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron para obtener el compuesto **36** como sal de TFA, MS *m/z* 1039,5 (*M*+1). Tiempo de retención 1,07 minutos.

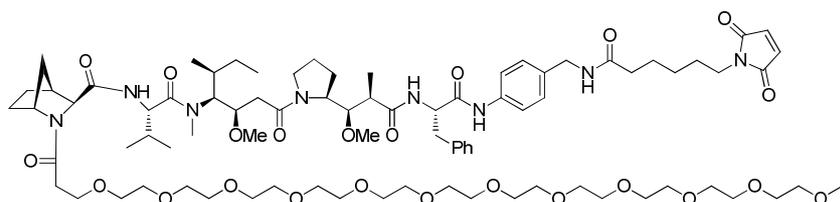
Ejemplo de carga 75: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**37**)



30



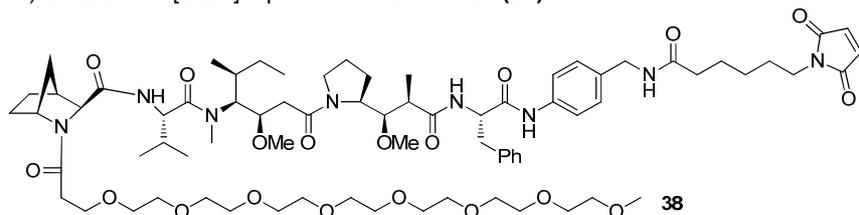
HATU, DIEA, DMF



37

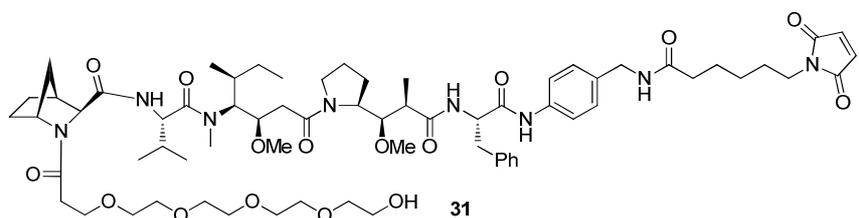
Al ácido 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oico (17,0 mg, 0,029 mmol) en DMF (1,5 mL) se añadieron DIEA (7,5 mg, 0,058 mmol) y HATU (9,2 mg, 0,024 mmol). Después de 10 minutos, se añadió el compuesto **30** (10,0 mg, 0,0096 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **37**, MS *m/z* 805,6 ((M+2)/2). Tiempo de retención 1,25 minutos.

Ejemplo de carga 76: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxahexacosan-26-oil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**38**)



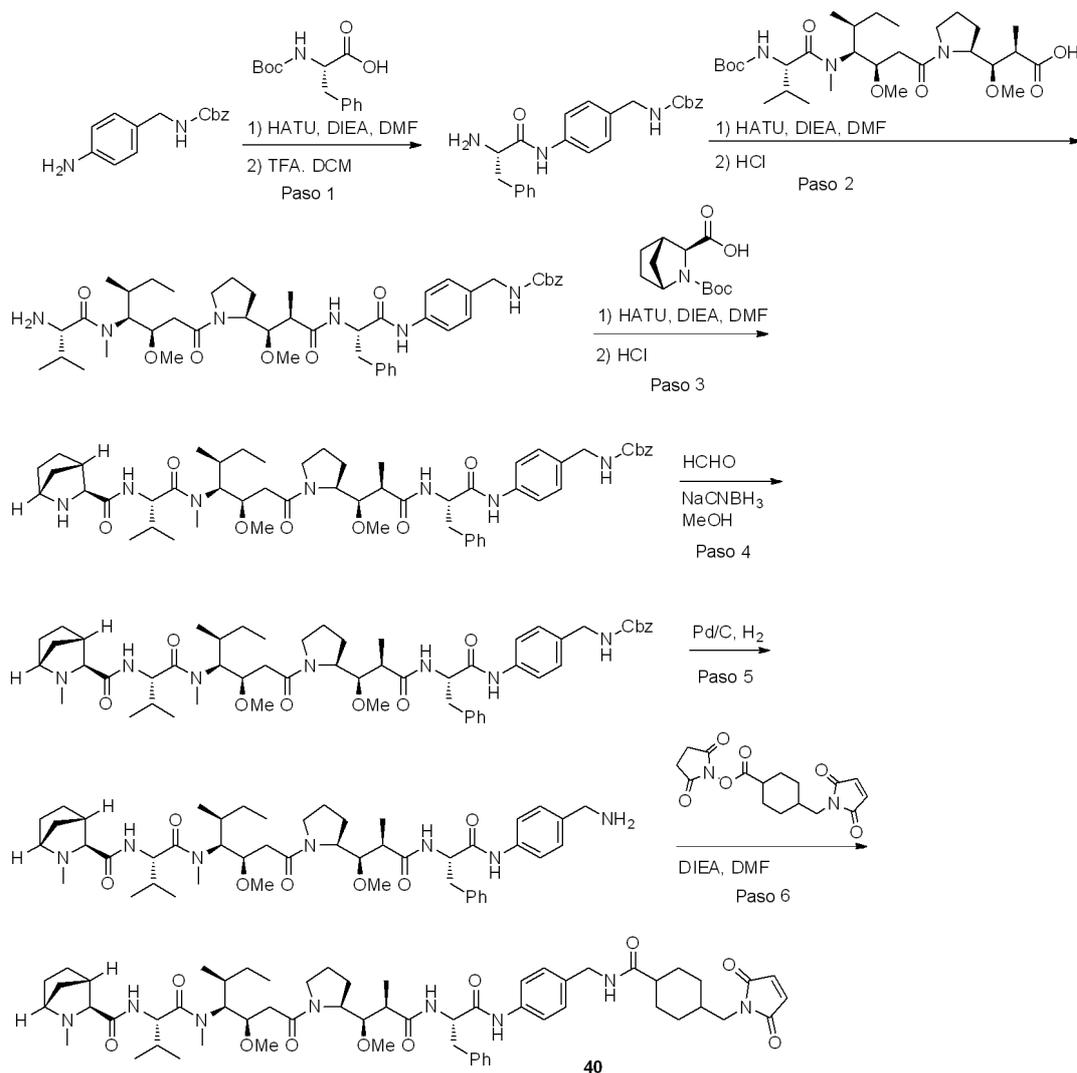
El compuesto **38** se sintetizó mediante el mismo método tal como se ha descrito para el compuesto **37** utilizando el compuesto **30** (10 mg, 0,0096 mmol) y ácido 2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxahexacosan-26-oico (11,91 mg, 0,029 mmol), MS *m/z* 717,5 ((M+2)/2). Tiempo de retención 1,25 minutos.

Ejemplo de carga 77: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-(1-hidroxi-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**39**)



El compuesto **39** se sintetizó mediante el mismo método descrito para el compuesto **37** utilizando el compuesto **30** (10 mg, 0,0096 mmol), ácido 1-hidroxi-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oico (7,7 mg, 0,029 mmol), DIEA (7,46 mg, 0,058 mmol) y HBTU (9,12 mg, 0,024 mmol) en DMF (1,5 mL), MS *m/z* 1287,6 (M+1)). Tiempo de retención 1,18 minutos.

Ejemplo de carga 78: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexanocarboxamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**40**)



Paso 1: Se disolvió ácido (*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonyl)amino)-3-fenilpropanoico (964 mg, 3,63 mmol) en DMF (10 mL). Se añadieron DIEA (1,27 g, 9,84 mmol) y HATU (1,13 g, 3,03 mmol). Después de 10 minutos, se añadió 4-aminobencilcarbamat de bencilo (388 mg, 1,51 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, momento en el que el análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. Se agregó EtOAc (60 mL) a la reacción. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (5 x 10 mL), se secaron con MgSO₄, se filtraron y se concentraron para proporcionar el producto crudo. El producto crudo se disolvió en DCM (5,0 mL) y se trató con TFA (5,0 mL). Después de 1 hora a temperatura ambiente, el análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. Los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se purificó con ISCO utilizando un 0-8% de MeOH con amoniaco 2 M en DCM para obtener (*S*)-4-(2-amino-3-fenilpropanamido)bencilcarbamat de bencilo como un sólido blanco, MS *m/z* 404,2(M+1). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,44-7,23 (m, 14H), 5,10 (s, 2H), 4,26 (s, 2H), 4,12 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 3,28-3,22 (m, 1H), 3,15-3,10 (m, 1H).

Paso 2: Se disolvieron (*S*)-4-(2-amino-3-fenilpropanamido)bencilcarbamat de bencilo (201,7 mg, 0,50 mmol) y ácido (*2R*, *3R*)-3-((*S*)-1-((*3R*,*4S*,*5S*)-4-((*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonyl)amino)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (429 mg, 0,75 mmol) en DMF (6 mL). A continuación, se añadieron DIEA (323 mg, 2,50 mmol) y HATU (342 mg, 0,90 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC en fase inversa para proporcionar 4-((*S*)-2-((*2R*,*3R*)-3-((*S*)-1-((*3R*,*4S*,*5S*)-4-((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)bencilcarbamat de bencilo, MS *m/z* 957,5 (M+1), Tiempo de retención 1,54 minutos. El producto protegido con Boc (393 mg, 0,41 mmol) se disolvió en HCl metanólico (3 M, 15 mL). El disolvente se evaporó lentamente a presión reducida. El análisis LCMS indicó que la reacción de desprotección se había completado. Se añadieron acetonitrilo y agua y la solución resultante se liofilizó para obtener 4-((*S*)-2-((*2R*,*3R*)-3-((*S*)-1-((*3R*,*4S*,*5S*)-4-((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-

metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)bencilcarbamato de bencilo como una sal de HCl, MS *m/z* 857,5 (M+1). Tiempo de retención 1,16 minutos.

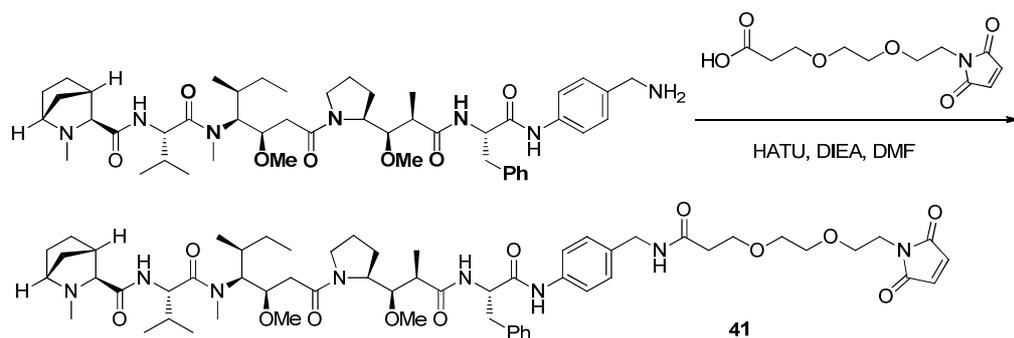
Paso 3: Se disolvió ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (190mg, 0,788 mmol) en DMF (5,0 mL). Se añadieron DIEA (254 mg, 1,97 mmol) y HATU (270 mg, 1,71 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos y se añadió 4-((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)bencilcarbamato de bencilo (336 mg, 0,394 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, momento en el que el análisis LCMS indicó que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-(((benciloxi)carbonil)amino)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo, MS *m/z* 1080,5 (M+1), Tiempo de retención 1,56 minutos. El producto protegido con Boc (88 mg, 0,081 mmol) se disolvió en HCl metanólico (3 M, 6,0 mL). El disolvente se evaporó lentamente a presión reducida. El análisis LCMS indicó que la reacción de desprotección se había completado. Se añadieron acetonitrilo y agua y la solución resultante se liofilizó para obtener 4-((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)bencilcarbamato de bencilo como una sal de HCl, MS *m/z* 980,5 (M+1).

Paso 4: Se disolvió 4-((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)bencilcarbamato de bencilo (65,8 mg, 0,067 mmol) en MeOH (4 mL). Se añadieron paraformaldehído (22,8 mg, 0,76 mmol) y ácido acético (0,023 mL, 0,40 mmol), seguidos de cianoborohidruro sódico (47,7 mg, 0,76 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 50 °C durante 1 hora. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener 4-((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)bencilcarbamato de bencilo MS *m/z* 994,5 (M+1). Tiempo de retención 1,21 minutos.

Paso 5: Se disolvió 4-((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanamido)bencilcarbamato de bencilo (48 mg, 0,048 mmol) en MeOH (5,0 mL) y se volatilizó en N₂. Se añadió Pd/C (20,5 mg, 10% de Pd). El recipiente de reacción se evacuó y se rellenó de nuevo con H₂. Esta operación se repitió cinco veces para reemplazar la atmósfera de la reacción con H₂. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en H₂. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró y se concentró para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-(aminometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida, MS *m/z* 860,5 (M+1). Tiempo de retención 0,86 minutos. El producto así obtenido se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

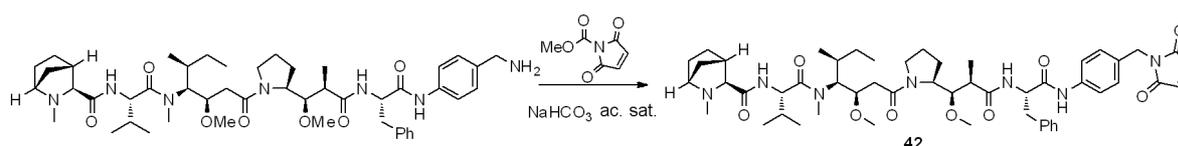
Paso 6: Se disolvieron (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-(aminometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (12 mg, 0,014 mmol) y 4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexanocarboxilato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (5.6 mg, 0.017 mmol) en DMF (1 mL), y se añadió DIEA (10,8 mg, 0,084 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **40**, MS *m/z* 1079,5 (M+1). Tiempo de retención 1,12 minutos.

Ejemplo de carga 79: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**41**)



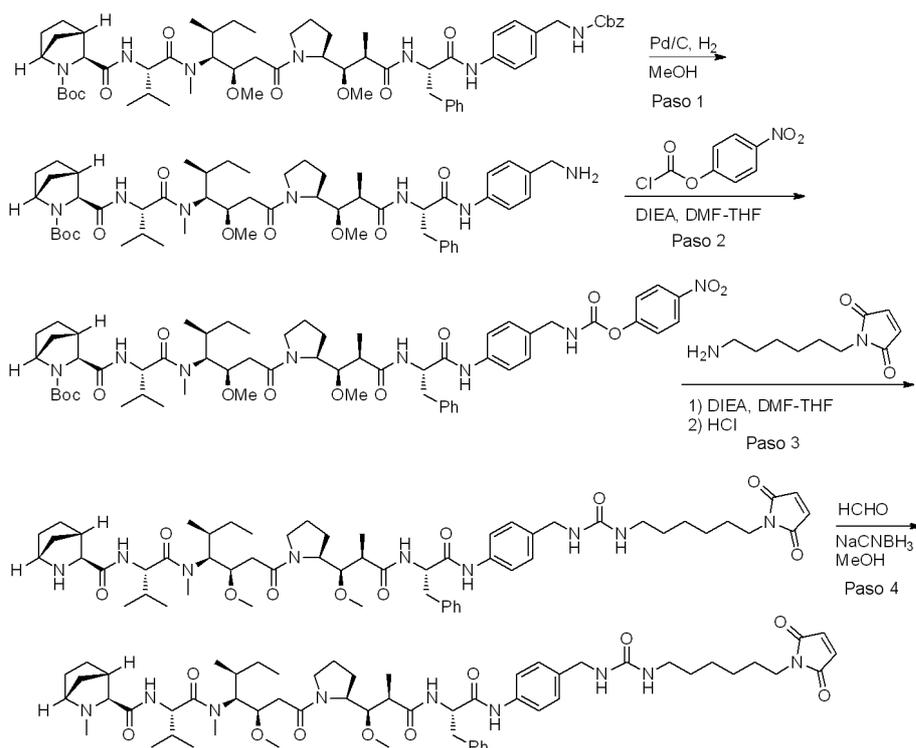
Al ácido 3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)propanoico (7,2 mg, 0,028 mmol) en DMF (1,5 mL) se añadieron DIEA (10,8 mg, 0,084 mmol) y HATU (8,0 mg, 0,021 mmol). Después de 10 minutos, se añadió (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-((4-(aminometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (12 mg, 0,014 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **41**, MS *m/z* 1099,5 (M+1). Tiempo de retención 1,07 minutos.

Ejemplo de carga 80: (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-((4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**42**)



A NaHCO₃ acuoso saturado (3,0 mL) se añadió (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-((4-(aminometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (20,0 mg, 0,023 mmol). La suspensión resultante se enfrió hasta 0 °C y se añadió 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxilato de metilo (14,4 mg, 0,093 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1,5 horas. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **42**, MS *m/z* 940,5 (M+1). Tiempo de retención 1,13 minutos.

Ejemplo de carga 81: (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-((4-(3-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexil)ureido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**43**)



Paso 1: Se disolvió (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-(((benciloxi)carbonil)amino)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo (211 mg, 0,195 mmol) en MeOH (10 mL). Se añadió Pd/C (41,6 mg, 10% de Pd). El recipiente de reacción se evacuó y se rellenoó de nuevo con H₂. Esta operación se repitió cinco veces para reemplazar la atmósfera de la reacción con H₂. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente en H₂. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró y se concentró para proporcionar (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-(aminometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo, MS *m/z* 946,6 (M+1), que se utilizó en el paso siguiente sin purificación.

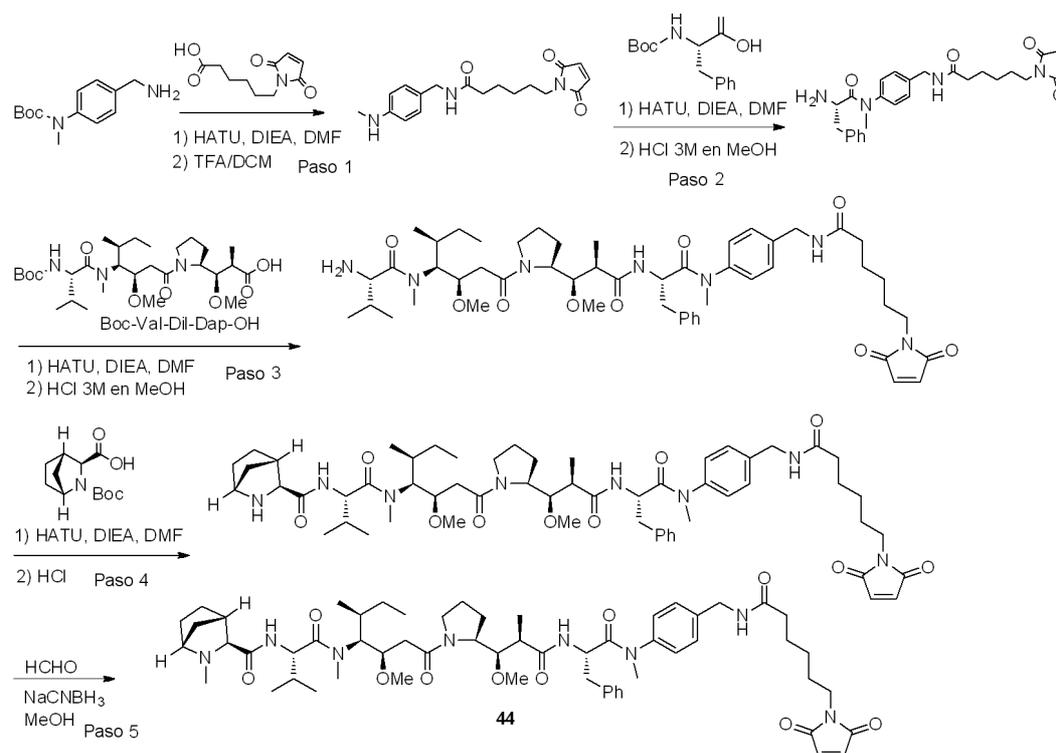
Paso 2: Se disolvió (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-(aminometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo (30 mg, 0,032 mmol) en DMF (3 mL) y THF (3 mL). A continuación, se añadieron DIEA (20,5 mg, 0,16 mmol) y carbonocloridrato de 4-nitrofenilo (12,8 mg, 0,063 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El análisis LC/MS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-(((*S*)-1-((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)amino)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo, MS *m/z* 1111,5 (M+1). Tiempo de retención 1,54 minutos.

Paso 3: A (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-3-metoxi-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-metoxi-2-metil-3-(((*S*)-1-((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)amino)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo (13,7 mg, 0,012 mmol) disuelto en DMF (1,0 mL) y THF (1,0 mL) se añadieron 1-(6-aminohexil)-1*H*-pirrol-2,5-diona (14,5 mg, 0,074 mmol) y DIEA (31,9 mg, 0,25 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-3-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((3-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexil)ureido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-

il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato de *tert*-butilo, MS m/z 1168,6 (M+1). El producto protegido con Boc así obtenido se disolvió en HCl metanólico (3 M, 2,0 mL). El disolvente se eliminó lentamente a presión reducida. El análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El residuo se disolvió en acetonitrilo y agua y se liofilizó para proporcionar (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((3-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexil)ureido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida como sal de HCl, MS m/z 1068,6 (M+1). Tiempo de retención 1,09 minutos.

Paso 4: Se disolvió (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((3-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexil)ureido)metil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (8,4 mg, 0,0079 mmol) en MeOH (1,5 mL). Se añadieron paraformaldehído (2,7 mg, 0,089 mmol) y ácido acético (0,0027 mL, 0,046 mmol), seguidos de cianoborohidruro sódico (5,6 mg, 0,089 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 50 °C durante 1 hora con agitación. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **43**, MS m/z 1082,6 (M+1). Tiempo de retención 1,11 minutos.

Ejemplo de carga 82: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-((4-((6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)metil)fenil)(metil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**44**)



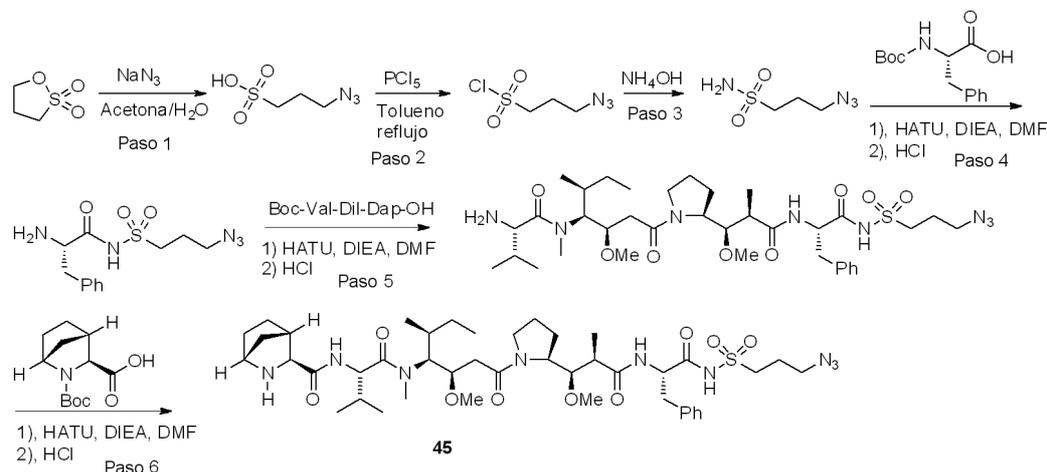
Paso 1: Se disolvió ácido 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoico (349 mg, 1,65 mmol) en DMF (10 mL). A continuación, se añadieron DIEA (820 mg, 6,35 mmol) y HATU (579 mg, 1,52 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió entonces (4-(aminometil)fenil)(metil)carbamoilato de *tert*-butilo (300 mg, 1,27 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó EtOAc (30 mL) a la reacción. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL). La fase orgánica combinada se lavó con H₂O (5 x 10 mL), se secó con MgSO₄, se concentró y se purificó con ISCO (EtOAc/Hexano 0-80%). El producto deseado, MS m/z 374,2 (M+1-tBu), tiempo de retención 1,156 minutos, se obtuvo como un aceite amarillo. El producto se disolvió en DCM (3 mL) y se trató con TFA (1 mL). Después de 1 hora a temperatura ambiente, los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se recuperó en acetonitrilo y H₂O y se liofilizó para obtener 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-*N*-(4-(metilamino)encil)hexanamida como un sólido amarillo (MS m/z 330,2 (M+1), Tiempo de retención 0,61 minutos).

Paso 2: A ácido (*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (219 mg, 0,827 mmol) disuelto en DMF (5 mL) se añadieron DIEA (356 mg, 2,76 mmol) y HATU (288 mg, 0,758 mmol). Después de agitar durante 10 minutos a temperatura ambiente, se añadió 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-*N*-(4-(metilamino)bencil)hexanamida (227 mg, 0,689 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agregó EtOAc (20 mL) a la reacción. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL). La fase orgánica combinada se lavó con H₂O (5 x 10 mL), se secó con MgSO₄ anhidro, se concentró y se purificó con ISCO (EtOAc/Hexano 0-75%), lo que proporcionó el producto deseado. MS *m/z* 577,3 (M+1). Tiempo de retención 1,19 minutos. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,00 (s, 1H), 8,24 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,32-7,09 (m, 7H), 7,01 (s, 2H), 4,31 (m, 1H), 4,19 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,38 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,17 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,00 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,10 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,54-1,44 (m, 4H), 1,31 (s, 9H), 1,22-1,15 (m, 4H). El producto se disolvió en HCl 3 M en MeOH (5 mL). Los disolventes se eliminaron lentamente a presión reducida. El residuo se recuperó en acetonitrilo y H₂O y se liofilizó para obtener (*S*)-*N*-(4-(2-amino-*N*-metil-3-fenilpropanamido)bencil)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida en forma de sal de HCl. MS *m/z* 477,2 (M+1). Tiempo de retención 0,83 minutos.

Paso 3: A Boc-Val-Dil-Dap-OH (347 mg, 0,607 mmol) disuelto en DMF (4 mL) se añadieron DIEA (261 mg, 2,02 mmol) y HATU (282 mg, 0,49 mmol). Después de agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadió (*S*)-*N*-(4-(2-amino-*N*-metil-3-fenilpropanamido)bencil)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida (193 mg, 0,404 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC en fase inversa para proporcionar el producto deseado *N*-(4-(((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-(((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-(((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-*N*-metil-3-fenilpropanamido)bencilo)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida. MS *m/z* 1030,5 (M+1). Tiempo de retención 1,430 minutos. El producto se disolvió en HCl metanólico 3 M (3 mL). Los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se recuperó en acetonitrilo y H₂O y se liofilizó para obtener el producto deseado *N*-(4-(((*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-(((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-(((*S*)-2-amino-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-*N*-metil-3-fenilpropanamido)bencilo)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida en forma de sal de HCl. MS *m/z* 930,5 (M+1). Tiempo de retención 1,07 minutos.

Pasos 4-5: Siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación del compuesto **30** y el compuesto **31**, se obtuvo el compuesto **44**. MS *m/z* 1067,6 (M+1). Tiempo de retención 1,10 minutos.

Ejemplo de carga 83: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-(4-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-(((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-*N*-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**45**)



Paso 1: A una solución agitada de azida sódica (3,50 g, 53,8 mmol) en agua (25 mL) se añadió una solución de 1,3-propanosulfona (6,10 g, 50,0 mmol) en acetona (25 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y se concentró a sequedad. El sólido resultante se suspendió en éter dietílico (100 mL) y se agitó a reflujo durante 1 hora. La suspensión se enfrió hasta temperatura ambiente y el sólido se recogió por filtración, se lavó con acetona y éter dietílico y se secó al vacío, lo que proporcionó ácido 3-azido-1-propanosulfónico. MS *m/z* 188,1(M+1). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 3,47 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,87 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,07-2,00 (m, 2H).

Paso 2: Se suspendió ácido 3-azido-1-propanosulfónico (2,07 g, 13,0 mmol) en tolueno. Se añadió PCl₅ (2,61 g, 13,0 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró para eliminar componentes insolubles. La masa retenida sobre el filtro se lavó con DCM. Los filtrados

combinados se concentraron para proporcionar cloruro de 3-azidopropano-1-sulfonilo como un aceite amarillo oscuro, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

Paso 3: A NH_4OH (5 mL) enfriado a 0°C se añadió cloruro de 3-azidopropano-1-sulfonilo (1,75 g, 9,53 mmol). Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó a la misma temperatura durante 3 horas. La mezcla oleosa se volvió transparente. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc tres veces. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con MgSO_4 anhidro y se concentró. El disolvente residual se eliminó además bajo alto vacío durante 18 horas para proporcionar 3-azidopropano-1-sulfonamida. MS m/z 187,1 (M+1). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 4,83 (s, 2H), 3,51 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,23 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,17-2,10 (m, 2H).

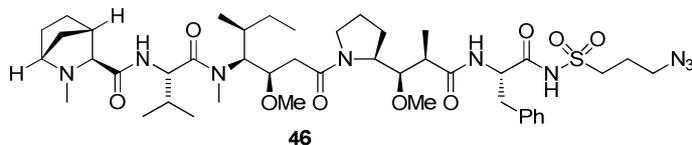
Paso 4: Se disolvió ácido (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (100 mg, 0,38 mmol) en DMF (4 mL) seguido de la adición de DIEA (0,395 mL, 2,26 mmol) y HATU (358 mg, 0,940 mmol). Después de 15 minutos, se añadió 3-azidopropano-1-sulfonamida (186 mg, 1,13 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas, momento en el que el análisis LCMS indicó que la reacción estaba completa. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo- H_2O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener (S)-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato de *tert*-butilo. MS m/z 312,1 (M+1-Boc). Tiempo de retención 1,15 minutos. El producto así obtenido (72,4 mg, 0,176 mmol) se disolvió en HCl metanólico 3 M (5 mL). El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se recuperó en acetonitrilo y H_2O y se liofilizó para proporcionar (S)-2-amino-*N*-((3-azidopropil)sulfonil)-3-fenilpropanamida como un sólido rosado amarillento. MS m/z 312,1 (M+1). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,42-7,31 (m, 5H), 4,16-4,13 (m, 1H), 3,51-3,47 (m, 4H), 3,32-3,26 (m, 1H), 3,13-3,08 (m, 1H), 2,00-1,94 (m, 2H).

Paso 5: A Boc-Val-Dil-Dap-OH (195 mg, 0,34 mmol) disuelto en DMF (4 mL) se añadieron DIEA (132 mg, 1,02 mmol) y HATU (108 mg, 0,28 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de añadir (S)-2-amino-*N*-((3-azidopropil)sulfonil)-3-fenilpropanamida (59,2 mg, 0,17 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas más a temperatura ambiente. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa para proporcionar el producto deseado (95 mg, 65% de rendimiento, MS m/z 865,4 (M+1), Tiempo de retención 1,43 minutos). El producto se disolvió en HCl 3 M en MeOH (3 mL). Los disolventes se eliminaron al vacío. A continuación, se añadieron acetonitrilo y H_2O al residuo y la solución se liofilizó para obtener el producto deseado, (S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((S)-*N*-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano. MS m/z 765,4 (M+1). Tiempo de retención 1,04 minutos.

Paso 6: A ácido (1*R*,3*S*,4*S*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (16,5 mg, 0,068 mmol) en DMF (2,0 mL) se añadieron DIEA (17,6 mg, 0,137 mmol) y HATU (21,6 mg, 0,057 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de añadir (S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((S)-*N*-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-2-amino-3-metil-1-oxobutano (20 mg, sal de TFA, 0,023 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, momento en el que el análisis LCMS indicó que la reacción estaba completa.

El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de ACN- H_2O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((S)-*N*-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-((*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida. MS m/z 988,5 (M+1). Tiempo de retención 1,51 minutos. El producto así obtenido (9,4 mg, 0,0095 mmol) se disolvió en HCl metanólico (3 M, 2,0 mL). El disolvente se eliminó lentamente a presión reducida. El residuo se disolvió en acetonitrilo y H_2O y se liofilizó para proporcionar el compuesto **45** como una sal de HCl. MS m/z 888,5 (M+1). Tiempo de retención 1,10 minutos.

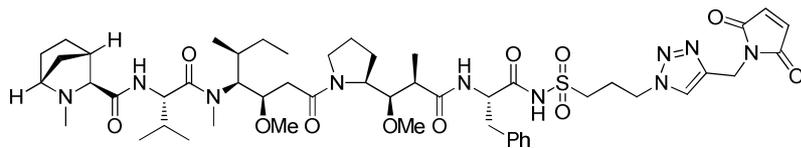
Ejemplo de carga 84: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((S)-*N*-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**46**)



La (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((S)-*N*-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**45**) (8,8 mg, 0,0099 mmol) se disolvió en MeOH (2,0 mL). Se añadieron paraformaldehído (10,1 mg, 0,337 mmol) y ácido acético (0,0102 mL), seguidos de cianoborohidruro

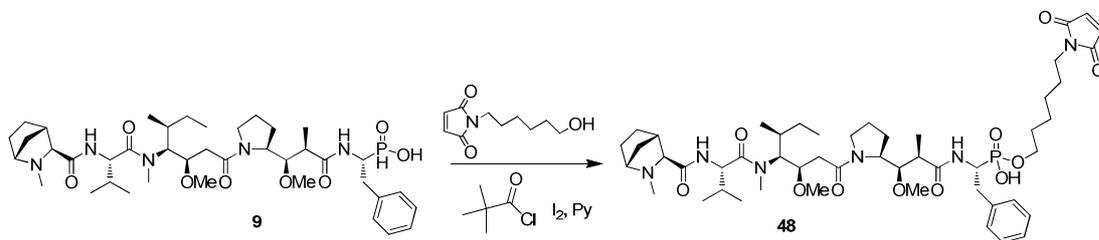
sódico (21,2 mg, 0,337 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C con agitación durante 1 hora. Se añadieron paraformaldehído (10,1 mg, 0,337 mmol), ácido acético (0,0102 mL) y cianoborohidruro sódico (21,2 mg, 0,337 mmol). Después de 1 hora a 50 °C, el análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de ACN-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **46**. MS *m/z* 902,5 (M+1). Tiempo de retención 1,12 minutos.

Ejemplo de carga 85: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-*N*-1-(3-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**47**)

**47**

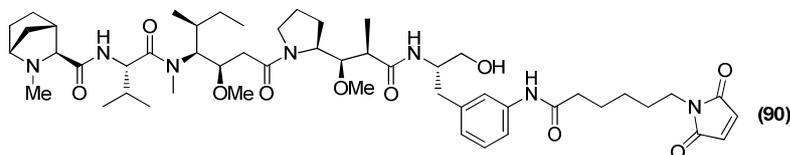
Una solución de (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-*N*-1-(3-azidopropilsulfonamido)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**46**) (5,2 mg, 0,0058 mmol), 1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirrol-2,5-diona (1,56 mg, 0,012 mmol) y CuSO₄ (0,7 mg, 0,004 mmol) en DMF (2,0 mL) y H₂O (0,5 mL) se trató con sal sódica del ácido L-ascórbico (2,5 mg, 0,014 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron CuSO₄ (0,7 mg, 0,004 mmol) y sal sódica del ácido L-ascórbico (2,5 mg, 0,014 mmol) adicionales. Después de 2 horas adicionales a temperatura ambiente, el análisis LCMS indicó que la reacción se había completado. El crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, utilizando una columna C18, se eluyó con un 10-90% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron para obtener el compuesto **47**. MS *m/z* 1037,4 (M+1). Tiempo de retención 1,00 minutos.

Ejemplo de carga 86: ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfonato de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexilhidrógeno (**48**).



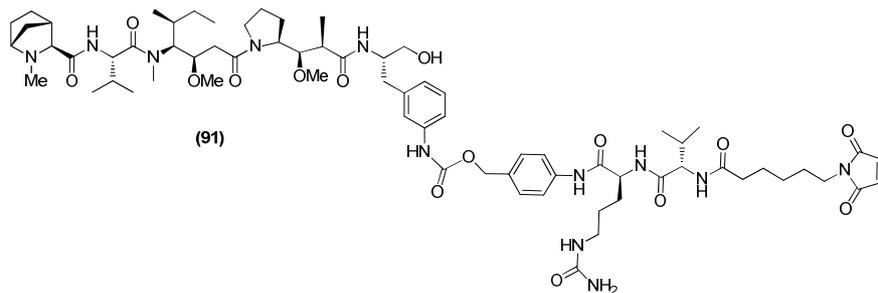
A ácido ((*R*)-1-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-2-feniletil)fosfínico (**9**) (10,2 mg, 0,011 mmol) en piridina (2 mL) se añadió 1-(6-hidroxihexil)-1*H*-pirrol-2,5-diona (13,5 mg, 0,068 mmol) y después cloruro de pivaloilo (40 mg, 0,332 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas y la reacción se monitorizó mediante LCMS hasta que desapareció un 90% del ácido fosfínico. A continuación, se añadió una solución de I₂ recién preparada en un 5% de H₂O en piridina. Una vez se completó el paso de oxidación, la piridina se eliminó mediante alto vacío. El crudo se disolvió en acetonitrilo y el crudo se purificó mediante HPLC en fase inversa, columna C18, se eluyó con un 10-60% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para obtener el compuesto **48**. MS *m/z* 971,5 (M+1). Tiempo de retención 1,038 minutos.

Ejemplo de carga 87: (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((*S*)-1-(3-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)fenil)-3-hidroxiopropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**90**)

**(90)**

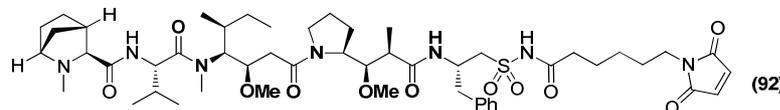
Se trató EMCA (1,3 mg, 0,006 mmol) en DMF (0,5 mL) con DIEA (0,006 mL, 0,03 mmol) y HATU (2,3 mg, 0,006 mmol) a t.a. durante 10 min, y a continuación se añadió la sal de TFA del compuesto **(52)** (6 mg, 0,006 mmol) en DMF (0,5 mL). La reacción se agitó a t.a. durante 16 h. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (10-45% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto **(90)** en forma de sal de TFA. MS m/z 950,6 (M+H).
5 Tiempo de retención 0,934 min.

Ejemplo de carga 88: (3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((1R,3S,4S)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-hidroxi-propil)fenil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo **(91)**
10



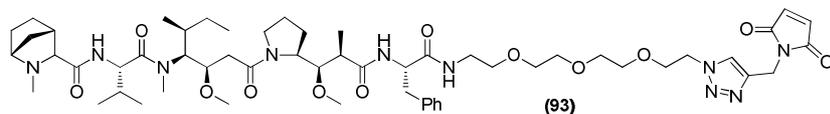
Se añadió piridina (0,25 mL) a la sal de TFA del compuesto **(52)** (6 mg, 0,006 mmol), MC-Val-Cit-PAB-PNP (13 mg, 0,018 mmol) en DMF (1 mL), seguida de HOAT (0,8 mg, 0,006 mmol) y DIEA (13 mg, 0,098 mmol). La reacción se agitó a 40 °C durante 48 h. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (25-40% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto **(91)** en forma de sal de TFA. MS m/z 678,6 (M/2+H). Tiempo de retención 0,959 min.
15

Ejemplo de carga 89: (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((S)-1-fenil-3-(N-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-sulfamoilpropan)-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **(92)**
20



Se disolvió EMCA (12,1 mg, 0,057 mmol) en DMF (1 mL). Se añadieron DIEA (0,0024 mL) y HATU (19,7 mg, 0,052 mmol). A continuación, se añadió (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((S)-1-fenil-3-sulfamoilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **(55)**, 26,4 mg, 0,029 mmol) en DMF (2 mL). La reacción se agitó a t.a. durante 2 h. A continuación, se añadieron EMCA (12,1 mg, 0,057 mmol), DIEA (0,0024 mL) y HATU (19,7 mg, 0,052 mmol) adicionales. Después de 2 h, se añadieron de nuevo EMCA (12,1 mg, 0,057 mmol), DIEA (0,0024 mL) y HATU (19,7 mg, 0,052 mmol). A continuación, la reacción se calentó a 50 °C durante 2 h. La reacción se enfrió y se añadieron EMCA (12,1 mg, 0,057 mmol), DIEA (0,0024 mL) y HATU (19,7 mg, 0,052 mmol) adicionales. La reacción se agitó durante 16 h a t.a. El LCMS indicó que aproximadamente un 20% del compuesto **(55)** se había convertido en el producto. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa (30-50% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((S)-1-fenil-3-(N-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)-sulfamoilpropan)-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **(92)**. MS m/z 998,5 (M+1). Tiempo de retención 1,041 min.
25
30
35
40

Ejemplo de carga 90: (1R,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((3R,4R,7S)-7-bencil-20-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-5,8-dioxo-2,12,15,18-tetraoxa-6,9-diazaicosan-3-il)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida **(93)**
45



Paso 1: Se trató ácido (S)-2-((t-butoxicarbonil)amino)-3-fenilpropanoico (175 mg, 0,66 mmol) en DMF (4 mL) con DIEA (0,48 mL, 2,75 mmol) y HATU (230 mg, 0,605 mmol) durante 15 min, seguidos de la adición de 2-(2-(2-(2-

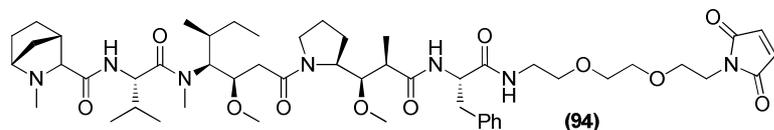
azidoetoxi)etoxi)etoxi)etanamina (120 mg, 0,55 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (S)-(1-azido-13-oxo-15-fenil-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-14-il)carbamato de *t*-butilo. MS *m/z* 466,3 (M+1). Tiempo de retención 1,170 min.

Paso 2: Se disolvió (S)-(1-azido-13-oxo-15-fenil-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-14-il)carbamato de *t*-butilo (117 mg, 0,251 mmol) en HCl metanólico (3 M, 5 mL). El disolvente se eliminó lentamente mediante evaporación, lo que dio como resultado la eliminación completa del grupo Boc. El disolvente residual se eliminó adicionalmente a presión reducida durante la noche para obtener (S)-2-amino-*N*-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etil)-3-fenilpropanamida como sal de HCl. MS *m/z* 366,1 (M+1). Tiempo de retención 0,858 min.

Paso 3: Se trató (2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (Paso 2, Ejemplo 12, 8 mg, 0,01 mmol) en DMF (1 mL) con DIEA (0,011 mL, 0,066 mmol) y HATU (4,63 mg, 0,012 mmol) durante 15 min, seguidos de la adición de (S)-2-amino-*N*-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etil)-3-fenilpropanamida (5,3 mg, 0,013 mmol) en DMF (1 mL). La reacción se agitó durante 2 h a t.a. El crudo se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (1*R*,4*S*)-*N*-(S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((3*R*,4*R*,7*S*)-20-azido-7-bencil-4-metil-5,8-dioxo-2,12,15,18-tetraoxa-6,9-diazaicosan-3-il)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida. MS *m/z* 956,5 (M+1). Tiempo de retención 1,051 min.

Paso 4: Al producto obtenido en el paso 3 (6,2 mg, 0,0058 mmol) y 1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirrol-2,5-diona (1,6 mg, 0,012 mmol) en *t*-BuOH (1 mL) y agua (1 mL) se añadieron L-ascorbato sódico (1,1 mg, 0,0058 mmol) en 0,2 mL de H₂O y se añadieron CuSO₄ (0,2 mg, 0,001 mmol) en 0,1 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 4 h y después se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto (93). MS *m/z* 1091,6 (M+1). Tiempo de retención 0,980 min.

Ejemplo de carga 91: (1*R*,4*S*)-*N*-(S)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((3*R*,4*R*,7*S*)-7-bencil-17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-4-metil-5,8-dioxo-2,12,15-trioxa-6,9-diazaheptadecan-3-il)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (94)



Paso 1: Se combinaron (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato de *t*-butilo (250 mg, 1,0 mmol) y 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-carboxilato de metilo (156 mg, 1,0 mmol) en NaHCO₃ acuoso saturado (10 mL) y se agitó durante 1,5 h a 0 °C. La mezcla de reacción se acidificó hasta pH 2 con ácido clorhídrico (2 M) y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con MgSO₄ y se concentró. El crudo se purificó con ISCO utilizando un 0-4% de MeOH/DCM para proporcionar (2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)carbamato de *t*-butilo como un aceite incoloro. MS *m/z* 229,2 (M+1-Boc). Tiempo de retención 0,963 min. ¹H RMN (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 6,71 (s, 2H), 5,04 (s a, 1H), 3,74 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 3,64 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 3,61-3,59 (m, 2H), 3,56-3,54 (m, 2H), 3,50 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,31-3,26(m, 2H), 1,44 (s, 9H).

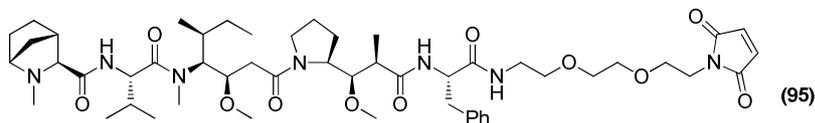
Paso 2: Se trató (2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)carbamato de *t*-butilo (184 mg, 0,56 mmol) en DCM (2 mL) con TFA (0,4 mL) a 0 °C durante 30 min y después a t.a. durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar 1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-1*H*-pirrol-2,5- en forma de sal de TFA. MS *m/z* 229,2 (M+1). Tiempo de retención 0,353 min.

Paso 3: Se activó Boc-L-Phe-OH (30 mg, 0,113 mmol) en DMF (1 mL) con DIEA (88 mg) y HATU (43 mg, 0,113 mmol) durante 15 min, y se añadió sal de TFA de 1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-1*H*-pirrol-2,5-diona (46,4 mg) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 2 h y después se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener (S)-(1-((2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato de *t*-butilo. MS *m/z* 476,2 (M+1). Tiempo de retención 1,091 min. Este producto (31 mg, 0,065 mmol) en DCM (2 mL) se trató con TFA (0,2 mL) a 0 °C durante 30 min y después a t.a. durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar (S)-2-amino-*N*-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)-3-fenilpropanamida como sal de TFA. MS *m/z* 376,2 (M+1). Tiempo de retención 0,649 min.

Paso 4: A la sal de TFA del ácido (2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((S)-*N*,3-dimetil-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanoico (Paso 2, Ejemplo 12) (7,2 mg, 0,010 mmol) en DMF (1 mL) se añadieron DIEA (7,7 mg) y HATU (4,18 mg, 0,011 mmol). La reacción se agitó durante 15 min, y se añadió la sal de TFA de (S)-2-amino-*N*-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)-3-fenilpropanamida (6,3 mg, 0,013 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de

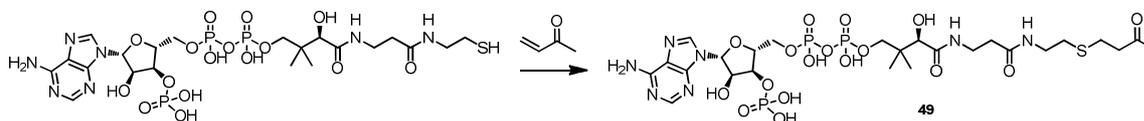
reacción se agitó a t.a. durante 2 h y se purificó mediante HPLC preparativa (20-70% de acetonitrilo-H₂O que contenía un 0,05% de TFA) para obtener el compuesto **(93)** en forma de sal de TFA. MS *m/z* 966,5 (M+1). Tiempo de retención 1,016 min.

- 5 **Ejemplo de carga 92:** (1*R*,3*S*,4*S*)-*N*-((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((3*R*,4*R*,7*S*)-7-bencil-14-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-4-metil-5,8-dioxo-2,12-dioxo-6,9-diazatetradecan-3-il)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-2-metil-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamida (**95**)



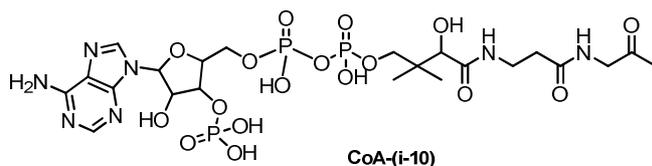
- 10 El compuesto **(95)** se preparó mediante el método descrito para el compuesto **(94)** utilizando (2-(2-aminoetoxi)etil)carbamato de *t*-butilo en lugar de (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato de *t*-butilo. MS *m/z* 922,5 (M+1). Tiempo de retención 1,044 min.

- 15 **Procedimiento sintético para los análogos de la Coenzima A**
Ejemplo de carga 93: Aducto con 3-buten-2-ona de Coenzima A (**49**)



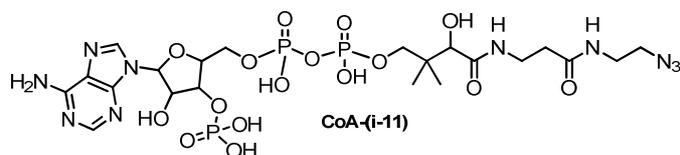
- 20 Se disolvió sal de trilitio de la Coenzima A (259 mg, Sigma, ensayo >93%) en 2,0 mL de tampón de fosfato con EDTA (fosfato 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5). A la mezcla de reacción se añadió 3-buten-2-ona (29,0 µL, Aldrich, 99%), y la mezcla de reacción se dejó reposar a 20 °C durante 75 minutos. La mezcla de reacción completa se cargó en una columna ISCO C18Aq Gold de 15,5 g que se preequilibró con un 100% de H₂O. El producto deseado se eluyó con un 100% de H₂O. Las fracciones que contenían el producto deseado puro se combinaron y se liofilizaron, lo que proporcionó el compuesto **49** como un sólido cristalino. MS (ESI+) *m/z* 838,2 (M+1). H-RMN (400MHz, D₂O) δ 8,525 (s, 1H), 8,235 (s, 1H), 6,140 (d, 1H, J=7,2Hz), 4,746 (m, 1H), 4,546 (s a, 1H), 4,195 (s a, 1H), 3,979 (s, 1H), 3,786 (dd, 1H, J= 4,8, 9,6Hz), 3,510 (dd, 1H, J=4,8, 9,6Hz), 3,429 (t, 2H, J= 6,6Hz), 3,294S (t, 2H, J=6,6Hz), 2,812 (t, 2H, J=6,8Hz), 2,676 (t, 2H, J=6,8Hz), 2,604 (t, 2H, J=6,8Hz), 2,420 (t, 2H, J=6,6Hz), 2,168 (s, 3H), 0,842 (s, 3H), 0,711 (s, 3H) (nota: algunos picos que solapan con D₂O no se indican).

- 30 **Ejemplo de carga 94:** Análogo de cetona-Coenzima A (**CoA-(i-10)**)



- 35 El compuesto **(i-10)** se convirtió en el análogo de CoA funcionalizada con cetona **CoA-(i-10)** haciendo reaccionar una concentración 5 mM del compuesto (i-10) con una concentración 25 mM de ATP en presencia de CoAA de *Staphylococcus aureus* 10 µM, CoAD de *Escherichia coli* 25 µM y CoAE de *Escherichia coli* 20 µM durante aproximadamente 14 h a 37 °C en tampón HEPES 50 mM (pH 8,0) que contenía 20 MgCl₂. La enzima soluble se separó por ultrafiltración a través de un filtro centrífugo Amicon Ultra con un límite de 10 kDa. La conversión enzimática del compuesto (i-10) en el análogo de CoA **CoA-(i-10)** se verificó mediante la formación del ADC de anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-10)-22 (remítase a la Tabla 9 y a la Tabla 10).

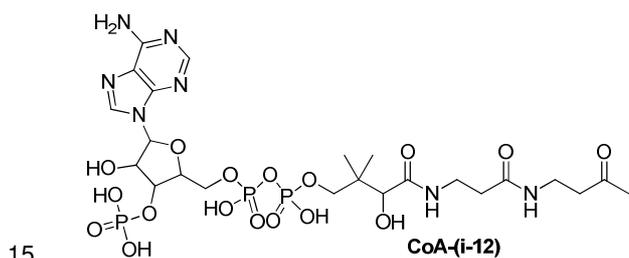
- Ejemplo de carga 95:** Análogo de azida-Coenzima A (**CoA-(i-11)**)



- 45 El compuesto **(i-11)** se convirtió en el análogo de CoA funcionalizado con azida **CoA-(i-11)** haciendo reaccionar una concentración 5 mM del compuesto (i-11) con una concentración 25 mM de ATP en presencia de CoAA de

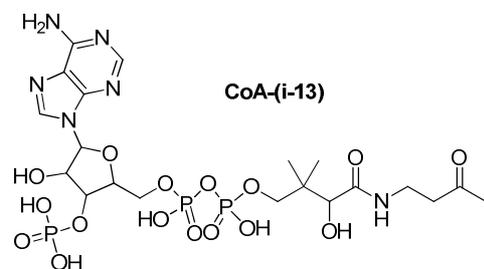
5 *Staphylococcus aureus* 10 μM , CoAD de *Escherichia coli* 25 μM y CoAE de *Escherichia coli* 20 μM durante aproximadamente 14 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ en tampón HEPES 50 mM (pH 8,0) que contenía 20 MgCl_2 . La enzima soluble se separó por ultrafiltración a través de un filtro centrífugo Amicon Ultra con un límite de 10 kDa. La conversión enzimática del compuesto (**i-11**) en el análogo de CoA **CoA-(i-11)** se verificó mediante análisis LC-MS después de la reacción de una pequeña fracción del ultrafiltrado con un exceso molar en un factor cinco del compuesto (**75**). La reacción de química click sin cobre se llevó a cabo durante 3 h a 23 $^{\circ}\text{C}$ en un 50% (v/v) de DMSO/ H_2O , y la mezcla de reacción se separó en una columna Acquity UPLC HSS T3 en fase inversa (100 \AA , 2.1 mm x 50 mm, Waters) utilizando un gradiente de elución de 1,35 min de un 10 a un 100% de acetonitrilo en agua que contenía un 0,05% de TFA con un caudal de 0,9 mL/min. El análisis espectral de masas reveló la presencia del aducto deseado con lo cual se confirmó la conversión del compuesto (**i-11**) con las tres enzimas biosintéticas de CoA en el análogo de CoA **CoA-(i-11)**. MS m/z 904,6 ((M+2)/2). Tiempo de retención 0,94 minutos.

Ejemplo de carga 96: Análogo de cetona-Coenzima A (CoA-(i-12))



20 El compuesto (**i-12**) se convirtió en el análogo de CoA funcionalizado con cetona **CoA-(i-12)** haciendo reaccionar una concentración 5 mM del compuesto (**i-12**) con una concentración 25 mM de ATP en presencia de CoAA de *Staphylococcus aureus* 10 μM , CoAD de *Escherichia coli* 25 μM y CoAE de *Escherichia coli* 20 μM durante aproximadamente 16 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ en tampón HEPES 50 mM (pH 8,0) que contenía 20 MgCl_2 . Después de la centrifugación de la mezcla de reacción a 20817 x g durante 2 min, la enzima soluble se separó mediante ultrafiltración a través de un filtro centrífugo Amicon Ultra con un límite de 10 kDa (15 min; 14000 x g). La conversión enzimática del compuesto (**i-12**) en el análogo de CoA **CoA-(i-12)** se verificó mediante la formación del ADC de anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-12)-22 (remítase a la Tabla 10).

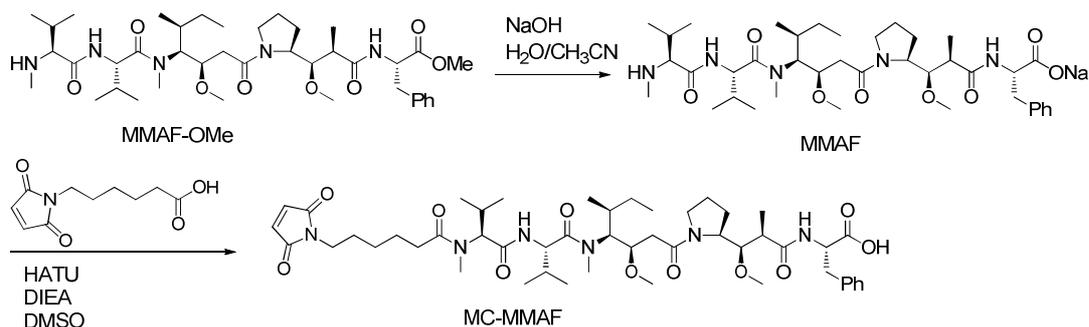
25 **Ejemplo de carga 97: Análogo de cetona-Coenzima A (CoA-(i-13))**



35 El compuesto (**i-13**) se convirtió en el análogo de CoA funcionalizado con cetona **CoA-(i-13)** haciendo reaccionar una concentración 10 mM del compuesto (**i-13**) con una concentración 25 mM de ATP en presencia de CoAA de *Staphylococcus aureus* 10 μM , CoAD de *Escherichia coli* 25 μM y CoAE de *Escherichia coli* 20 μM durante aproximadamente 48 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ en tampón HEPES 50 mM (pH 8,0) que contenía MgCl_2 20 mM. Después de la centrifugación de la mezcla de reacción a 20817 x g durante 2 min, la enzima soluble se separó mediante ultrafiltración a través de un filtro centrífugo Amicon Ultra con un límite de 10 kDa (15 min; 14000 x g).

Procedimiento sintético del péptido comparativo

40 Síntesis del ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-metilhexanamido)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**MC-MMAF**)



Se disolvió MMAF-OMe (135 mg, Concortis Biosystems) en CH₃CN (10 mL). A la solución transparente resultante se añadieron 5 mL de agua, seguidos de 0,375 mL de hidróxido sódico acuoso 1 N (certificado, Fisher Scientific). La mezcla de reacción se agitó magnéticamente a 21 °C durante 18 horas, momento en el que el análisis LCMS indicó una reacción completa. La mezcla de reacción se congeló y se liofilizó, lo que proporcionó la sal sódica de MMAF. Tiempo de retención en LCMS 0,911 minutos. MS (ESI+) m/z 732,5 (M+1). La sal sódica de MMAF completa así obtenida en la reacción previa se disolvió en 10mL de DMSO. En un recipiente de reacción separado, se trató ácido 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoico (95 mg) con HATU (165 mg) y DIEA (0,126 mL) en 3,0 mL de DMSO a 21 °C durante 25 min. La mezcla de reacción completa del éster activado se añadió a la solución de sal sódica de MMAF, y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 3 horas. La mezcla de reacción se repartió entre 40 mL de EtOAc y 20 mL de ácido cítrico acuoso al 5%. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con 20 mL de EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 10 mL de NaCl acuoso saturado, se secaron con MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó en un instrumento ISCO CombiFlash utilizando una columna ISCO C18gold de 15,5 g. El material deseado se eluyó con un 50% de CH₃CN en H₂O. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se liofilizaron, lo que proporcionó el compuesto como un sólido blanco. LCMS tiempo de retención 1,392 minutos. MS (ESI+) m/z 925,6 (M+1).

Ejemplo 98: Ensayo de destrucción de células *in vitro* de las cargas

Para la evaluación de la potencia de destrucción celular de los péptidos citotóxicos de Fórmula (I) *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular en paralelo con 8 líneas celulares: Clon 16 de MDA-MB231, clon 40, células JimT1, HCC1954, H526, KU812, CMK11-5 y células Jurkat. Además, se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular, *in vitro*, utilizando 3 líneas celulares diferentes: A375, SKBR3 y NCI-N87. Todas las líneas celulares se describen en más detalle en el Ejemplo 106 y también se utilizaron para evaluar la potencia *in vitro* de los inmunocombinados de la invención. Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo con Cell-Titer-Glo™ (Promega) cinco días después de que las células se incubasen con varias concentraciones de ADC (Riss *et al.*, (2004) *Assay Drug Dev Technol.* 2:51-62). En algunos estudios, los ensayos basados en células son de alto rendimiento y se llevaron a cabo en un sistema automatizado (Melnick *et al.*, (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3153-3158). Las potencias de destrucción de células *in vitro* obtenidas para determinados ejemplos de péptidos citotóxicos de Fórmula (I) se proporcionan en la Tabla 2a y la Tabla 2b.

Tabla 2a. Destrucción de células *in vitro* (CI₅₀ (nM)) de determinados péptidos citotóxicos de Fórmula (I)

| N.º de comp. | Línea celular | | | | | | | |
|--------------|---------------|---------|-------|--------|-------|-----------------------|-----------------------|----------|
| | CMK-11-5 | HCC1954 | JimT1 | JURKAT | KU812 | clon 16 de MDA-MB-231 | clon 40 de MDA-MB-231 | NCI-H526 |
| 1 | 1,23 | 0,131 | 0,675 | 0,151 | 0,281 | 1,24 | 2,49 | 1,08 |
| 2 | 182 | 46,2 | 202 | 162 | 279 | 735 | 442 | 218 |
| 3 | 14,7 | 10,8 | 42,1 | 3,01 | 6,78 | 12,7 | 23,9 | 22 |
| 5 | 74,8 | 47 | 44,7 | 49,9 | 106 | 83,5 | 139 | 204 |
| 46 | 10,4 | 2,3 | 14,2 | 6,1 | 8,4 | 8,1 | 11,7 | 29,5 |

Tabla 2b. Destrucción de células *in vitro* (CI₅₀ (nM)) de determinados péptidos citotóxicos de Fórmula (I)

| | Línea celular | | | | | |
|--------------|---------------|---------|-------|-------|---------|----------|
| N.º de comp. | A375 | HCC1954 | SKBR3 | JimT1 | NCI-N87 | NCI-H526 |
| 50 | 5,16 | n.d. | 5,66 | 57,6 | 10,2 | 52,4 |
| 51 | 0,154 | 0,028 | 0,035 | 0,081 | 0,053 | 0,184 |
| 52 | 0,923 | 0,019 | 0,046 | 0,184 | 0,068 | 0,184 |
| 53 | 0,0121 | 0,009 | 0,008 | 0,011 | n.d. | 0,121 |
| 54 | 27,4 | 7,18 | n.d. | 17,1 | 7,59 | 54,8 |
| 55 | 2,75 | 0,124 | 0,210 | 0,751 | 0,643 | 0,364 |
| 57 | 0,049 | n.d. | 0,034 | 0,307 | 0,019 | 1,11 |
| 58 | 0,304 | n.d. | 0,307 | 2,15 | 0,310 | 4,08 |
| 59 | 3,55 | n.d. | 3,12 | 37,5 | 4,78 | 19,5 |
| 60 | 0,450 | n.d. | 0,591 | 4,82 | 0,801 | 8,35 |
| 61 | 5,43 | n.d. | 6,10 | 66,0 | 13,5 | 60,6 |
| 63 | 14,3 | 1,64 | n.d. | 5,08 | 2,09 | 6,49 |
| 64 | 25,6 | 1,09 | n.d. | 4,15 | 1,21 | 5,74 |
| 65 | 31,3 | 0,93 | n.d. | 6,88 | 3,67 | 3,82 |
| 66 | 0,050 | 0,023 | 0,031 | 0,052 | n.d. | 0,126 |
| 67 | 0,244 | 0,239 | n.d. | 0,369 | 0,596 | 0,614 |
| 68 | 0,596 | 0,127 | n.d. | 0,251 | 0,200 | 0,428 |
| 69 | 0,092 | 0,065 | n.d. | 0,091 | 0,142 | 0,189 |
| 70 | 2,16 | 1,38 | n.d. | 2,36 | 3,81 | 4,73 |
| 71 | 0,119 | 0,075 | n.d. | 0,124 | 0,091 | 0,352 |
| 72 | 0,189 | 0,079 | 0,085 | 0,224 | n.d. | 0,287 |
| 73 | 11,3 | 1,59 | 1,44 | 5,11 | n.d. | 3,66 |
| 74 | 0,571 | 0,270 | 0,351 | 0,587 | n.d. | 0,962 |

n. d., no determinado

Restos de unión a antígeno

- 5 El resto de unión a antígeno en la Fórmula (II) o (III) puede ser cualquier resto que se una selectivamente a un marcador de la superficie celular que se encuentra en un tipo de células diana. En algunos aspectos, Ab es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo) que se une específicamente a un antígeno que se encuentra predominante o preferencialmente en la superficie de las células cancerosas, por ejemplo, un antígeno asociado a tumores. En algunos aspectos, Ab es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno) que se une específicamente a una proteína receptora de la superficie celular u otras moléculas de la superficie celular, un factor regulador de la supervivencia celular, un factor
- 10

regulador de la proliferación celular, una molécula asociada con (por ejemplo, de la que se sabe o se sospecha que contribuye funcionalmente a) el desarrollo o la diferenciación tisular, una linfocina, una citocina, una molécula implicada en la regulación del ciclo celular, una molécula implicada en la vasculogénesis o una molécula asociada con (por ejemplo, de la que se sabe o se sospecha que contribuye funcionalmente a) la angiogénesis. Un antígeno asociado con un tumor puede ser un factor de diferenciación de tipo clúster (es decir, una proteína CD). En algunos aspectos de la invención, el resto de unión a antígeno de la invención se une específicamente a un antígeno. En algunos aspectos de la invención, el resto de unión a antígeno de la invención se une específicamente a dos o más antígenos descritos en la presente, por ejemplo, el resto de unión a antígeno de la invención es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico o un fragmento de unión a antígeno de este.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno ilustrativos incluyen anticuerpo anti-receptor de estrógenos, anticuerpo anti-receptor de progesterona, anticuerpo anti-p53, anticuerpo anti-HER-2, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-catepsina D, anticuerpo anti-Bcl-2, anticuerpo anti-cadherina E, anticuerpo anti-CA125, anticuerpo anti-CA15-3, anticuerpo anti-CA19-9, anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo antiglicoproteína P, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo antiproteína del retinoblastoma, anticuerpo antioncoproteína ras, anticuerpo anti-Lewis X, anticuerpo anti-Ki-67, anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD9/p24, anticuerpo anti-CD1, anticuerpo anti-CD11c, anticuerpo anti-CD13, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD23, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD35, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD39, anticuerpo anti-CD41, anticuerpo anti-LCA/CD45, anticuerpo anti-CD45RO, anticuerpo anti-CD45RA, anticuerpo anti-CD71, anticuerpo anti-CD95/Fas, anticuerpo anti-CD99, anticuerpo anti-CD100, anticuerpo anti-S-100, anticuerpo anti-CD106, anticuerpo antiubiquitina, anticuerpo anti-c-myc, anticuerpo anticitoqueratina, anticuerpo anticadenas ligeras lambda, anticuerpo antimelanosomas, anticuerpo antiantígeno específico de la próstata, anticuerpo antiantígeno tau, anticuerpo antifibrina, anticuerpo antiqueratinas y anticuerpo antiantígeno Tn.

En una realización, el resto de unión a antígeno de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula (II) se une específicamente a un receptor codificado por un gen ErbB. El resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a un receptor de ErbB seleccionado entre EGFR, HER2, HER3 y HER4. El resto de unión a antígeno puede ser un anticuerpo que se unirá específicamente al dominio extracelular (ECD) del receptor HER2 e inhibirá el crecimiento de las células tumorales que sobreexpresen el receptor HER2. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado puede ser huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 o huMAb4D5-8 (trastuzumab). El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab.

Los restos de unión a antígeno en la Fórmula (II) o (III) incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) contra receptores de la superficie celular y antígenos asociados a tumores. Dichos antígenos asociados con tumores son conocidos en la técnica y se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos utilizando métodos e información que son muy conocidos en la técnica. En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar polipéptidos transmembrana o asociados con tumores de otro modo que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas, en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados con tumores se expresan de forma más abundante sobre la superficie de las células cancerosas, en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antigénicos de la superficie celular asociados con tumores ha dado lugar a la capacidad de utilizar específicamente como diana células cancerosas para su destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmento de unión a antígeno) útiles para los inmunoconjugados de la invención incluyen anticuerpos modificados o diseñados tales como un anticuerpo modificado para introducir un residuo de cisteína (Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y *et al.*; *Nat Biotechnol* 2008, 26:925-932; documento WO2013093809), u otro aminoácido reactivo, que incluye Pcl, pirrolisina, etiquetas peptídicas (tales como etiquetas S6, A1 e ybbR), y aminoácidos artificiales, en lugar de al menos un aminoácido de la secuencia nativa, con lo cual se proporciona así un sitio reactivo en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su conjugación a un péptido citotóxico de Fórmula (I) o una subfórmula de esta. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden modificar para que incorporen Pcl o pirrolisina (W. Ou *et al.* (2011) *PNAS* 108 (26), 10437-10442) o aminoácidos artificiales (J.Y. Axup, K.M. Bajjuri, M. Ritland, B.M. Hutchins, C.H. Kim, S.A. Kazane, R. Halder, J.S. Forsyth, A.F. Santidrian, K. Stafin, Y. Lu *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (2012), pp. 16101-16106; para consultar una revisión, remítase a C.C. Liu y P.G. Schultz (2010) *Annu Rev Biochem* 79, 413-444; C.H. Kim, J.Y. Axup, P.G. Schultz (2013) *Curr Opin Chem Biol.* 17, 412-419) como sitios para la conjugación a un fármaco. De forma similar, se pueden introducir en un anticuerpo etiquetas peptídicas para los métodos de conjugación enzimática (Strop P. *et al.* *Chem Biol.* 2013, 20(2):161-7; Rabuka D., *Curr Opin Chem Biol.* 2010 Dec;14(6):790-6; Rabuka D. *et al.*, *Nat Protoc.* 2012, 7(6):1052-67). Otro ejemplo es el uso de 4¹-fosfopanteteinil-transferasas (PPTasa) para la conjugación de análogos de Co-enzima A (documento WO2013184514). Los métodos para conjugar dichos anticuerpos alterados o modificados con cargas o combinaciones de conector-carga son conocidos en la técnica.

Los restos de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) útiles en la invención pueden tener también otras modificaciones o estar conjugados con otros restos tales como etiquetas de polietilenglicol, albúmina y otro polipéptido de fusión.

5 Los anticuerpos utilizados en los ejemplos de la presente tienen las secuencias de cadena ligera y cadena pesada enumeradas en la Tabla 3. Estos anticuerpos se diseñaron para que contuviesen residuos de cisteína o etiquetas enzimáticas PPTasa para la conjugación con especificidad por un sitio con péptidos citotóxicos de la invención. Los ejemplos de la presente ilustran que estos anticuerpos diseñados son un anticuerpo adecuado para su uso en los
10 inmunocombinados de Fórmula (II) o (III). Además, también se pueden utilizar anticuerpos no diseñados para la preparación de los inmunocombinados de Fórmula (II) o (III) mediante métodos tradicionales (Carter PJ, Senter PD, *Antibody-drug conjugates for cancer therapy*, *Cancer J.* 2008, 14(3):154-69; J.E. Stefano, M. Busch, L. Hou, A. Park, y D.A. Gianolio, págs. 145-171, y M.-P. Brun y L. Gauzy-Lazo, págs. 173-187 en *Antibody-Drug Conjugate, Methods in Molecular Biology*, Vol. 1045, Editor L. Ducry, Humana Press (2013).

15 Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de ejemplo

| |
|---|
| <p>SEQ ID NO:1 (cadena pesada de anti-Her2 de origen natural) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:2 (cadena ligera de anti-Her2 de origen natural) DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC</p> |
| <p>SEQ ID NO:3 (región constante de la cadena ligera mutante de anti-Her2 LC-S159C y anticuerpo 20507 LC-S159C) KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNCSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> |
| <p>SEQ ID NO:4 (región constante de la cadena pesada mutante del anticuerpo 20507 HC-E152C) SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:5 (región constante de la cadena pesada mutante del anticuerpo 20507 HC-S375C) SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:6 (región constante de la cadena ligera mutante de anti-Her2 HC-E152C-S375C y anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C) SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:7 (región constante de la cadena ligera mutante del anticuerpo 20507 LC-K107C) CRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> |

| |
|--|
| <p>SEQ ID NO:8 (región constante de la cadena pesada de anti-Her2 HC-ins388-ybbR) SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDSL EFIASKLANNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:9 (región constante de la cadena pesada mutante HC-ins388-A1 en anti-Her2 y anticuerpo 20507) SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEGDS LDMLEWSLMNNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG K</p> |
| <p>SEQ ID NO:10 (región constante de la cadena pesada de origen natural del anticuerpo 20507) SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:11 (región constante de la cadena ligera de origen natural del anticuerpo 20507) KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> |

5 La SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 son la secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada (HC) y la cadena
ligera (LC) del anticuerpo anti-Her2 de origen natural, respectivamente. Las regiones CDR están subrayadas. La SEQ
ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de LC de anti-Her2 LC-S159C y del anticuerpo
mutante anticuerpo 20507-LC-S159C. La SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 son las secuencias de
aminoácidos de las regiones constantes para la cadena pesada de los anticuerpos mutantes HC-E152C y HC-S375C
y HC-E152C-S375C, respectivamente. La SEQ ID NO:7 es la mutación LC-K107C de cadena ligera del anticuerpo
10 20507. La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada mutante para
anti-Her2 HC-ins388-ybbR donde la etiqueta ybbR se inserta después del residuo Glu388 de HC. La SEQ ID NO: 9 es
la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada mutante para ambos anticuerpos anti-Her2
y anticuerpo 20507 HC-ins388-A1, donde la etiqueta A1 se inserta después del residuo Glu388 de HC. El residuo Cys
mutante y las etiquetas de secuencias insertadas de ybbR y A1 se muestran en negrita y están subrayadas en las
secuencias de las cadenas mutantes correspondientes. La SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11 son las secuencias de
15 aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 20507 de origen natural,
respectivamente.

Producción del anticuerpo

20 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a anticuerpo) de la invención se pueden
producir por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye expresión recombinante, síntesis química y digestión
enzimática de tetrámeros de anticuerpos, mientras que los anticuerpos monoclonales completos se pueden obtener,
por ejemplo, mediante producción de hibridomas o recombinante. La expresión recombinante puede ser a partir de
cualquiera células hospedadoras apropiadas conocidas en la técnica, por ejemplo, células hospedadoras de
25 mamífero, células hospedadoras bacterianas, células hospedadoras de levadura, células hospedadoras de insecto,
etc.

30 La invención proporciona además polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en la presente, p. ej.,
polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena ligera o pesada o segmentos que comprenden las regiones
determinantes de la complementariedad según se describen en la presente.

35 Las secuencias de polinucleótidos se pueden producir por síntesis *de novo* de ADN en fase sólida o por mutagénesis
por PCR de una secuencia existente (por ejemplo, secuencias como las descritas en los ejemplos siguientes) que
codifica un anticuerpo o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos se puede lograr
mediante métodos conocidos en la técnica tales como el método del fosfotriéster de Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.*
68:90, 1979; el método del fosfodiéster de Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; el método de la
40 dietilfosforamida de Beaucage *et al.*, *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981; y el método del soporte sólido de la patente de EE.
UU. N.º 4 458 066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótidos por PCR se puede realizar
como se describe, por ejemplo, en *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich
(Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR PROTOCOLS: A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.* (Ed.),
Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; y Eckert *et al.*, *PCR Methods
and Applications* 1:17, 1991.

También se proporcionan en la invención vectores de expresión y células hospedadoras para producir los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos anteriormente. Se pueden emplear diversos vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas o fragmentos de unión de los anticuerpos de la invención. Tanto los vectores de expresión virales como los no virales se pueden utilizar para producir los anticuerpos en una célula hospedadora de mamífero. Los vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episómicos, habitualmente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (remítase, por ejemplo, a Harrington *et al.*, Nat Genet 15:345, 1997). Por ejemplo, los vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos en células de mamíferos (por ejemplo, humanas) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV y muchos otros vectores conocidos en la técnica por expresar otras proteínas. Los vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores del virus *vaccinia* y virus Semliki Forest (SFV). Remítase a, Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; y Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células hospedadoras previstas en las que se va a expresar el vector. Habitualmente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores) que están unidas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena o un fragmento de anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas excepto en condiciones inductoras. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados se pueden expandir en condiciones no inductoras sin sesgar a la población para codificar secuencias cuyos productos de expresión sean mejor tolerados por las células hospedadoras. Además de los promotores, también pueden ser necesarios o deseables otros elementos reguladores para la expresión eficiente de una cadena o fragmento de anticuerpo de la invención. Estos elementos incluyen habitualmente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión al ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficiencia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (remítase, por ejemplo, a Scharf *et al.*, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; y Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Por ejemplo, el potenciador SV40 o el potenciador CMV se pueden utilizar para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpos insertadas. Más a menudo, las secuencias de anticuerpos insertadas se conectan a secuencias señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores a utilizar para recibir secuencias que codifican dominios variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos en ocasiones también codifican regiones constantes o partes de ellas. Dichos vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes, lo que conduce a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Generalmente, dichas regiones constantes son humanas.

Las células hospedadoras para albergar y expresar las cadenas de anticuerpos de la invención pueden ser procariotas o eucariotas. La *Escherichia coli* es un hospedador procariota útil para clonar y expresar los polinucleótidos de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias tales como *Salmonella*, *Serratia* y varias especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariotas, también se pueden producir vectores de expresión, que habitualmente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, puede estar presente cualquier número de una serie de promotores conocidos tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor de fagos lambda. Los promotores habitualmente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitio de unión a ribosomas, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. También se pueden emplear otros microbios tales como levaduras, para expresar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. También se pueden utilizar células de insectos combinadas con vectores de baculovirus.

En un aspecto, se utilizan células hospedadoras de mamífero para expresar y producir los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser una línea celular del hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógenos o una línea celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógeno. Estas incluyen cualquier célula animal o humana normal mortal o normal o anormal inmortal. Por ejemplo, se han desarrollado varias líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluidas las líneas celulares CHO, varias líneas celulares Cos, células HeLa, líneas celulares de mieloma, linfocitos B transformados e hibridomas. El uso del cultivo de células de tejidos de mamíferos para expresar polipéptidos se trata en general en, por ejemplo, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Los vectores de expresión para células hospedadoras de mamíferos pueden incluir secuencias de control de la expresión tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (remítase, por ejemplo, a Queen *et al.*, Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), y los sitios de información de procesamiento necesarios tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción. Estos vectores de expresión contienen generalmente promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos del tipo de célula, específicos del estadio y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen el promotor de metalotioneína, el promotor constitutivo tardío mayor del

adenovirus, el promotor de MMTV inducible por dexametasona, el promotor de SV40, el promotor de MRP polIII, el promotor constitutivo de MPSV, el promotor de CMV inducible por tetraciclina (tales como el promotor de CMV temprano inmediato humano), el promotor de CMV constitutivo y las combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

5 Los métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para otros hospedadores celulares (remítase de forma general a Sambrook *et al.*, supra). Otros métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de poliacrilato:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, *Cell* 88:223, 1997), captación de ADN potenciada por el agente y transducción *ex vivo*. Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, a menudo se deseará una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable cadenas o fragmentos de unión de anticuerpos se pueden preparar utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células se multipliquen durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiar al medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite la multiplicación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas de forma estable, pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

Ejemplo 99: Clonación de anticuerpos anti-Her2 y anticuerpo 20507 con mutación etiqueta A1/ybbR y Cys para estudios de conjugación

25 Oligonucleótidos de ADN que codifican regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo anti-Her2 (Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4285-4289. *Humanization of an anti-p185her2 antibody for human Cancer therapy*) se sintetizaron químicamente y se clonaron en dos vectores de expresión de mamíferos, pOG-HC y pOG-LC que contienen las regiones constantes de IgG1 humano y cadena ligera kappa humana, lo que dio como resultado dos constructos de origen natural, HC de anticuerpo pOG-anti-Her2 y LC de anticuerpo pOG-anti-Her2, respectivamente. En estos vectores, la expresión de cadena pesada y ligera de anticuerpos en células de mamífero está impulsada por un promotor de CMV. Los vectores codifican una secuencia señal de 24 aminoácidos sintéticos, MKTFILLWVLLLVIFLLPGATA (SEQ ID NO:12), en el extremo N terminal de la cadena pesada y la cadena ligera para guiar su secreción a partir de células de mamífero. La secuencia señal se ha validado para que sea eficiente para controlar la secreción proteica en cientos de proteínas de mamífero en células 293 Freestyle™ (Gonzalez R, Jennings LL, Knuth M, Orth AP, Klock HE, Ou W, Feuerhelm J, Hull MV, Koesema E, Wang Y, Zhang J, Wu C, Cho CY, Su AI, Batalov S, Chen H, Johnson K, Laffitte B, Nguyen DG, Snyder EY, Schultz PG, Harris JL, Lesley SA. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:3552-7). Se empleó la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para preparar la mutación LC-S159C del anticuerpo anti-Her2. Los cebadores sentido y antisentido (Tabla 4) que corresponden al sitio de mutación LC-S159C en las regiones constantes de la cadena ligera kappa humana se sintetizaron químicamente. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando ADN polimerasa PfuUltra II Fusion HS (Stratagene) con HC de anticuerpo pOG-anti-Her2 y LC de anticuerpo pOG-anti-Her2 como moldes. Los productos de PCR se confirmaron en geles de agarosa y se trataron con DPN I y después se transformaron en células DH5a (Klock *et al.*, (2009) *Methods Mol Biol*. 498:91-103).

La secuencia del constructo con mutación LC-S159C se confirmó mediante secuenciación de ADN. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-Her2 de origen natural se muestra como SEQ ID NO: 1 y la de la cadena ligera se muestra como SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo con mutación LC-S159C se muestra en la Tabla 3 con C159 en negrita y subrayada. Los residuos de aminoácidos en la cadena ligera kappa humana y la cadena pesada de IgG1 humana se numeran de acuerdo con el sistema de numeración Eu (Edelman *et al.*, (1969) *Proc Natl Acad Sci USA*, 63:78-85). El anticuerpo anti-Her2-LC-S159C se clonó además en vectores que contenían marcadores de selección antibióticos para la selección de clones de células transfectadas de forma estable en medios que contenían los correspondientes antibióticos.

De forma similar, un mutante con Cys doble, HC-E152C-S375C, del anticuerpo anti-Her2 y cuatro mutantes con Cys (HC-E152C, HC-S375C, LC-K107C, LC-S159C, HC-E152C-S375C) de un segundo anticuerpo, el anticuerpo 20507, se clonaron utilizando los cebadores de ADN enumerados en la Tabla 4 y los procedimientos anteriores. El anticuerpo 20507 contiene una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera kappa humana. Las partes constantes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 20507 son idénticas en la secuencia de aminoácidos a aquellas en el anticuerpo anti-Her2. Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de los mutantes con Cys del anticuerpo anti-Her2 y del anticuerpo 20507 se muestran en la Tabla 3 con Cys mutada en negrita y subrayadas.

Inserción de las secuencias peptídicas ybbR y A1 en la región constante de la cadena pesada del anticuerpo anti-Her2 se logró mediante métodos de biología molecular estándar. El vector HC del anticuerpo pOG-anti-Her2 sirvió como

molde de PCR para obtener los mutantes de inserción HC-ins388-ybbR y HC-ins388-A1 correspondientes. La Tabla 4 enumera los cebadores sentido y antisentido que se utilizaron para la clonación de estos constructos. El vector que codifica el mutante de inserción anticuerpo 20507-HC-ins388-A1 se preparó amplificando la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 20507. El fragmento de ADN amplificado se movió después al vector existente que codifica el mutante de inserción anti-Her2-HC-ins388-A1. Todos los vectores de expresión resultantes que codifican cadenas pesadas con etiquetas peptídicas se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Los anticuerpos anti-Her2 que contenían las inserciones HC-ins388-ybbR y HC-ins388-A1 se clonaron adicionalmente en vectores con marcadores de selección de antibióticos, con lo cual permite así el posterior aislamiento de los clones que expresan de forma estable los respectivos constructos con etiquetas peptídicas. Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de los mutantes con la inserción A1/ybbR del anticuerpo anti-Her2 y del anticuerpo 20507 se muestran en la Tabla 3. La etiqueta peptídica insertada se muestra en negrita y está subrayada.

Los anticuerpos anti-Her2 y anticuerpo 20507 con mutación etiqueta A1 y Cys se prepararon como se describe en el Ejemplo 100, y se conjugaron con un péptido citotóxico ilustrativo de fórmula (I) tal como se describe en los Ejemplos 101, 102, 103, 104 y 105.

Tabla 4. Secuencias de ADN de los cebadores de mutación utilizados para clonar anticuerpos mutantes.

| | | | |
|----------------|-------------|--|--------------|
| LC-S159C | Sentido | AGCGGCAACTGTCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAA | SEQ ID NO:13 |
| | Antisentido | CTCTCCTGACAGTTGCCGCTCT GCAGGGCGTTGTCCACCT | SEQ ID NO:14 |
| HC-E152C | Sentido | TACTTCCCCTGTCCCGTGACCG TGTCTGGAACAGCGGA | SEQ ID NO:15 |
| | Antisentido | GGTCACGGGACAGGGGAAGTA GTCCTTACCAGGCAGC | SEQ ID NO:16 |
| HC-S375C | Sentido | TTCTACCCCTGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACG | SEQ ID NO:17 |
| | Antisentido | GCGATGTGCGAGGGGTAGAA GCCCTTACCAGACAGGTCA | SEQ ID NO:18 |
| LC-K107C | Sentido | GTGGAGATCTGTGGAACGGTG GCCGCTCCAGCGTGTTCA | SEQ ID NO:19 |
| | Antisentido | ACCGTTCGACAGATCTCCACCT TGGTACCCTGTCCGAAC | SEQ ID NO:20 |
| HC-ins388-ybbR | Sentido | CTGGAGTTCATCGCCAGCAAG CTGGCCAACAACACTACAAGACCA CACCTCCAG | SEQ ID NO:21 |
| | Antisentido | CTTGCTGGCGATGAACTCCAG GCTGTCTCGGGCTGGCCGTT GCTC | SEQ ID NO:22 |

| | | | |
|--------------|-------------|--|--------------|
| HC-ins388-A1 | Sentido | CTGGACATGCTGGAGTGGAGC CTGATGAACAACACTACAAGACCA CACCTCCAG | SEQ ID NO:23 |
| | Antisentido | CCACTCCAGCATGTCCAGGCT GTCGCCCTCGGGCTGGCCGTT GCTC | SEQ ID NO:24 |

Ejemplo 100: Preparación de anticuerpos anti-Her2 y anticuerpo 20507 con mutación de Cys y de etiqueta A1/ybbR.

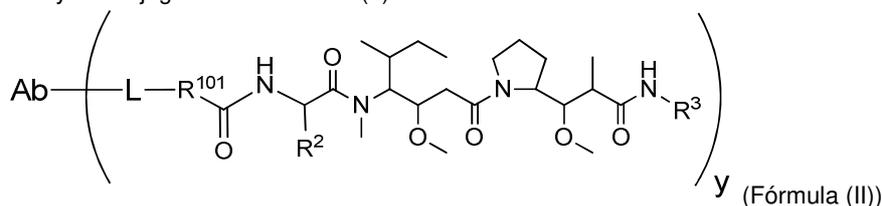
El mutante de anti-Her2 y anticuerpo 20507 con Cys, etiqueta A1 y etiqueta ybbR se expresó en células 293 Freestyle™ cotransfectando plásmidos de cadena pesada y cadena ligera utilizando un método de transfección transitoria tal como se ha descrito previamente (Meissner, *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 75:197-203 (2001)). Los plásmidos de ADN utilizados en la cotransfección se prepararon utilizando un kit de preparación de plásmidos Qiagen conforme al protocolo del fabricante. Se cultivaron células 293 Freestyle™ en suspensión en medio de expresión Freestyle™ (Invitrogen) a 37 °C en un 5% de CO₂. El día antes de la transfección, las células se dividieron hasta 0,7 x 10⁶ células/mL en medio fresco. En el día de la transfección, la densidad celular alcanzó típicamente 1,5 x 10⁶ células/mL. Las células se transfectaron con una mezcla de plásmidos de cadena pesada y cadena ligera con la proporción de 1:1 utilizando el método PEI (Meissner *et al.*, 2001 *supra*). Las células transfectadas se cultivaron adicionalmente durante cinco días. El medio del cultivo se recogió por centrifugación del cultivo a 2000x g durante 20 min y se filtró a través de filtros de 0,2 micrómetros. Los anticuerpos expresados se purificaron a partir del medio filtrado utilizando Protein A-Sepharose™ (GE Healthcare Life Sciences). Los anticuerpos IgG se eluyeron de la columna Protein A-Sepharose™ utilizando un tampón de elución a pH 3,0. Las soluciones de IgG eluidas se neutralizaron inmediatamente con Tris-HCl 1 M (pH 8,0) seguido de un intercambio de tampón a PBS.

Los constructos de expresión para los anticuerpos anti-Her2-LC-S159C, anti-Her2-HC-ins388-ybbR y anti-Her2-HC-ins388-A1 también se transfectaron en células CHO. Siguiendo protocolos estándar, las células que expresaban de forma estable estos anticuerpos se seleccionaron entonces utilizando antibióticos. Todos los constructos de anticuerpos anti-Her2 expresados en los clones de células CHO seleccionados se purificaron mediante cromatografía Protein A-Sepharose tal como se ha descrito anteriormente.

En un estudio separado, el anticuerpo anti-Her2-LC-S159C se expresó de forma estable en la célula CHO y después se realizó una selección mediante selección con antibióticos. El anticuerpo anti-Her2-LC-S159C expresado en el clon de células CHO establecido se purificó mediante procedimientos con columna Protein A-Sepharose tal como se ha descrito anteriormente.

30 Inmunoconjugados

Los inmunoconjugados de la invención que comprenden dichos péptidos citotóxicos como una carga (fármaco) incluyen conjugados de Fórmula (II):

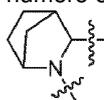


35 donde:

Ab representa un resto de unión a antígeno;

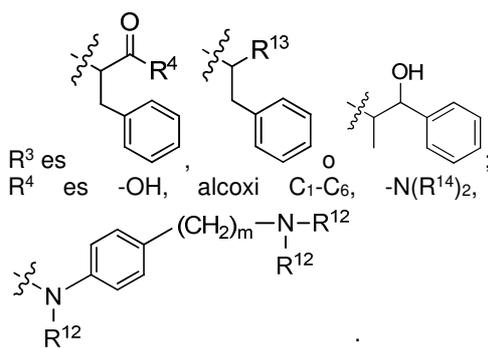
L es un conector seleccionado entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son tal como se definen en la presente;

y es un número entero de 1 a 16;

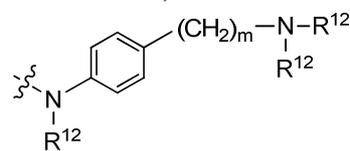


40 R¹⁰¹ es

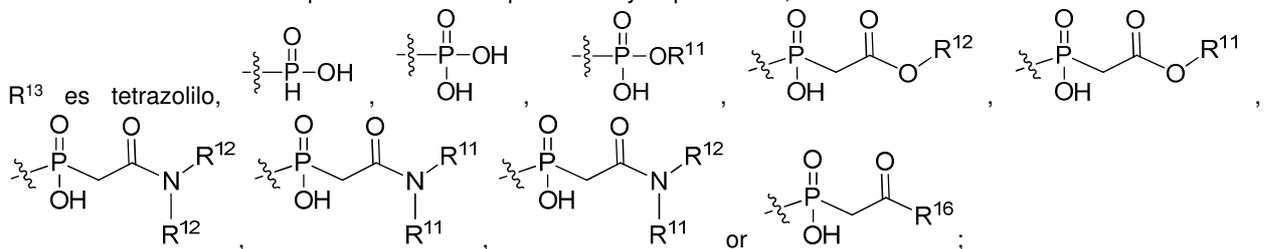
R² es metilo, etilo, isopropilo o *sec*-butilo;



R³ es
R⁴ es -OH, alcoxi C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶, -NR¹²(CH₂)_mN(R¹⁴)₂, o -NR¹²(CH₂)_mR¹⁶, -NHS(O)₂R₁₁ o

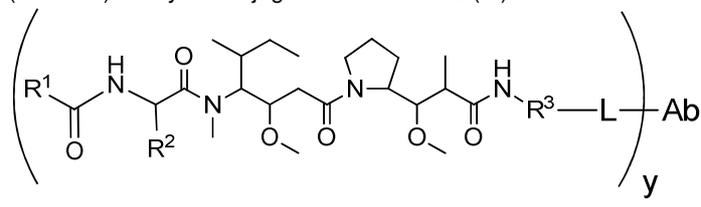


5 R⁵ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², o -((CH₂)_mO)_nR¹²;
R¹¹ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;
cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;



10 cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;
R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;
cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y
15 cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

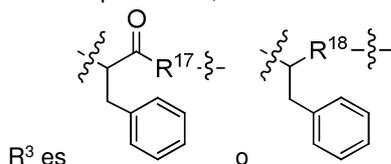
Otros inmunoconjugados divulgados en la presente que comprenden dichos péptidos citotóxicos como una carga (fármaco) incluyen conjugados de Fórmula (III):



(Fórmula (III))

donde:

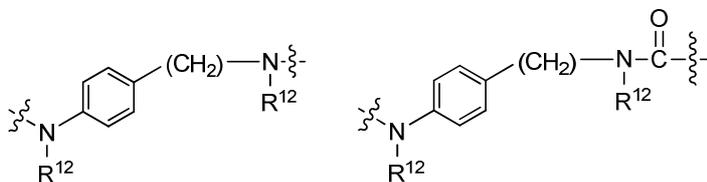
20 Ab representa un resto de unión a antígeno;
L se selecciona entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂- y -L₁, donde -L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ son como se definen en la presente;
y es un número entero de 1 a 16;
25 R¹ es un heterocicloalquilo de 6 miembros que contiene 1-2 heteroátomos de N y un puente alquilenos C₁-C₂, donde el heterocicloalquilo de 6 miembros está sin sustituir o sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;
o R¹ es un heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros que contiene 1-2 heteroátomos de N, donde el heterocicloalquilo bicíclico fusionado de 5-8 miembros está sin sustituir o sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R⁵ y R⁶;
30 R² es alquilo C₁-C₆;



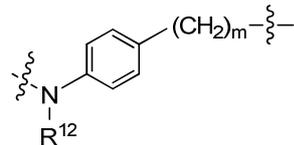
35 R³ es
R⁵ es alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos, -C(=O)R¹¹, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR¹², o -((CH₂)_mO)_nR¹²;
R⁶ es halo, oxo, OH, alquilo C₁-C₆, -N(R¹⁴)₂, -R¹⁶ y -NR¹²C(=O)R¹¹;
R¹¹ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;
cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;

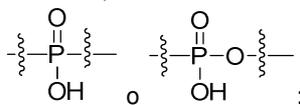
R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros unido en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;



R¹⁷ es un enlace, -NH-, -NHS(=O)₂-,



5



R¹⁸ es un enlace,

cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Se proporcionan otros inmunocombinados de Fórmula (II) de la invención en las realizaciones enumeradas más adelante.

10

La invención proporciona inmunocombinados que comprenden uno o más péptidos citotóxicos antimetabólicos conectados a un resto de unión a antígeno tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los inmunocombinados preferidos de la invención son los de Fórmula (II) tal como se describen en la presente. Los métodos para producir dichos inmunocombinados son muy conocidos en la técnica. Los inmunocombinados preferidos incluyen los divulgados en la Tabla 5, y variaciones de estos que tienen otro resto de unión a antígeno en lugar del anticuerpo anti-Her2, particularmente combinados de este tipo donde el anticuerpo anti-Her2 se reemplaza por un anticuerpo seleccionado de la siguiente lista: anticuerpo antirreceptor de estrógenos, anticuerpo antirreceptor de progesterona, anticuerpo anti-p53, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anticatapsina D, anticuerpo anti-Bcl-2, anticuerpo anti-cadherina E, anticuerpo anti-CA125, anticuerpo anti-CA15-3, anticuerpo anti-CA19-9, anticuerpo anti-c-erbB 2, anticuerpo antiglicoproteína P, anticuerpo anti-CEA, anticuerpo antiproteína del retinoblastoma, anticuerpo anti-oncoproteína ras, anticuerpo anti-Lewis X, anticuerpo anti-Ki-67, anticuerpo anti-PCNA, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD5, anticuerpo anti-CD7, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD9/p24, anticuerpo anti-CD1, anticuerpo anti-CD11c, anticuerpo anti-CD13, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD15, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD23, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD34, anticuerpo anti-CD35, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD39, anticuerpo anti-CD41, anticuerpo anti-LCA/CD45, anticuerpo anti-CD45RO, anticuerpo anti-CD45RA, anticuerpo anti-CD71, anticuerpo anti-CD95/Fas, anticuerpo anti-CD99, anticuerpo anti-CD100, anticuerpo anti S-100, anticuerpo anti-CD106, anticuerpo antiubiquitina, anticuerpo anti-myc-c, anticuerpo anticitoqueratina, anticuerpo anticadenas ligeras lambda, anticuerpo antimelanosomas, anticuerpo antiantígeno específico de próstata, anticuerpo antiantígeno tau, anticuerpo antifibrina, anticuerpo antikeratinas y anticuerpo antiantígeno Tn.

15

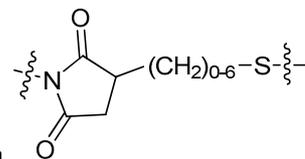
20

25

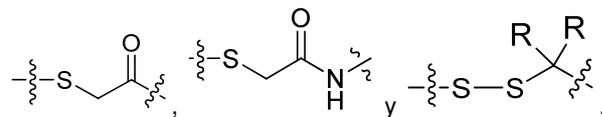
30

En algunas realizaciones, un inmunocombinado de Fórmula (II), o subfórmula de este, que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo Ab que tiene actividad de unión a antígenos, donde el conector L se une al Ab en un átomo de azufre de cisteína del Ab. Se proporcionan grupos reactivos habituales para la reacción con un grupo con azufre de cisteína y el grupo resultante formado en la Tabla 1. Algunos ejemplos de componentes conectores formados

35

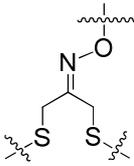
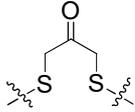


mediante reacción con un residuo de cisteína del resto de unión a antígeno incluyen

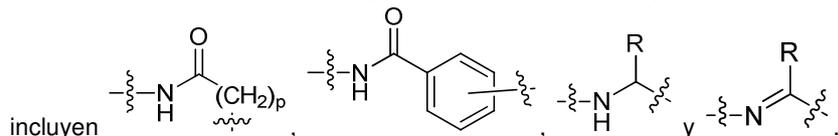


40

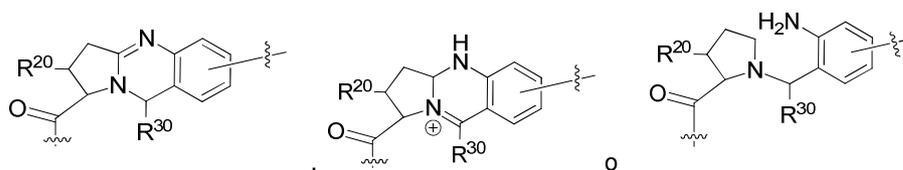
En otras realizaciones, un inmunocombinado de Fórmula (II) que comprende Ab, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión a antígeno, donde el conector se une al Ab mediante un puente disulfuro en

el Ab. En dichas realizaciones, se forma un resto h  mediante reacción de  y un compuesto de Fórmula (I) que contiene una hidroxilamina.

5 En algunas realizaciones, un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de este, comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo Ab que tiene actividad de unión a antígenos, donde el conector L se une al Ab en un -NH₂ libre de lisina. Los componentes conectores formados mediante reacción con el -NH₂ de un residuo de lisina del resto de unión a antígeno, donde cada p es 1-10 y cada R es independientemente H o alquilo C₁₋₄ (preferentemente metilo)

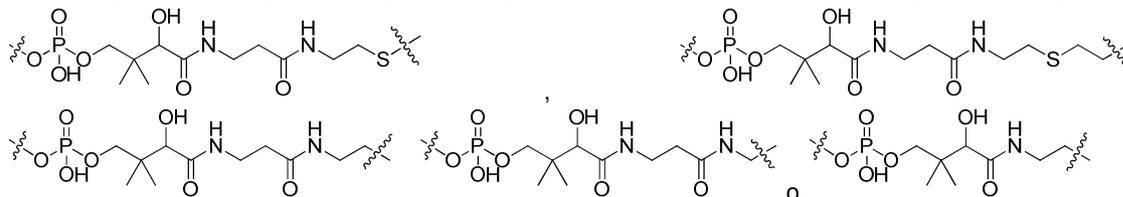


10 En algunas realizaciones, un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo Ab que tiene actividad de unión a antígenos, donde el conector L se une al Ab en un grupo Pcl o Pyl introducido mediante modificación en un anticuerpo. Remítase, por ejemplo, a Ou, *et al.*, PNAS 108(26), 10437-42 (2011). Los componentes conectores formados mediante reacción con un grupo Pcl o Pyl incluyen



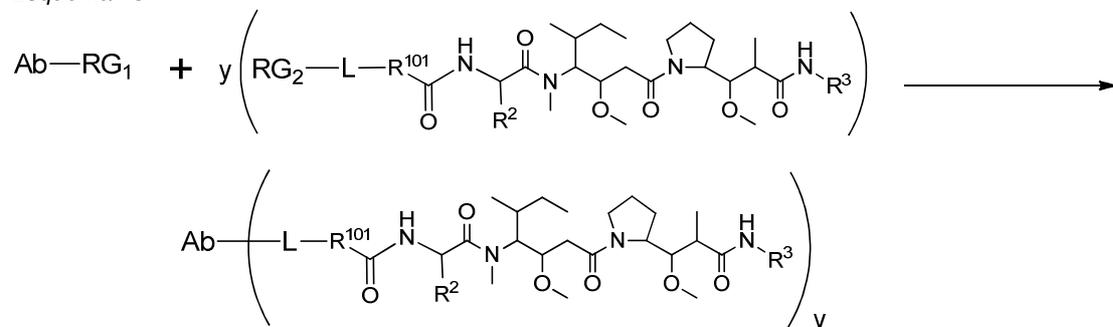
15 es H, Me o Fenilo, para la conexión, donde el grupo acilo mostrado se une a la parte de lisina de un Pcl o Pyl en un anticuerpo modificado.

20 En algunas realizaciones, un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo Ab que tiene actividad de unión a antígenos, donde el conector L se une al Ab en un residuo de serina en un péptido S6, ybbR o A1 introducido mediante modificación en un anticuerpo. Los componentes conectores formados mediante reacción con dichos residuos de serina incluyen



25 A modo de ejemplo, un esquema de reacción general para la formación de inmunoconjugados de Fórmula (II) se muestra en el Esquema 13 a continuación:

Esquema 13



30 donde RG₁ es un grupo reactivo 1 de la Tabla 1 y RG₂ es un grupo reactivo 1 de la Tabla 1 y el producto de reacción de los respectivos grupos (tal como se observa en la Tabla 1) es un componente conector del conector L. R¹⁰¹, R², R³, L y Ab son como se definen en la presente.

Los inmunocombinados de la invención se formulan habitualmente como soluciones o suspensiones en tampón acuoso y/o solución acuosa isotónica. Estos se administran habitualmente por vía parenteral, ya sea por inyección o por infusión. Los métodos para su formulación y administración son similares a aquellos para la formulación y administración de otros productos farmacéuticos de base biológica tales como productos terapéuticos de anticuerpos, y son conocidos por los expertos en la técnica.

Determinadas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y se preparan supositorios convenientemente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias valiosas desde el punto de vista terapéutico. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen aproximadamente un 0,1-75%, o contienen aproximadamente un 1-50%, del principio activo.

La potencia de destrucción de células *in vitro* proporcionada en la Tabla 2 obtenida para ciertos péptidos citotóxicos de Fórmula (I) muestra que dichos compuestos de fórmula (I) presentan actividades farmacológicas valiosas, y de este modo, estos compuestos se pueden utilizar como la carga de un ADC. Los inmunocombinados que comprenden un compuesto de fórmula (I), tal como se demuestra en la presente, presentan actividad sustancial sobre células *in vitro* y sobre tumores *in vivo* utilizados como diana, tal como se demuestra por la potente inhibición del crecimiento de los tumores xenoinjertados que representan diferentes tipos de cáncer humano. Por tanto, los inmunocombinados de Fórmula (II) de la invención, que comprenden una carga de Fórmula (I), y una subfórmula de estos, conectados a un resto de unión a antígeno tal como un anticuerpo, también son útiles para tratar tipos de cáncer tales como tumores gástricos, mieloides, de colon, nasofaríngeos, esofágicos y de próstata, glioma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena, leucemia linfocítica, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielóide crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica aguda de linaje T o LLA-T, leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), tricoleucemia), linfoma (linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH)), mieloma múltiple, cáncer de vejiga, renal, gástrico (por ejemplo, tumores del estroma gastrointestinal (TEGI)), hígado, melanoma y pancreático, y sarcoma.

Una realización de la invención proporciona la conjugación de un compuesto de fórmula (I) y subfórmulas de esta, a un resto de unión a antígeno, y la formación de este modo de un inmunocombinado de Fórmula (II), tal como se describe en la presente.

Los inmunocombinados de la invención que comprenden un compuesto de Fórmula (I), o subfórmula de esta, son particularmente útiles para tratar tipos de cáncer de los que se tiene constancia en la técnica que se inhiben con toxinas antimetabólicas, y se demostró en la presente que esos tipos de tumores son susceptibles de inhibición con los compuestos y combinados de la invención. Algunas indicaciones adecuadas para el tratamiento incluyen tumores gástricos, mieloides, de colon, nasofaríngeos, esofágicos y de próstata, glioma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena, leucemia linfocítica, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielóide crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica aguda de linaje T o LLA-T, leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), tricoleucemia), linfoma (linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH)), mieloma múltiple, cáncer de vejiga, renal, gástrico (por ejemplo, tumores del estroma gastrointestinal (TEGI)), hígado, melanoma y pancreático, y sarcoma. Los inmunocombinados de la invención que comprenden un compuesto de Fórmula (I), o una subfórmula de esta, son particularmente útiles en terapia. En una realización adicional, la terapia es para una enfermedad que se puede tratar con toxinas antimetabólicas. En otra realización, los compuestos de la invención son útiles para tratar tipos de cáncer, que incluyen tumores gástricos, mieloides, de colon, nasofaríngeos, esofágicos y de próstata, glioma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena, leucemia linfocítica, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielóide crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica aguda de linaje T o LLA-T, leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), tricoleucemia), linfoma (linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH)), mieloma múltiple, cáncer de vejiga, renal, gástrico (por ejemplo, tumores del estroma gastrointestinal (TEGI)), hígado, melanoma y pancreático, y sarcoma.

Los métodos habitualmente comprenden administrar una cantidad eficaz de un inmunocombinado de la invención tal como se describe en la presente o una composición farmacéutica que comprende dichos inmunocombinados a un sujeto que necesite dicho tratamiento. El inmunocombinado se puede administrar mediante cualquier método adecuado tal como los descritos en la presente, y la administración se puede repetir a intervalos seleccionados por un facultativo a cargo del tratamiento.

Por tanto, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un inmunocombinado de fórmula (I) o cualquiera de las realizaciones de dichos compuestos descritos en la presente, para la fabricación de un medicamento. En una realización adicional, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad que se puede

tratar con toxinas antimetabólicas. En otra realización, la enfermedad se selecciona entre tumores gástricos, mieloides, de colon, nasofaríngeos, esofágicos y de próstata, glioma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena, leucemia linfocítica, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielóide crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica aguda de linaje T o LLA-T, leucemia linfocítica crónica (LLC), síndrome mielodisplásico (SMD), tricoleucemia), linfoma (linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH)), mieloma múltiple, cáncer de vejiga, renal, gástrico (por ejemplo, tumores del estroma gastrointestinal (TEGI)), hígado, melanoma y pancreático, y sarcoma.

La composición o combinación farmacéutica de la presente invención puede estar en dosis unitarias de aproximadamente 1-1000 mg de uno o varios principios activos para un sujeto de aproximadamente 50-100 kg, o aproximadamente 1-500 mg o aproximadamente 1-250 mg o aproximadamente 1-150 mg o aproximadamente 0,5-100 mg, o aproximadamente 1-50 mg de principios activos. La dosificación terapéuticamente eficaz de un compuesto, la composición farmacéutica o las combinaciones de estas, depende de la especie del sujeto, del peso corporal, de la edad y del estado individual, del trastorno o enfermedad, o de la gravedad de esta, que se esté tratando. Un facultativo, médico o veterinario experto puede determinar fácilmente la cantidad eficaz de cada uno de los principios activos necesaria para prevenir, tratar o inhibir el progreso del trastorno o la enfermedad.

Las propiedades de dosificación citadas anteriormente son demostrables en pruebas *in vitro* e *in vivo* que utilizan convenientemente mamíferos, p. ej., ratones, ratas, perros, monos, u órganos aislados, tejidos y preparados de estos. Los compuestos de la presente invención se pueden aplicar *in vitro* en forma de soluciones, p. ej., soluciones acuosas, e *in vivo* por vía enteral, parenteral, convenientemente por vía intravenosa, p. ej., en forma de una suspensión o en solución acuosa. La dosificación *in vitro* puede oscilar entre concentraciones de aproximadamente 10^{-3} molar y 10^{-12} molar. Una cantidad terapéuticamente eficaz *in vivo* puede variar en función de la vía de administración, entre aproximadamente 0,1-500 mg/kg, o entre aproximadamente 1-100 mg/kg.

Un inmunoc conjugado de Fórmula (II) o Fórmula (III), o subfórmulas de estas, de la presente invención se puede administrar simultáneamente con, o antes o después de, uno o más coagentes terapéuticos diferentes. Un inmunoc conjugado de Fórmula (II) o Fórmula (III), o una subfórmula de estas, de la presente invención se puede administrar por separado, por una vía de administración idéntica o diferente, o de forma conjunta en la misma composición farmacéutica que el o los coagentes.

En una realización, la invención proporciona un producto que comprende un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención, o una subfórmula de esta, y al menos un coagente terapéutico diferente como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia. En una realización, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o afección tal como cáncer con una toxina antimetabólica. Los productos proporcionados como un preparado combinado incluyen una composición que comprende un inmunoc conjugado de Fórmula (II) o subfórmula de esta, y el o los otros coagentes terapéuticos juntos en la misma composición farmacéutica, o el inmunoc conjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, y el o los otros coagentes terapéuticos en forma separada, p. ej., en forma de un kit.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inmunoc conjugado de Fórmula (II), o una subfórmula de esta, y otro u otros coagentes terapéuticos. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se ha descrito anteriormente.

Los coagentes adecuados para su uso con los compuestos y conjugados de la invención incluyen otros agentes anticancerosos, agentes antialérgicos, agentes antieméticos, analgésicos, agentes antiinflamatorios, agentes citoprotectores y combinaciones de estos.

Los coagentes específicos considerados para su uso en combinación con los compuestos y conjugados divulgados en la presente incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfán (Myleran®), inyección de busulfán (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonil-5-deoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytosan® o Neosar®), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U®), inyección de liposomas de citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomycin D, Cosmegen), clorhidrato de daunorubicina (Cerubidine®), inyección de liposomas de citrato de daunorubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Aflacil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitabina, Gemcitabine (difluorodeoxicitidina), hidroxiaurea (Hydrea®), Idarubicina (Idamicina®), ifosfamida (IFEX®), irinotecán (Camptosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalán (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), mylotarg, paclitaxel (Taxol®), phoenix (Ytrio90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosán 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), clorhidrato de topotecán para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), y vinorelbina (Navelbine®).

En una realización, la invención proporciona un kit que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene un compuesto de Fórmula (II), o subfórmula de esta. En una realización, el kit

comprende un medio para mantener por separado dichas composiciones, tal como un recipiente, frasco dividido o envase de aluminio dividido.

5 En las terapias combinadas de la invención, el inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, de la invención y el otro coagente terapéutico pueden ser fabricados y/o formulados por el mismo o diferentes fabricantes. Además, el inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, de la invención y el otro agente terapéutico se pueden integrar en una terapia combinada: (i) antes de dispensar el producto combinado a los facultativos (p. ej., en el caso de un kit que comprende el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico), (ii) por parte de los mismos facultativos (o bajo la supervisión del facultativo) poco antes de la administración; (iii) en los mismos pacientes, p. ej., durante la administración secuencial del compuesto de la invención y el otro agente terapéutico.

15 La invención también proporciona un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con un péptido citotóxico. La invención también proporciona un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con un péptido citotóxico, donde el inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro coagente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con un péptido citotóxico, donde el otro coagente terapéutico se prepara para la administración con un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta. La invención también proporciona un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, se administra con otro coagente terapéutico. La invención también proporciona otro coagente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el otro coagente terapéutico se administra con un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta.

25 La invención también proporciona el uso de un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, para el tratamiento de una enfermedad o afección con un péptido citotóxico, donde el paciente ha sido tratado previamente (p. ej., dentro de un periodo de 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el paciente ha sido tratado previamente (p. ej., dentro de un periodo de 24 horas) con un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta.

30 La invención también proporciona un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con una toxina antimitótica. La invención también proporciona un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro coagente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el otro coagente terapéutico se prepara para la administración con un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta. La invención también proporciona un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, se administra con otro coagente terapéutico. La invención también proporciona otro coagente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el otro coagente terapéutico se administra con un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta.

45 La invención también proporciona el uso de un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta, para el tratamiento de una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el paciente ha sido tratado previamente (p. ej., dentro de un periodo de 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección con una toxina antimitótica, donde el paciente ha sido tratado previamente (p. ej., dentro de un periodo de 24 horas) con un inmunoconjugado de Fórmula (II), o subfórmula de esta.
50 Conjugación de Conector-Carga (L-P) con un resto de unión a antígeno

Ejemplo 101: Conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) formados mediante conjugación de anticuerpos anti-Her2 y anticuerpo 20507 con mutación de Cys con los péptidos citotóxicos de Fórmula (I)

55 Se conocen en la técnica numerosos métodos para conjugar conectores-cargas a un resto de unión a antígeno (revisadas en, por ejemplo: *Antibody-Drug Conjugate, Methods in Molecular Biology*, Vol. 1045, Editor L. Ducry, Humana Press (2013)). En este ejemplo, los compuestos de Fórmula (I) de la invención que comprenden un conector se conjugaron con residuos de cisteína introducidos mediante modificación en un anticuerpo utilizando métodos descritos en Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y, Meng YG, Ng C, Yang J, Lee CC, Duenas E, Gorrell J, Katta V, Kim A, McDorman K, Flagella K, Venook R, Ross S, Spencer SD, Lee Wong W, Lowman HB, Vandlen R, Sliwkowski MX, Scheller RH, Polakis P, Mallet W. (2008) *Nature Biotechnology* 26:925-932. La conjugación de los péptidos citotóxicos de Fórmula (I) de la invención se ilustra en la presente utilizando un pequeño conjunto de anticuerpos con mutación de Cys, pero se prevé que los péptidos citotóxicos se puedan conjugar a la mayor parte, si no a todos, los mutantes de anticuerpos con Cys posibles. Además,

se espera que los péptidos citotóxicos se puedan conjugar con mutantes con Cys de numerosos anticuerpos, si no todos.

Debido a que las Cys introducidas mediante modificación en los anticuerpos expresados en células de mamíferos son modificadas por aductos (disulfuros) tales como el glutatión (GSH) y/o la cisteína durante su biosíntesis (Chen *et al.*, 2009), la Cys modificada en el producto expresado inicialmente no es reactiva frente a reactivos que reaccionan con tiol tales como grupos maleimido o bromo- o yodoacetamida. Para conjugar la cisteína introducida mediante modificación después de la expresión, es necesario eliminar los aductos de cisteína o glutatión reduciendo estos disulfuros, lo cual generalmente permite reducir todos los disulfuros en la proteína expresada. Esto se puede lograr exponiendo en primer lugar el anticuerpo a un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) seguido por un procedimiento que permita la reoxidación de todos los enlaces disulfuro nativos del anticuerpo para restablecer y/o estabilizar la estructura del anticuerpo funcional. Por consiguiente, con el fin de reducir todos los enlaces disulfuro nativos y el disulfuro unido entre los aductos de GSH o cisteína del residuo de cisteína introducido mediante modificación, se añadió DTT recién preparada a los constructos anti-Her2 o anticuerpo 20507 con mutación de Cys purificados, hasta una concentración final de 20 mM. Después de la incubación con DTT a 37 °C durante 1 hora, las mezclas se dializaron a 4 °C frente a PBS durante tres días con intercambio de tampón diario para eliminar el DTT y reoxidar los enlaces disulfuro nativos. Un método alternativo es eliminar los reactivos reductores a través de una columna de desalinización tal como Sephadex G-25. Una vez que la proteína está totalmente reducida, se añade ascorbato oxidado (ácido deshidroascórbico) 1 mM a las muestras desalinizadas y las incubaciones de reoxidación se llevan a cabo durante 20 horas. Ambos métodos producen resultados similares. Sin embargo, los intentos para seguir los protocolos de reoxidación descritos anteriormente en la bibliografía utilizando CuSO_4 dieron como resultado la precipitación de las proteínas (Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y, Meng YG, Ng C, Yang J, Lee CC, Duenas E, Gorrell J, Katta V, Kim A, McDorman K, Flagella K, Venook R, Ross S, Spencer SD, Lee Wong W, Lowman HB, Vandlen R, Sliwkowski MX, Scheller RH, Polakis P, Mallet W. (2008) *Nature Biotechnology* 26:925). Todos los ejemplos de la presente utilizan el protocolo de diálisis descrito anteriormente. La reoxidación restaura los disulfuros intracatenarios, mientras que la diálisis elimina las cisteínas y los glutationes conectados inicialmente a la cisteína o cisteínas introducidas mediante modificación del anticuerpo.

Después de la reoxidación, el anticuerpo se conjugó con un péptido citotóxico de Fórmula (I), donde el péptido citotóxico de Fórmula (I) comprende un conector y un resto reactivo. A modo de ejemplo, se añadieron péptidos citotóxicos de Fórmula (I) que tenían un resto maleimida conectado (10 equivalentes molares respecto al anticuerpo) a los anticuerpos anti-Her2 o anticuerpo 20507 con mutación de cys reoxidados en tampón PBS (pH 7,2). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 hora. El proceso de conjugación se monitorizó mediante HPLC en fase inversa, la cual es capaz de separar los anticuerpos conjugados de los no conjugados. Las mezclas de reacción de conjugación se analizaron en una columna PRLP-S (4000 Å, 50 mm x 2,1 mm, Agilent), se calentaron hasta 80 °C y la elución de la columna se llevó a cabo con un gradiente lineal de un 30-60% de acetonitrilo en agua que contenía un 0,1% de TFA con un caudal de 1,5 mL/min. La elución de proteínas de la columna se monitorizó a 280 nm, 254 nm y 215 nm.

La eficiencia de conjugación de varios péptidos citotóxicos que tienen una maleimida conectada a un anticuerpo anti-Her2 o anticuerpo 20507 con mutación de Cys varió en función de la solubilidad de los péptidos citotóxicos utilizados, pero la mayoría de las reacciones dieron como resultado más de un 90% de conjugado (Tablas 5 y 6). Para evaluar el estado de agregación, los conjugados resultantes se analizaron en una columna de cromatografía de exclusión de tamaños (GE, Superdex200, 3,2/30) con un caudal de 0,1 mL/min en PBS. Todos los conjugados eran principalmente monoméricos. La mayoría de los conjugados contienen menos de un 3% de material dimérico y oligomérico (Tablas 5 y 6), lo que indica que la conjugación de dichos péptidos citotóxicos que tienen una maleimida conectada al anticuerpo anti-Her2 o anticuerpo 20507 con mutación de Cys no provocó agregación. De forma similar, la conjugación enzimática a través de las etiquetas A1 o ybbR (Ejemplos 104 y 105) también procede con eficiencias de conjugación superiores a un 90% (Tabla 7 y 9) y da como resultado conjugados que son monoméricos con menos de un 3% de agregados detectables (Tablas 7 y 9).

Los conjugados también se caracterizaron en cuanto a la carga promedio de un péptido citotóxico en el resto de unión del anticuerpo, denominada generalmente proporción de fármaco respecto a anticuerpo (DAR). El valor de DAR se extrapola a partir de los datos de LC-MS para las muestras reducidas y desglucosiladas. El LC/MS permite la cuantificación del número promedio de moléculas de carga (fármaco) unidas a un anticuerpo en un ADC. La HPLC separa el anticuerpo en cadenas ligeras y pesadas, y separa la cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) conforme al número de grupos de Conector-Carga por cadena. Los datos espectrales de masas permiten la identificación de las especies que componen la mezcla, por ejemplo, LC, LC+1, LC+2, HC, HC+1, HC+2, etc. A partir de la carga promedio en las cadenas LC y HC, se puede calcular la DAR promedio para un ADC. La DAR para una muestra de conjugado determinada representa el número promedio de moléculas de fármaco (carga) unidas a un anticuerpo tetramérico que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Las Tablas 5 y 6 proporcionan los valores de DAR obtenidos para los conjugados obtenidos con los anticuerpos anti-Her2 o anticuerpo 20507 y determinados péptidos citotóxicos que tienen una maleimida conectada.

Como comparación, el anticuerpo mutante anticuerpo 20507-LC-S159SC se conjugó con maleimidocaproilmonometilauristatina F (MC-MMAF; Doronina SO, Mendelsohn BA, Bovee TD, Cerveny CG, Alley SC, Meyer DL, Oflazoglu E, Toki BE, Sanderson RJ, Zabinski RF, Wahl AF, Senter PD. *Bioconjug. Chem.* 2006 Ene-Feb;17(1):114-24.) siguiendo los mismos protocolos. Las propiedades del ADC del anticuerpo 20507-LC-S159C-MMAF de comparación se enumeran en la Tabla 6.

Ejemplo 102: Preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco a través de reducción parcial de enlaces disulfuro nativos de anticuerpos no modificados.

Los fármacos citotóxicos de la invención también se pueden conjugar con residuos de cisteína nativos de anticuerpos no modificados utilizando un procedimiento que conlleva la reducción parcial de los anticuerpos (Doronina, S. O., Toki, B. E., Torgov, M. Y., Mendelsohn, B. A., Cerveny, C. G., Chace, D. F., DeBlanc, R. L., Gearing, R. P., Bovee, T. D., Siegall, C. B., Francisco, J. A., Wahl, A. F., Meyer, D. L., y Senter, P. D. (2003) *Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nat. Biotechnol.* 21, 778-784). En este ejemplo, los enlaces disulfuro inter- e intracatenarios de los anticuerpos anti-Her2 y anticuerpo 20507 con una concentración de 5 a 10 mg/mL se redujeron en primer lugar parcialmente en PBS que contenía EDTA 2 mM añadiendo mercaptoetilamina sólida hasta una concentración final de 50 mM e incubando la mezcla a 37 °C durante 1 hora. Después de una desalinización y adición de un 1% p/v de detergente PS-20, los anticuerpos parcialmente reducidos (1-2 mg/mL) se hicieron reaccionar durante la noche a 4 °C con de 0,5 a 1 mg de compuesto de carga 10 por 10 mg de anticuerpo. Los ADC resultantes, anti-Her2-10 y anticuerpo 20507-10, se purificaron mediante cromatografía de Proteína A. Después de un lavado inicial con PBS, los conjugados se eluyeron con citrato 50 mM, a pH 2,7, NaCl 140 mM, se neutralizaron y se esterilizaron por filtración. Se determinó mediante cromatografía de interacción hidrofoba y MS que la DAR promedio de los dos ADC resultantes, anti-Her2-10 y anticuerpo 20507-10 era 4,1 y 4,6, respectivamente. Las propiedades bioquímicas seleccionadas de los dos ADC se mostraron en las Tablas 5 y 6. Además del anticuerpo anti-Her2 y el anticuerpo 20507, se espera que los péptidos citotóxicos de la invención se pueden conjugar con los residuos de cisteína nativos de numerosos anticuerpos, si no todos, utilizando el método anterior (Ejemplo 102).

Tabla 5. Propiedades de varios ADC anti-Her2 con mutación de Cys.

| Nombre de ADC ^a | Fórmula del inmunoconjugado | Eficiencia de conjugación ^b (%) | DAR ^c | Agregación ^d (%) |
|-----------------------------|-----------------------------|--|------------------|------------------------------|
| anti-Her2-LC-S159C-17 | II | 95 | 1,9 | 2,6 |
| anti-Her2-LC-S159C-41 | III | 100 | 2,0 | 2,3 |
| anti-Her2-LC-S159C-34 | III | 95 | 1,9 | 1,7 |
| anti-Her2-LC-S159C-33 | III | 95 | 1,9 | 1,2 |
| anti-Her2-LC-S159C-36 | III | 83 | 1,7 | 2,9 |
| anti-Her2-LC-S159C-35 | III | 95 | 1,9 | 2,0 |
| anti-Her2-LC-S159C-47 | III | 80 | 1,6 | Límite de detección inferior |
| anti-Her2-LC-S159C-43 | III | 90 | 1,8 | 1,7 |
| anti-Her2-LC-S159C-10 | II | 90 | 1,8 | 0 |
| anti-Her2-LC-S159C-11 | II | 95 | 1,9 | 5,0 |
| anti-Her2-LC-S159C-44 | III | 100 | 2,0 | 1,8 |
| anti-Her2-LC-S159C-42 | III | 35 | 0,7 | 2,0 |
| anti-Her2-LC-S159C-12 | II | 95 | 1,9 | 5,0 |
| anti-Her2-LC-S159C-32 | III | 95 | 1,9 | 2,2 |
| anti-Her2-LC-S159C-14 | II | 95 | 1,9 | 2,3 |
| anti-Her2-LC-S159C-38 | III | 95 | 1,9 | 2,4 |
| anti-Her2-LC-S159C-40 | III | 94 | 1,9 | 2,9 |
| anti-Her2-LC-S159C-31 | III | 100 | 2,0 | 2,0 |
| anti-Her2-LC-S159C-37 | III | 83 | 1,7 | 2,9 |
| anti-Her2-LC-S159C-30 | III | 95 | 1,9 | 5,0 |
| anti-Her2-LC-S159C-39 | III | 90 | 1,8 | 2,4 |
| anti-Her2-HC-E152C-S375C-10 | II | 95 | 3,8 | 0,3 |

| Nombre de ADC ^a | Fórmula del inmunocóncugado | Eficiencia de conjugación ^b (%) | DAR ^c | Agregación ^d (%) |
|----------------------------|-----------------------------|--|------------------|-----------------------------|
| Anti-Her2-10 | II | No determinado | 4,1 | 2,3 |

^a El nombre consiste en una descripción del anticuerpo mutado y el último número que corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación química.

^b La eficiencia de conjugación se midió mediante HPLC en fase inversa y describe el porcentaje de anticuerpo convertido a ADC.

5 ^c Proporción de fármaco respecto a anticuerpo según la HPLC en fase inversa.

^d La agregación se midió cromatografía de exclusión de tamaños analítica e incluye especies diméricas y oligoméricas.

Tabla 6. Propiedades de varios ADC del anticuerpo 20507 con mutación de Cys.

| Nombre de ADC ^a | Fórmula del inmunocóncugado | Eficiencia de conjugación ^b (%) | DAR ^c | Agregación ^d (%) |
|------------------------------------|-----------------------------|--|------------------|-----------------------------|
| anticuerpo 20507-HC-E152C-31 | III | 100 | 2 | 0,8 |
| anticuerpo 20507-HC-E152-10 | II | 95 | 1,9 | 0,8 |
| anticuerpo 20507-HC-S376C-47 | III | 95 | 1,9 | 0,5 |
| anticuerpo 20507-LC-K107C-47 | III | 95 | 1,9 | 0,1 |
| anticuerpo 20507-LC-S159C-43 | III | 80 | 1,6 | 1,8 |
| anticuerpo 20507-LC-S159C-44 | III | 100 | 2 | 0,1 |
| anticuerpo 20507-LC-S159C-40 | III | 35 | 0,7 | 2,4 |
| anticuerpo 20507-LC-S159C-MMAF | No aplicable | 95 | 1,9 | 0,2 |
| anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 | II | 98 | 3,9 | 0,6 |
| anticuerpo 20507-10 | II | No determinado | 4,6 | 2,9 |

10 ^a El nombre consiste en una descripción del anticuerpo mutado y el último número que corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación química.

^b La eficiencia de conjugación se midió mediante HPLC en fase inversa y describe el porcentaje de anticuerpo convertido a ADC.

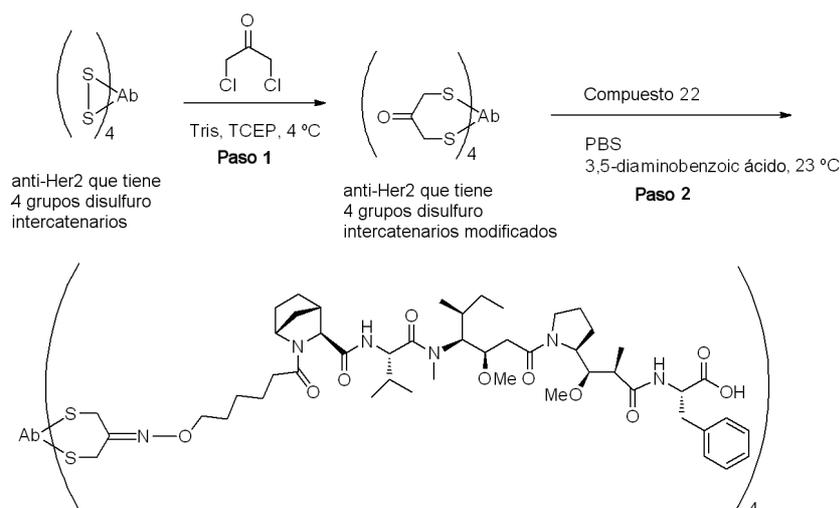
^c Proporción de fármaco respecto a anticuerpo según la HPLC en fase inversa.

15 ^d La agregación se midió cromatografía de exclusión de tamaños analítica e incluye especies diméricas y oligoméricas.

Ejemplo 103: Preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco utilizando 1,3-dicloropropan-2-ona para reconectar enlaces disulfuro nativos de anticuerpos no modificados.

20 La conjugación a los residuos de cisteína nativos de los anticuerpos no modificados utilizando el procedimiento en el Ejemplo 102 tiene la desventaja de que algunos enlaces disulfuro nativos que estabilizan de forma natural el anticuerpo se rompen y permanecen así después de la conjugación del fármaco. En un método alternativo que supera esta desventaja, los enlaces disulfuro inter- e intracatenarios del anticuerpo se reducen en primer lugar y después se reconectan químicamente mediante una reacción con 1,3-dicloropropan-2-ona. En el proceso, los cuatro enlaces disulfuro intercatenarios nativos en un anticuerpo se reemplazan con un «puente cetona» de tres carbonos (Esquema 17). El grupo cetona se puede conjugar entonces específicamente con un fármaco citotóxico en el segundo paso. El ADC resultante tiene hasta cuatro fármacos unidos específicamente en la localización de los cuatro enlaces disulfuro intercatenarios nativos de un anticuerpo. Al contrario que la conjugación tradicional a disulfuros nativos parcialmente reducidos (Ejemplo 102), los ADC preparados en el ejemplo son más estables. En un ejemplo, se preparó anti-Her2 recombinante sin modificar mediante métodos estándar y tal como se ha descrito anteriormente. Después de la purificación, el anti-Her2 modificado se conjugó a un fármaco citotóxico en dos pasos siguiendo el Esquema 17.

Esquema 17



Paso 1: Reducción de puentes disulfuro nativos y nueva formación de puentes utilizando 1,3-dicloropropan-2-ona: Se añadió TCEP·HCl (47,2 µg, 0,165 µmol) a una solución de IgG anti-Her2 (2036 µg, 0,014 µmol) y 1,3-dicloropropan-2-ona (220 µg, 1,648 µmol) en tampón Tris (pH 7,4, 0,25 M, 177µL) a 4 °C. La mezcla resultante se mantuvo a 4 °C durante 4 h. A continuación, la mezcla de reacción se desalinizó utilizando una columna Zeba spin 7K MWCO con PBS (pH 7,4) como tampón de elución. La solución resultante se concentró con un filtro Amicon 10K para proporcionar el anti-Her2 modificado. ESI (Eluyente A: agua + 0,1% de ácido fórmico, Eluyente B: Acetonitrilo + 0,04% de Ácido fórmico. Gradiente: de un 3 a un 80% de B en 2 min - Flujo 1,0 mL/min. Columna: Proswift Monolith 4,6*50mm 40 °C); 145399 Da (después de la desglicosilación con PNGasa F (New England biolab)).

Paso 2: Conjugación del fármaco citotóxico: Una solución de ácido (*S*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((1*R*,3*S*,4*S*)-2-(6-(aminooxi)hexanoil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (**22**) (77 µg, 0,078 µmol, 0,77 µL en DMSO) y ácido 3,5-diaminobenzoico (355 µg, 2,334 µmol, 1,42 µL en DMSO) se añadieron a una solución del anti-Her2 modificado (577,5 µg, 0,0039 µmol, 35 µL en PBS, pH 7,4) a 23 °C. La mezcla resultante se mantuvo a 23 °C durante 21 h. La mezcla de reacción se desalinizó entonces utilizando una columna Zeba spin 7K MWCO con PBS (pH 7,4) como tampón de elución dos veces para proporcionar el anti-Her2 modificado conjugado con el compuesto (**22**). ESI-MS (Eluyente A: agua + 0,1% de Ácido fórmico, Eluyente B: Acetonitrilo + 0,04 % de Ácido fórmico. Gradiente: de un 3 a un 80% de B en 2 min - Flujo 1,0 mL/min. Columna: Proswift Monolith 4,6*50mm 40 °C); 147955 Da (DAR 3), 148807 Da (DAR 4) (después de la desglicosilación mediante el tratamiento con PNGasa F (New England biolab)). Se calculó que la DAR total era DAR 3,7.

Aunque solamente se muestra en la presente para un anticuerpo anti-Her2, se espera que la estrategia de conjugación en este ejemplo sea aplicable a numerosos anticuerpos diferentes, si no todos.

Ejemplo 104: Conjugación de anticuerpos anti-Her2 y anticuerpo 20507 con mutación de etiqueta A1/ybbR con péptidos citotóxicos de Fórmula (I).

La 4'-fosfopanteteinilación posterior a la traducción es un método versátil para el marcaje con especificidad por un sitio de proteínas recombinantes con moléculas de bajo peso molecular estructuralmente diversas (Yin J, Straight PD, McLoughlin SM, Zhou Z, Lin AJ, Golan DE, Kelleher NL, Kolter R, Walsh CT (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:15815-15820) (Zhou Z, Cironi P, Lin AJ, Xu Y, Hrvatin S, Golan DE, Silver PA, Walsh CT, Yin J (2007) *ACS Chem. Biol.* 2:337-346). Esta estrategia enzimática, que se basa en la acción catalítica de 4'-fosfopanteteinil-transferasas (PPTasas) prolíficas, se adoptó para la preparación de ADC muy homogéneos (documento WO2013184514). El marcaje enzimático se logra incorporando secuencias peptídicas 11 o 12-mer de S6, ybbR y A1 en varios sitios de la región constante de un anticuerpo IgG1. Aunque el siguiente ejemplo describe la formación de ADC mediada por PPTasa para solamente un sitio, se espera que la estrategia sea aplicable a numerosos sitios de inserción dentro de la matriz de anticuerpos y se espera que sea aplicable a numerosos anticuerpos.

Un trabajo previo de Burkart y colaboradores reveló que las PPTasas son enzimas versátiles que aceptan una serie de análogos de CoA-indicador como sustratos (La Clair JJ, Foley TL, Schegg TR, Regan CM, Burkart MD (2004) *Chem. Biol.* 11:195-201). Por tanto, para convertir una carga farmacológica en un sustrato adecuado para la catálisis con PPTasas, el péptido citotóxico que contenía maleimida de Fórmula (I) se conjugó con el grupo tiol terminal de la CoA mediante una adición de Michael (remítase al Ejemplo 43). Habiendo unido covalentemente el péptido citotóxico a un elemento de reconocimiento enzimático, el análogo de CoA-péptido citotóxico resultante (Compuesto **20**) se conjugó enzimáticamente a la secuencia peptídica incorporada del respectivo anticuerpo. A modo de ejemplo, se conjugó una

concentración 2,5 μM de anticuerpo anti-Her2-HC-ins388-ybbR o anticuerpo 20507-HC-ins388-A1 con una concentración 30 μM de análogo de CoA-péptido citotóxico (Compuesto **20**) (12 equivalentes molares respecto al anticuerpo) en presencia de 1 μM de Sfp PPTasa de *Bacillus subtilis*. Las reacciones de conjugación enzimática se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas en tampón Tris-HCl 75 mM (pH 8,0) suplementado con NaCl 20 mM y MgCl_2 12,5 mM. Para garantizar el marcaje casi completo del anticuerpo 20507-HC-ins388-A1 con la carga citotóxica, el tiempo de incubación se extendió otros tres días y las concentraciones del análogo de CoA-péptido (Compuesto **20**) y Sfp PPTasa se aumentaron hasta 35 μM (14 equivalentes molares respecto al anticuerpo) y 2 μM , respectivamente. Después de la conjugación, se eliminaron la Sfp PPTasa y el exceso de reactivo mediante cromatografía de afinidad de Proteína A (Protein A-Sepharose™, GE Healthcare Life Sciences). La elución de la columna se llevó a cabo con 0,1 M de tampón de acetato sódico (pH 3,0) seguido de la neutralización inmediata con tampón Tris-HCl 1 M (pH 8,0). Finalmente, se intercambia el tampón de los ADC etiquetados con péptidos en PBS utilizando columnas de desalinización PD-10 (GE Healthcare).

La extensión de la conjugación de la carga se determinó mediante HPLC analítica en una columna PLRP-S (4000 Å, 5 μM , 50 x 4,6 mm, Agilent Technologies) con un gradiente lineal de 6 min de un 25-50% de acetonitrilo en agua que contenía un 0,1% de ácido trifluoroacético. La separación en fase inversa de anticuerpo conjugado y no conjugado se monitorizó a una longitud de onda de 280 nm. Con este fin, la integración de picos de HPLC indicó el marcaje casi completo de los anticuerpos anti-Her2-HC-ins388-ybbR y 20507-HC-ins388-A1 con el análogo de CoA-péptido (Compuesto **20**). La identidad de los ADC marcados enzimáticamente se confirmó adicionalmente obteniendo los espectros de ESI-MS deconvolucionados de las muestras reducidas y desglucosiladas correspondientes. Tal como se muestra en la Tabla 8, las masas observadas están en consonancia con los pesos moleculares calculados de las cadenas pesadas marcadas con fármacos de los anticuerpos anti-Her2-HC-ins388-ybbR y 20507-HC-ins388-A1. Finalmente, los ADC marcados enzimáticamente se analizaron mediante cromatografía de exclusión de tamaños analítica (AnSEC) en una columna Shodex PROTEIN KW-803. Ambos conjugados de anticuerpo se eluyeron a los tiempos de retención que correspondían al peso molecular aparente del ADC monomérico (remítase a la Tabla 7). No se detectaron otras especies, lo que indica que la conjugación del análogo de CoA-péptido hidrófilo no promovió la agregación de los anticuerpos.

Tabla 7. Propiedades de los ADC anti-Her2 y anticuerpo 20507 con etiqueta A1/ybbR.

| Nombre de ADC ^a | Fórmula del inmunoconjugado | Eficiencia de conjugación ^b (%) | DAR ^c | Agregación ^d % |
|----------------------------------|-----------------------------|--|------------------|------------------------------|
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-20 | II | 96 | 1,9 | Límite de detección inferior |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 | II | 96 | 1,9 | Límite de detección inferior |

^a HC-ins388 se refiere a la inserción de la etiqueta peptídica A1 o ybbR después del residuo Glu388 en la cadena pesada. El último número corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación química.

^b La eficiencia de conjugación se midió mediante HPLC en fase inversa y describe el porcentaje de anticuerpo convertido a ADC.

^c Proporción de fármaco respecto a anticuerpo según la HPLC en fase inversa.

^d La agregación se midió cromatografía de exclusión de tamaños analítica e incluye especies dimericas y oligoméricas.

Tabla 8. Propiedades de los ADC anti-Her2 y anticuerpo 20507 con etiqueta A1/ybbR.

| Nombre de ADC ^a | Fórmula del inmunoconjugado | Masa observada (Da) ^b | Masa esperada de la cadena pesada del conjugado (Da) ^c | Masa esperada de la cadena pesada sin modificar (Da) ^d |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|---|---|
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-20 | II | 51605,02 | 51607,3 | 50331,8 |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 | II | 51286,32 | 51289,9 | 50014,4 |

^a HC-ins388 se refiere a la inserción de la etiqueta peptídica A1 o ybbR después del residuo Glu388 en la cadena pesada. El último número corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación química.

^b Masa en Dalton tal como se detecta en un instrumento Agilent 6520 Q-TOF (Agilent Technologies).

^c Masa en Dalton tal como se ha predicho para la cadena pesada conjugada.

^d Masa en Dalton tal como se ha predicho para la cadena pesada sin acoplar.

Ejemplo 105: Conjugación de dos pasos de los anticuerpos mutantes anti-Her2 y anticuerpo 20507 etiquetados con A1/ybbR con un péptido citotóxico de Fórmula (I)

El método de dos pasos es una estrategia alternativa para preparar ADC con especificidad por un sitio mediante 4'-fosfopanteteinilación posterior a la traducción (documento WO2013184514). El primer paso de esta estrategia se basa

en el marcaje catalizado por PPTasa de un anticuerpo etiquetado con péptidos con un análogo de CoA que contiene un grupo bioortogonal tal como un resto azido, alqueno, alquino, cetona o aldehído. Después de la purificación por afinidad del anticuerpo marcado bioortogonalmente, el segundo paso del método de dos pasos conlleva la conjugación de una carga citotóxica que comprende un resto reactivo con el grupo bioortogonal. A modo de ejemplo, la siguiente sección describe el método de dos pasos para los anticuerpos mutantes anticuerpo 20507 y anti-Her2 que contienen una inserción de etiqueta A1 o ybbR en un sitio específico dentro de la región constante de la cadena pesada. Además, la siguiente sección describe el método de dos pasos para los anticuerpos mutantes anticuerpo 20507 y anti-Her2 que contienen una inserción de etiqueta A1 o ybbR en un sitio específico dentro de la región constante de la cadena pesada. Sin embargo, se prevé que esta estrategia sea ampliamente aplicable a numerosos sitios de inserción dentro de las regiones constantes de una amplia variedad de anticuerpos. Además, aunque el método de dos pasos se ilustra para el ligamiento de oximas y la química click sin cobre, se puede concebir que esta estrategia se podría extender a otras químicas bioortogonales tales como el ligamiento de Staudinger, la química click basada en isonitrilo y el ligamiento con tetrazina.

El ligamiento con oxima y la química click sin cobre han sido utilizados por varios grupos de investigación como un método eficiente bioortogonal para la preparación de conjugados de proteínas con especificidad por un sitio (Axup JY, Bajjuri KM, Ritland M, Hutchins BM, Kim CH, Kazane SA, Halder R, Forsyth JS, Santidrian AF, Stafin K, Lu Y, Tran H, Seller AJ, Biroc SL, Szydlík A, Pinkstaff JK, Tian F, Sinha SC, Felding-Habermann B, Smider VV, Schultz PG (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:16101-16106) (Rabuka D, Rush JS, deHart GW, Wu P, Bertozzi CR (2012) *Nat Protoc*. 7:1052-1067) (Plass T, Milles S, Koehler C, Schultz C, Lemke EA (2011) *Angew Chem Int Ed Engl*. 50:3878-3881) (Kaya E, Vrabl M, Deiml C, Prill S, Fluxa VS, Carell T (2012) *Angew Chem Int Ed Engl*. 51:4466-4469). Con el fin de combinar la 4'-fosfopanteteinilación con el ligamiento con oxima, se unió covalentemente un grupo cetona a CoA haciendo reaccionar esta última con metil vinil cetona (remítase al Ejemplo 93). Después, se utilizó la catálisis con PPTasa para conjugar enzimáticamente el grupo cetona bioortogonal con especificidad por un sitio en la etiqueta A1 incorporada de un anticuerpo anti-Her2. Específicamente, se conjugaron 2.5 μM de anticuerpo anti-Her2-HC-ins388-A1 con una concentración 30 μM del análogo de CoA-cetona resultante (Compuesto 49) (12 equivalentes molares respecto al anticuerpo) en presencia de una concentración 1 μM de Sfp PPTasa de *Bacillus subtilis*. El primer paso del método de dos pasos se llevó a cabo durante aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente en tampón Tris-HCl 75 mM (pH 8,0), suplementado con MgCl_2 12,5 mM y NaCl 20 mM. El marcaje casi completo del anticuerpo anti-Her2-HC-ins388-A1 con el análogo de CoA-cetona (Compuesto 49; remítase al Ejemplo 93) se verificó obteniendo los espectros de ESI-MS deconvolucionados de la muestra reducida y desglucosilada. Las condiciones de reacción similares también dieron como resultado una funcionalización con cetona casi cuantitativa del anticuerpo 20507-HC-ins388-A1. Tal como se muestra en la Tabla 10, las masas observadas están en consonancia con los pesos moleculares calculados de las cadenas pesadas funcionalizadas con cetona correspondientes. Después de eliminar la Sfp PPTasa y el exceso de análogo de CoA-cetona mediante cromatografía de afinidad de Proteína A (Protein A-Sepharose™, GE Healthcare Life Sciences), los anticuerpos activados con cetona, anti-Her2-HC-ins388-A1-49 y anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49, se eluyeron con una concentración 0,1 M de tampón de acetato sódico (pH 3) seguido de la neutralización inmediata con tampón Tris-HCl 1 M (pH 8). Las soluciones de anticuerpos neutralizadas se sometieron a intercambio de tampón en agua y se hicieron pasar a través de filtros con un tamaño de poro de 0,22 μm .

En otro aspecto de esta estrategia de marcaje de dos pasos, se prepararon quimioenzimáticamente análogos de CoA modificados utilizando las enzimas de CoA biosintéticas CoAA, CoAD y CoAE (Worthington AS, Burkart MD (2006) *Org Biomol Chem*. 4:44-46) (Kosa NM, Haushalter RW, Smith AR, Burkart MD (2012) *Nat Methods* 9:981-984). Adoptando esta estrategia, se prepararon análogos de CoA funcionalizados con cetona a partir de las moléculas precursoras de pantotenato correspondientes (i-10), (i-12) e (i-13) (remítase a los Ejemplos 94, 96 y 97). Del mismo modo, se sintetizó quimioenzimáticamente un análogo de CoA funcionalizado con azida a partir del respectivo derivado de pantotenato (i-11) (remítase al Ejemplo 95). En esta estrategia, los ultrafiltrados de los Ejemplos 94-97 se utilizaron sin purificación adicional, y los análogos de CoA CoA-(i-10), CoA-(i-11), CoA-(i-12) y CoA-(i-13) se utilizaron para la conjugación a anti-Her2-HC-ins388-ybbR (2,5 μM), con una concentración final de aproximadamente 30 μM . El marcaje de anticuerpos se llevó a cabo en presencia de Sfp PPTasa de *B. subtilis* 1,5 μM durante de 16 a 72 horas a 23 °C en tampón Tris-HCl 75 mM (pH 8,0), suplementado con MgCl_2 12,5 mM y NaCl 20 mM. De forma similar, se conjugó CoA-(i-13) con una concentración final de aproximadamente 25 μM en presencia de enzima Sfp 2 μM .

Se llevó a cabo una cromatografía de afinidad (MabSelect SuRe™, GE Healthcare Life Sciences) de los anticuerpos marcados bioortogonalmente de forma exactamente idéntica a la descrita anteriormente para el análogo cetona-CoA 49. Después de la purificación, las soluciones de anticuerpo neutralizadas se sometieron a intercambio de tampón en PBS. La unión covalente de los restos cetona y azida al anticuerpo etiquetado con ybbR se confirmó mediante análisis de espectrometría de masas siguiendo un tratamiento de muestras con PNGasa F y TCEP (Tabla 10).

La unión con especificidad por un sitio de un grupo cetona permitió el ligamiento con oxima posterior de una carga citotóxica a anti-Her2-HC-ins388-A1-49, anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49, anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-10), y anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-12) activados con cetona como segundo paso del método de dos pasos. Se hizo reaccionar una concentración de 25 a 67 μM de anticuerpo funcionalizado con cetona con un exceso molar de un factor 7,5 a 40 (0,5 - 1 mM) del análogo aminooxi-péptido (Compuesto 22) en tampón de acetato sódico 50 o 100 mM (pH 4 - 5) que

contiene de un 2,5 a un 5% (v/v) de DMSO. Después de 16 a 36 horas de incubación a 23 o 37 °C, se eliminó el reactivo aminooxi en exceso mediante cromatografía de exclusión de tamaños preparativa en una columna de grado preparativo HiLoad 26/600 Superdex 200 (GE Healthcare). La proporción de fármaco respecto a anticuerpo (DAR) se determinó mediante HPLC analítica en una columna PLRP-S (4000 Å, 5 µM, 50 x 4,6 mm, Agilent Technologies) con un gradiente lineal de 5 min de un 30 a un 60% de acetonitrilo en agua que contenía un 0,1% de ácido trifluoroacético. La traza de HPLC se monitorizó a una longitud de onda de 280 nm y después se integraron los picos del anticuerpo conjugado y no conjugado. Tal como se muestra en la Tabla 9, el método de dos pasos proporcionó un marcaje casi cuantitativo de anti-Her2-HC-ins388-A1-49 y anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49 activados con cetona con el análogo aminooxi-péptido (Compuesto **22**). Por el contrario, la conjugación con especificidad por un sitio del compuesto **22** al anticuerpo anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-10) activado con cetona fue menos eficiente, lo que dio lugar a un ADC con una DAR de 1,3. La formación de ADC a través de un ligamiento con oxima se confirmó adicionalmente mediante ESI-MS después de la reducción y desglicosilación de los inmunocombinados (Tabla 10). Finalmente, la cromatografía de exclusión de tamaños analítica (AnSEC) en columnas Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) y Protein KW-803 5 µm 300 x 8 mm (Shodex) revelaron solamente pequeñas cantidades de ADC agregado, lo que sugiere que se induce poca agregación durante el proceso de conjugación de dos pasos.

La unión con especificidad por un sitio de un resto azida a un anticuerpo modificado permite la posterior conjugación de una carga mediante química click sin cobre. En este ejemplo, la reacción bioortogonal es promovida por la tensión anular del grupo biciclo[6.1.0]nonino (BCN), que se une covalentemente al fármaco-conector. La cicloadición alquino-azida promovida por la tensión se llevó a cabo con el anticuerpo anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11) activado con azida en presencia del Compuesto de carga **75** funcionalizado con BCN. Este segundo paso del método de dos pasos se llevó a cabo con una concentración 127 µM de anticuerpo anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11) y una concentración 1270 µM del análogo peptídico conectado a BCN (Compuesto **75**) en tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 7,5) suplementado con NaCl 1 M y un 6% (v/v) de DMSO. Después de aproximadamente 16 horas de incubación a 23 °C, el reactivo de BCN en exceso se eliminó mediante cromatografía de afinidad con Proteína A estándar utilizando MabSelect SuRe™ (GE Healthcare Life Sciences). La elución se llevó a cabo con tampón de elución con IgG (Thermo Scientific), seguida por la neutralización con tampón Tris-HCl 1 M (pH 8) e intercambio de tampón en PBS. Tal como se muestra en la Tabla 10, la conjugación de la carga mediante química click sin cobre se confirmó mediante ESI-MS después de la reducción y la desglicosilación de la muestra de ADC. El mismo método se utilizó para calcular la DAR promedio del inmunocombinado. En este proceso, se suplementaron 10 µg de ADC con 10 µL de una suspensión densa al 50% de IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). La unión a la resina se llevó a cabo con agitación suave durante 1 h a 23 °C. Después de lavar la resina con PBS, el ADC unido por afinidad se desglicosiló mediante adición de 5 µg de PNGasa F y posterior incubación a 37 °C durante 3 horas. La enzima PNGasa F se eliminó lavando la resina de afinidad con PBS. Después, la muestra desglicosilada se eluyó utilizando un 1% de ácido fórmico seguido por la neutralización inmediata con acetato amónico 10 M (pH 5). Para reducir eficazmente el constructo de anticuerpo a las cadenas pesadas y ligeras, se suplementaron 20 µL de eluato con 10 µL de tampón de formiato sódico 100 mM (pH 4,0) que contenía clorhidrato de guanidina 6 M y 5 µL de TCEP 0,66 M en acetato amónico 10 M (pH 5). Después de la incubación durante al menos 30 min a 23 °C, la muestra reducida y desglicosilada se inyectó en un sistema de LC/MS 6550 iFunnel Q-TOF (Agilent Technologies). Se utilizó MassHunter Qualitative Analysis Software (Agilent Technologies) para el procesamiento del registro espectral y la deconvolución espectral. La DAR promedio se calculó como el promedio ponderado del estado de DAR de las alturas de pico relativas a lo largo de una distribución. Tal como se muestra en la Tabla 9, el ADC anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11)-75 tiene una DAR promedio de 2,0, lo que sugiere que ambos pasos de conjugación fueron prácticamente cuantitativos. Finalmente, el ADC se examinó por cromatografía de exclusión de tamaños analítica (AnSEC) en una columna Bio SEC-3 (Agilent Technologies) y se observó que era monomérico en un 95%, lo que sugiere que se induce poca agregación en el proceso de conjugación.

Tabla 9.

Propiedades de anticuerpos etiquetados con A1 e ybbR/ADC marcados mediante un proceso de conjugación de dos pasos

| Nombre del conjugado ^a | Fórmula del inmunocombinado | Eficiencia de conjugación (%) | DAR | Agregación ^f (%) |
|---|-----------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------|
| anti-Her2-HC-ins388-A1-49 | no aplicable | no determinado | no aplicable | no determinado |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49 | no aplicable | no determinado | no aplicable | no determinado |
| anti-Her2-HC-ins388-A1-49- 22 | II | 91 ^b | 1,8 ^d | 3 |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49- 22 | II | 93 ^b | 1,9 ^d | < 1 |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-10) | no aplicable | no determinado | no aplicable | no determinado |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11) | no aplicable | no determinado | no aplicable | no determinado |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-10)- 22 | II | 65 ^b | 1,3 ^d | < 1 |

| Nombre del conjugado ^a | Fórmula del inmunconjugado | Eficiencia de conjugación (%) | DAR | Agregación ^f (%) |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------|
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11)-75 | II | 100 ^c | 2,0 ^e | 5 |

^a HC-ins388 se refiere a la inserción de la etiqueta peptídica A1 o ybbR después del residuo Glu388 en la cadena pesada. El último número corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación. Por ejemplo, el anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22 y el anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 se conjugaron en primer lugar enzimáticamente con el compuesto 49 y después por conjugación química con el compuesto 22.

5 ^b La eficiencia de conjugación se midió mediante HPLC en fase inversa y describe el porcentaje de anticuerpo convertido a ADC.

^c La eficiencia de conjugación se determinó mediante espectrometría de masas y describe el porcentaje de anticuerpo convertido a ADC.

^d Proporción de fármaco respecto a anticuerpo según la HPLC en fase inversa.

10 ^e Proporción de fármaco respecto a anticuerpo según la espectrometría de masas.

^f La agregación se midió mediante cromatografía de exclusión de tamaños analítica e incluye especies diméricas y oligoméricas.

Tabla 10.

15 Propiedades de anticuerpos etiquetados con A1 e ybbR/ADC marcados mediante un proceso de conjugación de dos pasos

| Nombre del conjugado ^a | Fórmula del inmunconjugado | Masa observada (Da) ^b | Masa esperada de la cadena pesada del conjugado (Da) ^c | Masa esperada de la cadena pesada sin modificar (Da) ^c |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---|---|
| anti-Her2-HC-ins388-A1-49 | no aplicable | 50940,08 50880,99 ^e | 50945,4 | 50535,0 |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49 | no aplicable | 50422,23 | 50424,8 | 50014,4 |
| anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22 | II | 51793,38 | 51798,5 | 50535,0 50945,4 ^f |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 | II | 51274,91 | 51277,9 | 50014,4 50424,8 ^f |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-10) | no aplicable | 50665,06 50607,66 ^e | 50668,1 | 50331,8 |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-12) | no aplicable | 50679,05 | 50682,1 | 50331,8 |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-13) | no aplicable | 50604,80 | 50611,0 | 50331,8 |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11) | no aplicable | 50679,55 | 50681,1 | 50331,8 |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-10)-22 | II | 51523,04 50668,67 | 51521,2 | 50331,8 50668,1 ^f |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-12)-22 | II | 51529,21 | 51535,2 | 50331,8 50682,1 ^f |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11)-75 | II | 51713,37 | 51712,4 | 50331,8 50681,1 ^f |

^a HC-ins388 se refiere a la inserción de la etiqueta peptídica A1 o ybbR después del residuo Glu388 en la cadena pesada. El último número corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación. Por ejemplo, el anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22 y el anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 se conjugaron en primer lugar enzimáticamente con el compuesto 49 y después por conjugación química con el compuesto 22.

20 ^b Masa en Dalton tal como se detecta en un instrumento Agilent 6520 Q-TOF (Agilent Technologies).

^c Masa en Dalton tal como se ha predicho para la cadena pesada conjugada.

^d Masa en Dalton tal como se ha predicho para la cadena pesada sin acoplar.

^e Pico minoritario de identidad desconocida.

25 ^f Cadena no modificada se refiere tanto a las especies no fosfopanteteiniladas como a las funcionalizadas con cetona/azida.

Aunque los inmunconjugados de Fórmula (II) y Fórmula (III) divulgados en la Tabla 5 y 6 se obtuvieron conjugando los anticuerpos anti-Her2 y anticuerpo 20507 Cys y determinados péptidos citotóxicos de Fórmula (I) que tienen un resto maliemida conectado, también se han utilizado otras combinaciones de conector-carga de la invención. Los inmunconjugados divulgados en las Tablas 7 a 10 son ejemplos de este tipo. La conjugación a anticuerpos no modificados es otro ejemplo. Esto se puede lograr mediante la conjugación a enlaces disulfuro parcialmente reducidos

30

tal como se ha descrito en los Ejemplos 102 y 103. Los anticuerpos no modificados también pueden ser lisinas conjugadas utilizando, por ejemplo, el compuesto 89, o una serie de métodos diferentes conocidos en la técnica.

5 Ejemplo 106: Ensayos de proliferación celular para medir *in vitro* la potencia de destrucción celular de los ADC de anti-Her2 y anticuerpo 20507 con etiquetas A1/ybbR y Cys.

Se utilizan frecuentemente células que expresan de forma natural antígenos diana o líneas celulares modificadas para que expresen antígenos diana para someter a ensayo la actividad y potencia de los ADC. Para la evaluación de la potencia de destrucción celular de los ADC de anticuerpo anti-Her2 *in vitro*, se emplearon dos líneas celulares modificadas, clon 16 y clon 40 de MDA-MB231, y cuatro líneas celulares endógenas, células JimT1, HCC1954, NCI-N87 y SKBR3 (Clinchy B, Gazdar A, Rabinovsky R, Yefenof E, Gordon B, Vitetta ES. *Breast Cancer Res Treat.* (2000) 61:217-228). Las células del clon 16 de MDA-MB231 expresan de forma estable números de copias elevados (~5x10⁵ copias/célula) de Her2 humano recombinante, mientras que el clon 40 expresa números de copias bajos (~5x10³ copias/célula) de Her2 humano. En HCC1954 se expresan de forma endógena niveles elevados de Her2 (~5x10⁵ copias/célula), SKBR-3 (5,4x10⁵ copias/célula) y las líneas celulares NCI-N87 (2,7x10⁵ copias/célula) mientras que las células JimT-1 expresan Her2 humano en un nivel medio (~8x10⁴ copias/célula). Como control negativo, se utilizó la línea celular A375 negativa para Her2. Un efecto citotóxico dependiente de antígeno debería destruir solamente células que expresan suficiente antígeno en la superficie celular y no las células que carecen del antígeno. Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo con Cell-Titer-Glo™ (Promega) cinco días después de que las células se incubasen con varias concentraciones de ADC (Riss *et al.*, (2004) *Assay Drug Dev Technol.* 2:51-62). En algunos estudios, los ensayos basados en células son de alto rendimiento y se llevaron a cabo en un sistema automatizado (Melnick *et al.*, (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3153-3158).

25 Todos los ADC anti-Her2 excepto uno (anti-Her2-LC-S159C-44) destruían específicamente líneas celulares con niveles elevados de expresión de Her2, concretamente el clon 16 de MDA-MB231, HCC1954, NCI-N87, SKBR3, pero no mostraban potencia citotóxica hacia células del clon 40 de MDA-MB231, que expresan un nivel bajo de Her2, y tampoco hacia células A375 negativas para Her2 (Figura 1; Tabla 11, Tabla 13). La CI₅₀ de los ADC anti-Her2 en las cuatro líneas celulares que expresan niveles elevados de Her2 oscila de 20 pM a 700 pM (Tabla 11, Tabla 13). En las células JimT-1 que expresan un nivel medio de Her2, las actividades de destrucción celular con los anti-Her2-ADC variaron ampliamente. Algunos ADC fueron activos en células que expresaban niveles elevados de Her2, pero no en células JimT-1. Muchos ADC destruyeron la células JimT-1 con la misma eficacia que las líneas celulares que expresaban niveles elevados de Her2 (Tabla 11, Tabla 13). Los resultados sugieren que los ADC anti-Her2 destruían células Her2+ de forma dependiente de Her2 y que los ADC son activos hacia múltiples tipos de células. De forma similar, los ADC anti-Her2 preparados mediante un método de reducción parcial de anticuerpos de origen natural (Ejemplo 102) y mediante métodos enzimáticos a través de una etiqueta A1 o ybbR (Ejemplos 104 y 105) y mediante una metodología de puentes cetona (Ejemplo 103) también destruían células Her2+ de una forma dependiente de Her2 (Tabla 11), lo que demuestra que los péptidos citotóxicos divulgados en la invención retienen su potencia cuando se conjugan a anticuerpos a través de un método y química de conjugación diferentes.

40 Para verificar si los péptidos citotóxicos de Fórmula (I) son también activos cuando se conjugan con otros anticuerpos, se conjugaron varios péptidos citotóxicos de Fórmula (I) al anticuerpo 20507, cuyo antígeno se expresa en las células H526, KU812 y CMK11-5, pero no en las células de Jurkat. Tal como se muestra en la Figura 2 y en la Tabla 12, las combinaciones de carga y conector que muestran actividades de destrucción celular en células Her2+ también son activas cuando se conjugan al anticuerpo 20507, al destruir células que expresan el antígeno diana. Los resultados indican que los péptidos citotóxicos de Fórmula (I) descritos en la presente muestran citotoxicidad hacia una amplia gama de tipos de células.

Tabla 11.

50 Potencia de ADC en un ensayo de destrucción celular *in vitro*: CI₅₀ de los ADC anti-Her2 en ensayos de proliferación celular de clon 40 de MDA-MB231, clon 16 de MDA-MB231, HCC1954 y JimT-1

| Nombre de ADC ^a | CI ₅₀ (μM) ^b | | | |
|----------------------------|------------------------------------|----------|----------|-----------------------|
| | clon 40 de MDA-MB-231 | HCC1954 | JimT1 | clon 16 de MDA-MB-231 |
| anti-Her2-LC-S159C-17 | 5,28E-02 | 2,19E-04 | 5,28E-02 | 7,43E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-41 | 6,67E-02 | 5,78E-05 | 1,12E-04 | 2,81E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-34 | 6,67E-02 | 9,25E-05 | 4,26E-04 | 4,79E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-33 | 6,67E-02 | 1,89E-04 | 6,67E-02 | 7,97E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-36 | 6,67E-02 | 5,16E-05 | 1,07E-04 | 2,83E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-35 | 6,67E-02 | 6,71E-05 | 3,71E-04 | 4,65E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-47 | 6,67E-02 | 5,51E-05 | 7,74E-05 | 5,47E-05 |

| Nombre de ADC ^a | CI ₅₀ (μM) ^b | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|----------|----------|-----------------------|
| | clon 40 de MDA-MB-231 | HCC1954 | JimT1 | clon 16 de MDA-MB-231 |
| anti-Her2-LC-S159C-43 | 6,67E-02 | 7,32E-05 | 1,65E-04 | 4,55E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-10 | 6,67E-02 | 6,17E-05 | 1,17E-04 | 5,38E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-11 | 2,33E-02 | 4,85E-04 | 2,33E-02 | 7,40E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-44 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 |
| anti-Her2-LC-S159C-42 | 6,67E-02 | 7,27E-05 | 1,38E-03 | 6,67E-05 |
| anti-Her2-LCS159C-12 | 2,33E-02 | 5,09E-04 | 2,33E-02 | 3,70E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-32 | 6,67E-02 | 5,45E-05 | 9,83E-05 | 5,32E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-14 | 6,67E-02 | 7,51E-05 | 6,67E-02 | 6,74E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-38 | 6,67E-02 | 2,94E-04 | 6,67E-02 | 7,90E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-40 | 6,67E-02 | 7,33E-05 | 1,78E-04 | 3,44E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-31 | 4,70E-02 | 3,04E-05 | 4,82E-05 | 1,84E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-37 | 6,67E-02 | 1,56E-04 | 1,14E-04 | 1,58E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-30 | 1,87E-02 | 4,05E-04 | 1,87E-02 | 3,56E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-39 | 6,67E-02 | 6,00E-05 | 2,11E-04 | 3,75E-05 |
| anti-Her2-HC-E152C-S375C-10 | 6,67E-02 | 1,56E-04 | 1,70E-04 | 1,84E-04 |
| anti-Her2-10 | 6,67E-02 | 2,18E-04 | 1,29E-03 | 2,25E-04 |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-20 | 6,02E-02 ^c | 7,98E-05 | 2,47E-04 | 5,08E-05 |
| anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22 | 5,73E-02 ^c | 1,37E-04 | 1,53E-04 | 1,31E-04 |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-10)-22 | 6,53E-02 ^c | 4,14E-05 | 1,01E-03 | 5,98E-04 |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11)-75 | 6,00E-02 ^c | 9,88E-05 | 6,53E-04 | 1,59E-04 |
| Anti-Her2-22 | 6,67E-02 | 6,52E-05 | 2,01E-04 | 2,96E-05 |

^a El nombre consiste en una descripción del anticuerpo mutado y el último número que corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación química. HC-ins388 se refiere a la inserción de la etiqueta peptídica A1 o ybbR después del residuo Glu388 en la cadena pesada.

^b La concentración más elevada utilizada en el ensayo fue 6,67E-02 μM. Los valores de CI₅₀ de 6,67E-02 μM se refieren por tanto a la inactividad del ADC en el ensayo.

^c El valor es igual a la concentración más elevada utilizada en el ensayo, lo que indica por tanto inactividad del ADC.

Tabla 12

Potencia de ADC en un ensayo de destrucción celular *in vitro*: CI₅₀ de los ADC de anticuerpo 20507 en ensayos de proliferación con células de Jurkat, H526, KU812 y CMK11-5.

10

| Nombre de ADC ^a | CI ₅₀ (μM) ^b | | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|
| | JURKAT | H526 | KU812 | CMK11-5 |
| anticuerpo 20507-HC-E152C-10 | 6,67E-02 | 1,28E-04 | 7,82E-05 | 1,60E-04 |
| anticuerpo 20507-LC-K107C-47 | 6,67E-02 | 5,40E-05 | 6,54E-05 | 6,24E-05 |
| anticuerpo 20507-HC-S375C-47 | 6,67E-02 | 5,05E-05 | 5,35E-05 | 5,45E-05 |
| anticuerpo 20507-LC-S159C-42 | 6,67E-02 | 7,30E-05 | 2,17E-04 | 5,77E-05 |
| anticuerpo 20507-LC-S159C-43 | 6,67E-02 | 5,11E-05 | 5,01E-05 | 4,89E-05 |
| anticuerpo 20507-LC-S159C-44 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 |

| Nombre de ADC ^a | CI ₅₀ (μM) ^b | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|
| | JURKAT | H526 | KU812 | CMK11-5 |
| anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 | 6,67E-02 | 1,77E-05 | 2,07E-05 | 1,93E-05 |
| anticuerpo 20507-10 | 6,67E-02 | 2,47E-05 | 2,09E-05 | 7,34E-06 |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 | 4,50E-02 | 2,62E-04 | 1,86E-04 | 3,35E-04 |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 | 6,67E-02 | 1,67E-04 | 2,37E-03 | 9,68E-04 |

^a El nombre consiste en una descripción del anticuerpo mutado y el último número que corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación química. HC-ins388 se refiere a la inserción de la etiqueta peptídica A1 después del residuo Glu388 en la cadena pesada.

^b La concentración más elevada utilizada en el ensayo fue 6,67E-02 μM. Los valores de CI₅₀ de 6,67E-02 μM se refieren por tanto a la inactividad del ADC en el ensayo.

Tabla 13

Potencia de ADC en un ensayo de destrucción celular *in vitro*: CI₅₀ de los ADC anti-Her2 en ensayos de proliferación de células A375, HCC1954, JimT-1 NCI-N87 y SKBR3.

| Nombre de los ADC | CI ₅₀ (μM) ^b | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------|----------|-------------------|-------------------|
| | A375 | HCC1954 | JimT1 | NCI-N87 | SKBR3 |
| anti-Her2-LC-S159C-77 | 6,67E-02 | 1,73E-04 | 3,58E-04 | 2,12E-04 | 1,61E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-80 | 6,67E-02 | 1,72E-04 | 4,94E-04 | 1,79E-04 | 1,60E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-79 | 6,67E-02 | 1,87E-04 | 6,34E-04 | 2,03E-04 | 1,61E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-78 | 6,67E-02 | 1,08E-04 | 3,27E-04 | 1,08E-04 | 1,67E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-91 | 6,67E-02 | 2,21E-05 | 6,67E-02 | 4,23E-05 | 6,12E-05 |
| anti-Her2-LC-S159C-76 | 6,67E-02 | 1,07E-04 | 6,67E-02 | 4,27E-04 | 3,38E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-82 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 9,80E-04 | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-89 | 6,67E-02 | 2,16E-04 | 6,67E-02 | 2,20E-04 | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-90 | 6,67E-02 | N.D. ^c | 7,70E-04 | 1,64E-04 | 1,55E-04 |
| anti-Her2-LC-S159C-83 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | N.D. ^c | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-84 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | N.D. ^c | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-85 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-86 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-87 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | N.D. ^c | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-88 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | 6,67E-02 | N.D. ^c | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-93 | 6,67E-02 | 1,38E-04 | 2,12E-04 | N.D. ^c | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-94 | 6,67E-02 | 1,67E-04 | 2,41E-04 | N.D. ^c | N.D. ^c |
| anti-Her2-LC-S159C-92 | 6,67E-02 | 1,91E-04 | 3,02E-04 | N.D. ^c | N.D. ^c |

^a El nombre consiste en una descripción del anticuerpo mutado y el último número que corresponde al compuesto utilizado en el paso de conjugación química.

^b La concentración más elevada utilizada en el ensayo fue 6,67E-02 μM. Los valores de CI₅₀ de 6,67E-02 μM se refieren por tanto a la inactividad del ADC en el ensayo.

^c N.D.: no determinado

Ejemplo 107: Estudio farmacocinético de ADC de anti-Her2 y anticuerpo 20507.

Se ha demostrado que una semivida en suero prolongada es crítica para una eficacia *in vivo* elevada de los ADC (Hamblett, *et al.*, "Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate," *Clin Cancer Res.*, 10:7063-7070 (2004); Alley *et al.*, *Bioconjug Chem.* 19:759-765 (2008)). La unión de una carga farmacológica hidrófoba a un anticuerpo podría afectar a las propiedades de un anticuerpo, y esto puede dar lugar a una eliminación rápida de los ADC *in vivo* (Hamblett *et al.*, 2004) y a escasa eficacia *in vivo*. Para evaluar los efectos de la conjugación de varios péptidos citotóxicos de la invención en la eliminación de los ADC *in vivo*, se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos en ratones que no portaban tumores. Para detectar el péptido citotóxico (es decir, la

parte farmacológica) de los inmunoconjugados de la invención en plasma murino, se generó un anticuerpo anti-MMAF que también reconoce varios péptidos citotóxicos de la invención. Se desarrollaron ELISA para la detección de los inmunoconjugados en una plataforma Gyros™ utilizando un anticuerpo anti-hlgG para capturar moléculas IgG humanas del plasma y un segundo anticuerpo anti-IgG humano y el anticuerpo anti-MMAF para la detección de señales en dos ensayos separados. El anticuerpo anti-MMAF reconoce los péptidos citotóxicos de la invención y, por tanto, se puede utilizar para detectar ADC con los péptidos citotóxicos unidos (ADC «intactos»). Por tanto, los dos ELISA miden la concentración en suero del anticuerpo humano y el ADC «intacto», respectivamente.

Se muestran ejemplos de estudios PK en la Figura 3 y la Figura 4. Se administró a tres ratones por grupo una única dosis de los siguientes ADC con una concentración de 1 mg/kg: ADC de anti-Her2-LC-S159C-10 (Figura 3A), anti-Her2-LC-S159C-47 (Figura 3B), anti-Her2-LC-S159C-77 (Figura 3C), anti-Her2-LC-S159C-80 (Figura 3D), anti-Her2-LC-S159C-79 (Figura 3E), anti-Her2-LC-S159C-78 (Figura 3F), anti-Her2-LC-S159C-14 (Figura 3G), anti-Her2-HC-E152C-S375C-10 (Figura 3H), anti-Her2-10 (Figura 3I), anticuerpo 20507-HC-E152C-10 (Figura 4A), anticuerpo 20507-LC-K107C-47 (Figura 4B), anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 (Figura 4C), anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 (Figura 4D), anticuerpo 20507-10 (Figura 4E), anti-Her2-HC-ins388-ybbR-20 (Figura 4G), anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 (Figura 4H), anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22 (Figura 4I), y anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11)-75 (Figura 4J). Se administró el anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 (Figura 4F) con una única dosis de 10 mg/kg. Se recogieron muestras de plasma durante tres semanas y se sometieron a ensayo mediante ELISA utilizando un anticuerpo anti-hlgG para capturar las moléculas IgG que incluían los ADC de anticuerpo 20507 y anti-Her2, así como los respectivos anticuerpos puros. El anticuerpo anti-MMAF y un anticuerpo anti-hlgG se utilizaron después para la detección en dos ensayos separados. El ensayo de anticuerpo anti-MMAF mide la concentración de conjugados de anticuerpos solamente y el anti-hlgG cuantifica tanto conjugados de anticuerpo como anticuerpo que carece de cargas. Se generaron curvas estándar para cada ADC por separado utilizando el mismo material que se inyectó en los ratones. Los ensayos con anti-MMAF y anti-hlgG deberían proporcionar, por tanto, lecturas de concentración idénticas si no tienen lugar cambios en la carga de fármaco del ADC de anticuerpo 20507 o anti-Her2 después de la inyección en los ratones. Para los ADC que pierden parte de la carga, el ensayo con el anticuerpo anti-MMAF medirá una concentración inferior que el ensayo anti-hlgG. Una comparación de las dos lecturas de concentración permite, por tanto, medir la liberación de fármaco a partir de los ADC de anticuerpo 20507 y anti-Her2 durante la incubación *in vivo* en el ratón.

Tal como se muestran en la Figura 3 y la Figura 4, las concentraciones en plasma obtenidas tanto en ensayos anti-hlgG como anti-MMAF coinciden bien con la mayoría de ADC con cargas de maleimida que se conjugan con una o más Cys introducidas mediante modificación en ambos anticuerpos anti-Her2 y anticuerpo 20507 (Figura 3A-I, Figura 4D), lo que sugiere que existe una pérdida de fármaco mínima en estos ADC durante el periodo de prueba para estos ADC. Los dos ADC preparados mediante reducción parcial de anticuerpos de origen natural, anti-Her2-10 (Figura 3I) y anticuerpo 20507-10 (Figura 4E), mostraron una pronunciada separación entre las concentraciones determinadas con los ensayos anti-hlgG y anti-MMAF, siendo la primera superior a última, lo que sugiere que hay una pérdida de fármaco significativa durante el periodo de prueba para los dos ADC. Los ADC preparados por métodos mediados por enzimas, ADC de anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20, anti-Her2-HC-ins388-ybbR-20, anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22, y anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22 mostraron una buena coincidencia entre las concentraciones determinadas mediante ensayos anti-IgG y anti-MMAF (Figura 4F, G, H e I). Por el contrario, el ADC anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11)-75 (Figura 4J) presentó una gran separación entre los ensayos anti-hlgG y anti-MMAF, lo que sugiere que el ADC experimenta una desconjugación del fármaco significativa durante el curso del estudio FC.

Tal como se muestra en la Figura 4, las concentraciones plasmáticas obtenidas mediante tanto el ensayo anti-hlgG como el ensayo anti-MMAF coinciden bien con el ADC de anticuerpo 20507-HC-E153C-10, ADC de anticuerpo 20507-LC-K107C-47 y ADC de anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20, lo que sugiere que hay una pérdida de fármaco mínima en estos ADC durante el periodo de prueba.

Con el fin de determinar la retención de las cargas farmacológicas para los ADC después de tres semanas en la circulación del ratón con más detalle, los ADC se purificaron por afinidad a partir de suero de ratón recogido mediante sangrado terminal y las cargas farmacológicas unidas a los ADC se analizaron mediante análisis MS. En un proceso típico, se diluyeron 200 µL de plasma con una cantidad igual de PBS que contenía EDTA 10 mM. A la dilución, se añadieron 10 µL de resina de afinidad (IgG Select Sepharose 6 Fast flow; GE Healthcare 17-0969-01; suspensión densa al 50%). Se llevó a cabo una incubación de la resina con las muestras de plasma diluidas durante 1 h a temperatura ambiente aplicando agitación suave para evitar que sedimentase la resina. A continuación, la resina se eliminó por filtración y se lavó dos veces con 200 µL de PBS. Para desglucosilar el anticuerpo, se añadieron 10 µL de PNGasa F (1 mg/mL, 1/2x TBS pH 7,4, EDTA 2,5 mM, Glicerol al 50%) diluidos con 10 µL de PBS a la resina y las mezclas se incubaron durante 2-3 h a 37 °C. Después de que se eliminase la PNGasa F lavando la resina de afinidad dos veces con 200 µL de PBS, la muestra se eluyó dos veces de la resina de afinidad añadiendo 20 µL de ácido fórmico al 1% y se eliminó la resina por filtración. Los eluatos combinados se diluyeron con 20 µL de clorhidrato de guanidina 6 M y 5 µL de tampón de reducción (TCEP 0,66 M, acetato amónico 3,3 M, pH 5). Para reducir eficazmente el anticuerpo, las muestras se incubaron durante al menos 30 min a temperatura ambiente antes del análisis. El LCMS se llevó a cabo con un sistema de HPLC Agilent 1260/6550-iFunnel QTOF MS de Agilent Technologies. Se utilizó una cromatografía en fase inversa estándar para desalinizar la muestra con una columna PLRS (8 µm, 2,1 x 50 mm, 1000Å, Agilent) con un caudal de 0,5 mL/min a 80 °C. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente lineal de un 20%- a

un 60%-de acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1% en 6 min. Se utilizó Agilent Qualitative Analysis para el procesado del registro espectral y la deconvolución espectral. Para el análisis, el registro espectral se sumó durante el intervalo temporal que cubría la elución de todas las especies relevantes. Los espectros sumados se deconvolucionaron en su estado de carga y se registraron las imágenes de los espectros deconvolucionados. Se extrajeron los valores de intensidad de pico para las especies asignables. Se realizaron asignaciones de estado de DAR y especies fragmentadas basándose en los valores de masa calculada a partir de la secuencia de los anticuerpos analizados y los desplazamientos de masas esperados de los conjugados con las moléculas de fármaco. La DAR promedio se calculó utilizando las alturas de pico relativas de todos los estados de DAR a lo largo de una distribución. Se calculó la DAR de los anticuerpos promedio como la suma de las DAR de 2 cadenas ligeras promedio y 2 cadenas pesadas promedio.

La DAR promedio de los ADC purificados después de tres semanas en la circulación del ratón, medida mediante MS, se comparó a la DAR en los preparados de ADC originales. La «retención de carga» se calculó a partir de la proporción de las dos DAR (DAR de los ADC aislados a partir de plasma de ratón divididas por la DAR del preparado de ADC original), y representa el porcentaje de cargas retenidas en el ADC después de tres semanas en la circulación del ratón. La retención de carga de varios ADC medida mediante MS está en gran medida en consonancia con los resultados obtenidos con el ensayo ELISA mencionado anteriormente utilizando el anticuerpo anti-MMAF (Figuras 3 y 4).

Tal como se muestra en la Tabla 14, la retención de carga osciló ampliamente de un 5% a un 96% dependiendo del compuesto, los sitios de conjugación y el método de conjugación. Para los ADC preparados mediante el método enzimático de PPTasa, la retención de carga (mediante MS) para los compuestos **20** y **22** es superior a un 50%, mientras que para el compuesto **75**, la retención de carga es solamente un 5% (Tabla 14). En el último caso, la evaluación de espectrometría de masas del ADC purificado a partir del suero de las sangrías terminales reveló una escisión prácticamente cuantitativa del resto carbamato del fármaco-conector, mientras que la unión mediante química click entre el anticuerpo y la carga citotóxica permaneció estable en circulación.

Para los ADC preparados con péptidos citotóxicos reactivos con Cys que presentan un grupo maleimida, la retención de carga osciló de un 18% a un 96%, dependiendo de la estructura del compuesto y los sitios de conjugación (Tabla 14). Los resultados de MS para los ADC aislados a partir de las muestras de plasma confirman que tenía lugar una desconjugación de las cargas de los ADC entre las cargas de maleimida y el grupo tiol de los residuos de Cys conjugados. No se observaron roturas en las estructuras conectoras. Por lo tanto, la retención de carga para las cargas conectadas con maleimida puede ser inversamente proporcional a la desconjugación mediante adición de Michael, ya que la masa observada del anticuerpo no conjugado recuperado es la del anticuerpo sin modificar.

Se tiene constancia de que la reacción para formar un tioéter entre una maleimida y un grupo tiol libre es reversible (*Bioconjugate Chem.* 2011, 22, 1946-1953). Se cree que la reacción inversa es responsable de la desconjugación de las cargas de fármacos con maleimida de los ADC *in vivo* e *in vitro*. Posteriormente, la maleimida de las cargas desconjugadas puede reaccionar con tioles libres en forma de aminoácidos, péptidos o proteínas. (*Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 759-765; *Nat. Biotechnol.* 2012, 30, 184-189).

Para determinados péptidos citotóxicos de la invención, se observó que la desconjugación de las cargas de los ADC en la circulación sanguínea de los ratones era despreciable (Tabla 14). Después de tres semanas en la circulación de los ratones, se observó que se retenía un 90% de las cargas para los ADC preparados con los compuestos **47**, **14**, **77**, **80**, **79** y **78** que se conjugaban a las Cys introducida mediante modificación de los anticuerpos. El análisis MS de estos ADC aislados a partir de muestras de plasma reveló que la masa de los ADC aumentó en 18 dalton para cada carga farmacológica conjugada, lo que sugería que había tenido lugar una reacción de hidrólisis. Se tiene constancia de que el anillo de succinimida resultante de la reacción de un grupo maleimida con una cisteína experimenta una hidrólisis espontánea (Gregory, *J. Am. Chem. Soc.* 1955, 77, 3922; Knight, P. *Biochem. J.* 1979, 179, 191-197; Khan M.N. *J Pharm Sci.* 1984, 73:1767-1771). De hecho, el grupo se puede hidrolizar a propósito exponiendo un conjugado a pH básico (por ejemplo, *Biochem. J.* 1979 179, 191-197; *Biochemistry* 1976, 15, 2863-8; *Chem Commun.* 2011; 47: 5452-5454). La apertura de anillo hidrolítica del grupo succinimida producirá una unión tioéter estable que no estará sujeto a la reacción inversa con la maleimida mencionada anteriormente (*Bioconjugate Chem.* 2011, 22, 1946-1953; *Nat. Biotechnol.* 2012, 30, 184-189; *Nat. Biotechnol.* 2014, 32, 1059). Determinados compuestos de la invención, ejemplificados por los compuestos **47**, **14**, **77**, **80**, **79** y **78**, tienen una hidrólisis del anillo de succinimida mayor cuando se conjugan con residuos de Cys en los anticuerpos y producen así conjugados de anticuerpo y fármaco más estables.

Tabla 14

Retención de carga de ADC seleccionados después de 3 semanas en ratones que no han recibido tratamiento determinada por IP-MS

| ADC | Tasa de retención de carga (%) |
|-------------------------|--------------------------------|
| anti-Her2-LC-S159C-MMAF | 76% |
| anti-Her2-LC-S159C-10 | 69% |

| ADC | Tasa de retención de carga (%) |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| anti-Her2-LC-S159C-47 | 93% |
| anti-Her2-LC-S159C-14 | 88% |
| anti-Her2-LC-S159C-77 | 88% |
| anti-Her2-LC-S159C-80 | 96% |
| anti-Her2-LC-S159C-79 | 88% |
| anti-Her2-LC-S159C-78 | 92% |
| anti-Her2-HC-E152C-S375C-10 | 50% |
| anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 | 56% |
| anticuerpo 20507-LC-K107C-47 | 85% |
| anticuerpo 20507-HC-E152C-10 | 68% |
| anti-Her2-MMAF | 30% |
| anti-Her2-10 | 18% |
| anticuerpo 20507-10 | 20% |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 | 69% |
| anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22 | 75% |
| anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 | 54% |
| anti-Her2-HC-ins388-ybbR-(i-11)-75 | 5% |

Ejemplo 108: Estabilidad *in vitro* de los ADC.

Los efectos de la hidrólisis del anillo de succinimida en la estabilidad de los ADC preparados con los péptidos citotóxicos de la invención se estudiaron adicionalmente *in vitro*. Los cambios en las masas resultantes de la desconjugación de cargas y la hidrólisis del anillo de succinimida de las cargas de maleimida conjugadas a los anticuerpos se monitorizaron mediante LC-MS. Se ha publicado que la hidrólisis del anillo de succinimida se ve estimulada por determinadas condiciones tales como pH elevado, temperatura elevada o concentraciones de sales elevadas (*J. Am. Chem. Soc.* 1955, 77, 3922; *Biochemistry*, 1976, 15, 2836; *Biochem. J.* 1979, 179, 191-197; *J Pharm Sci.* 1984, 73:1767-1771, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 6286-6289). Para investigar la estabilidad *in vitro* de los ADC en función del pH, se incubaron anti-Her2-LC-S159C-10 y anti-Her2-LC-S159C-47 a 37 °C en tampones que oscilaban de pH 7,0 a pH 9,0 y los ADC se analizaron en varios puntos temporales mediante MS para determinar el grado de desconjugación de cargas y de hidrólisis de succinimida. Las poblaciones relativas de los ADC desconjugados, ADC con carga unida con anillo de succinimida hidrolizado y ADC con carga unida con anillo de succinimida intacto se calcularon a partir de las intensidades de MS relativas de las especies de ADC correspondientes. Tal como se muestra en la Figura 5A, el aumento del pH del tampón de incubación aumenta la desconjugación de anti-Her2-LC-S159C-10. En tampón a pH 7,0, el anti-Her2-LC-S159C-10 era estable con aproximadamente un 10% de pérdida de carga después de 10 horas. Sin embargo, la incubación en tampón a pH 8,0 y pH 9,0 durante 10 horas aumentó el grado de desconjugación de carga hasta aproximadamente un 30% y un 60%, respectivamente (Figura 5A). Por el contrario, la incubación de anti-Her2-LC-S159C-47 en tampones con pH 7,0 a pH 9,0 a 37 °C durante 25 horas no dio como resultado más de un 15% de desconjugación (Figura 5C).

En paralelo, el grado de hidrólisis del anillo de succinimida de los dos ADC también se determinó en los distintos puntos temporales (Figura 5B y Figura 5D). Para ambos ADC, el aumento de pH del tampón de incubación estimuló la hidrólisis del anillo de succinimida. Para anti-Her2-LC-S159C-47, la hidrólisis del anillo de succinimida tuvo lugar de forma significativamente más rápida que para anti-Her2-LC-S159C-10. La incubación de anti-Her2-LC-S159C-10 en tampón a pH 7,5 durante 25 horas dio lugar a la desconjugación de un 30% de la carga y se hidrolizó un 20% de la carga que aún estaba unida al anticuerpo (Figura 5A y Figura 5B). En las mismas condiciones de incubación, el anti-Her2-LC-S159C-47 perdió solo aproximadamente un 10% de la carga, mientras que se hidrolizó aproximadamente un 90% de la carga unida (Figura 5C y Figura 5D). Tal como se muestra en la Figura 5E, y F, se analizaron la conjugación de cargas *in vitro* y la hidrólisis del anillo de succinimida para los ADC anti-Her2-LC-S159C-10, anti-Her2-LC-S159C-77, anti-Her2-LC-S159C-80, anti-Her2-LC-S159C-79, anti-Her2-LC-S159C-78 y anti-Her2-LC-S159C-14 incubados en tampones a pH 8,5 durante 24 horas a 37 °C. Si bien la desconjugación de las cargas no fue detectable para los ADC de anti-Her2-LC-S159C-77, anti-Her2-LC-S159C-80, anti-Her2-LC-S159C-79, anti-Her2-LC-S159C-78 y anti-Her2-LC-S159C-14 (Figura 5E), se observó un grado elevado de hidrólisis del anillo de succinimida para todos los ADC (Figura 5F). Por tanto, determinados compuestos de la invención, ejemplificados por los compuestos **47**, **14**, **77**, **80**, **79** y **78**, presentan una estabilidad de los ADC mejorada debido a una menor susceptibilidad a la desconjugación a través de la reacción de maleimida inversa y una estabilización adicional mediante la hidrólisis del anillo de succinimida.

Ejemplo 109: Estudios de eficacia *in vivo* con los ADC de anticuerpo 20507.

Los modelos de xenoinjerto *in vivo* estimulan la actividad biológica observada en seres humanos y están constituidos por líneas celulares tumorales o tumores primarios humanos bien caracterizados con relevancia para el injerto en ratones atímicos inmunodeficientes. Los estudios sobre el tratamiento de ratones con xenoinjertos tumorales con reactivos anticancerosos han proporcionado una información valiosa sobre la eficacia *in vivo* de los reactivos evaluados (Sausville y Burger, (2006) Cancer Res. 66:3351-3354). Como las células H526 expresan el antígeno del anticuerpo 20507 en su superficie y son destruidas selectivamente por los ADC de anticuerpo 20507 (Figura 2, Tabla 12), se utilizó la línea celular para generar un modelo de xenoinjerto con el fin de evaluar la actividad *in vivo* de los ADC de anticuerpo 20507. Todos los estudios animales se llevaron a cabo de conformidad con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (publicación de NIH; National Academy Press, 8.ª edición, 2001). Se implantaron células H526 en ratones nu/nu por vía subcutánea (Morton y Houghton, *Nat Protoc.* 2007;2:247-250). Después de que el tamaño del tumor alcanzase ~200 mm³, se administraron tres ADC de anticuerpo 20507 en el ratón mediante inyección *i. v.* en una única dosis con una concentración de 3 mg/kg o 10 mg/kg. El crecimiento tumoral se midió periódicamente después de la inyección de ADC. Cada grupo de tratamiento incluía 7 ratones. Un ejemplo de un estudio de eficacia *in vivo* de este tipo se muestra en la Figura 6A. El tratamiento de los ratones con una concentración de 3 mg/kg de ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 provocó una inhibición del crecimiento tumoral, mientras que el tratamiento con una concentración de 10 mg/kg de ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 dio lugar a regresión tumoral (Figura 6A). La eficacia del ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 es equivalente a la de un ADC de control positivo, anticuerpo 20507-HC-E152C-MMAF conjugado con el compuesto de referencia MC-MMAF. No se observó pérdida de peso asociada con el tratamiento de ADC, lo que sugería una toxicidad sistémica baja. Los resultados confirman que con un tratamiento de una única dosis con una concentración de 10 mg/kg, el ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 provocó de forma eficaz una regresión de tumores de H526 sin pérdida de peso significativa. En un segundo estudio, se administraron los ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 y anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-20 en ratones que portaban tumores H526 con dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg (Figura 6B). Ambos ADC presentaban una actividad de inhibición tumoral con una concentración de 3 mg/kg y actividad de regresión tumoral con una concentración de 10 mg/kg similares. El ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 fue ligeramente más eficaz que el ADC de 20507-HC-ins388-A1-20.

En otro ejemplo, los inventores comparan la eficacia *in vivo* de dos ADC de anticuerpo 20507, anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 y anticuerpo 20507-10, en el modelo de xenoinjerto H526 (Figura 6C). Los dos ADC se prepararon con la misma carga, conjugando el compuesto 10 con diferentes sitios de Cys utilizando dos métodos diferentes. Se preparó el anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 con un anticuerpo con mutación de Cys, tal como se describe en el Ejemplo 101 con el compuesto 10 conjugado a residuos de Cys introducidos mediante modificación, HC-E152C y HC-S375C. El anticuerpo 20507-10 se preparó utilizando el método de reducción parcial del anticuerpo 20507 de origen natural tal como se ha descrito en el Ejemplo 102 con el compuesto 10 conjugado a residuos de Cys nativos. El anticuerpo 20507-10 tiene una DAR ligeramente superior (DAR 4,6) que el anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 (DAR 3,9) (Tabla 6). Los estudios farmacocinéticos mostraron que los dos ADC retenían la misma carga en un grado muy diferente durante las tres semanas de circulación en el ratón (Figura 4D, Figura 4E, Tabla 14): Anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 que muestra una retención de carga mucho mejor (56%) que el anticuerpo 20507-10 (20%).

En el modelo de xenoinjerto H526, la misma dosis de anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C-10 es más eficaz para inhibir tumores que el anticuerpo 20507-10 (Figura 6C). El anti-Her2-HC-E152C-S375C-10, cuyo antígeno no se expresa en las células H526, no mostró ninguna actividad de inhibición tumoral.

En un tercer estudio, se inyectaron *i.v.* los ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 y anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 en ratones que portaban tumores H526 con una única dosis de 7 mg/kg (Figura 6D). Aunque el ADC de anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22 presentaba inhibición tumoral, el ADC de anticuerpo 20507-HC-E152C-10 presentaba regresión tumoral al mismo nivel de dosis, indicativo de una mayor eficacia de este último ADC. No se observó actividad de inhibición tumoral significativa para el ADC de control de isotipo, anti-Her2-HC-ins388-A1-49-22, lo que sugería una destrucción tumoral con especificidad por un antígeno por parte de los ADC de anticuerpo 20507. Juntos, los tres estudios confirman que los péptidos citotóxicos de la invención unidos por una serie de métodos a un anticuerpo pueden provocar la regresión de un cáncer que expresa antígenos en un modelo de xenoinjerto de ratón.

Ejemplo 110: Producción de Sfp 4'-fosfopanteteinil-transferasa (PPTasa)

[0405] La Sfp PPTasa de *Bacillus subtilis* se clonó en el vector de expresión pET22b utilizando el método PIPE (remítase a Klock et al., *Proteins* 71:982-994 (2008)). Para permitir la escisión de la etiqueta His₆ C terminal, se insertó un sitio de reconocimiento de proteasas de TEV (virus del grabado del tabaco) en dirección 3' respecto a la secuencia codificadora de Sfp. Todos los cebadores utilizados para la clonación y la secuencia proteica de Sfp se enumeran en la Tabla 15.

Tabla 15.

Cebadores utilizados para la clonación y secuencia proteica de Sfp

| Nombre de la secuencia | Secuencia | SEQ ID NO |
|---|---|--------------|
| Sfp pET22b de <i>B. subtilis</i> | GAAGGAGATATACATATGAAAATTTA TGGGATTTACATGGATCGC | SEQ ID NO:25 |
| | GTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGCAAT TCTTCATAGGAGACCATCG | SEQ ID NO:26 |
| pET22b | CACCACCACCACCACCACTGAG | SEQ ID NO:27 |
| | CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTA AACAAAATTATTTTC | SEQ ID NO:28 |
| TEV en Sfp pET22b de <i>B. subtilis</i> | GAGAACCTGTACTTCCAAGGCCACC ACCACCACCACCACTGAG | SEQ ID NO:29 |
| | GCCTTGGAAGTACAGGTTCTCCAGC AATTCTTCATAGGAGACCATCG | SEQ ID NO:30 |
| Sfp PPTasa de <i>Bacillus subtilis</i> con sitio de escisión de TEV C terminal y etiqueta His6. | MKIYGIYMDRPLSQEENERFMSFISPE KREKRRFYHKEDAHRTLLGDVLRVRS VISRQYQLDKSDIRFSTQEYKPCIPD LPDAHFNISHSGRWVICAFDSQPIGIDI EKTKPISLEIAKRFFSKTEYSDLLAKDK DEQTDYFYHLWSMKESFIKQEGKGLS LPLDSFSVRLHQDGQVSIELPDSHSP CYIKTYEVDPGYKMAVCAAHPDFPEDI TMVSYEELLENLYFQGH HHHH | SEQ ID NO:31 |

Se llevaron a cabo la expresión y purificación de proteínas de acuerdo con Yin *et al.*, (remítase a *Nat. Protoc.* 1:280-285 (2006)) con algunas modificaciones. En resumen, se inoculó 1 L de medio TB a partir de cultivos saturados durante una noche de células *Escherichia coli* BL21 (DE3) que albergan el plásmido de expresión pET22b/sfp. El cultivo se agitó a 250 rpm a 37 °C y se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM después de alcanzar una densidad óptica (600 nm) de 0,7. La temperatura se redujo hasta 30 °C y el cultivo se agitó a 250 rpm durante aproximadamente 16 horas antes de recolectar las células bacterianas por centrifugación (20 min a 3400 rpm). Antes de su uso, los pélets de células se almacenaron a -20 °C. Para iniciar la purificación de proteínas, los pélets congelados se descongelaron durante aproximadamente 15 minutos en hielo y se resuspendieron en un tampón que contenía Tris/HCl 20 mM (pH 8), NaCl 0,5 M, imidazol 5 mM y 2 U/mL de ADNasa I (3 mL de tampón por g de peso húmedo de células). Se indujo la lisis celular por sonicación durante un tiempo total de 2 min utilizando pulsos de sonicación de 1 s con lapsos de 1 s intermitentes. Con el fin de eliminar restos celulares insolubles, el lisado resultante se centrifugó a 40000 x g durante 25 min a 4 °C. La enzima Sfp etiquetada con His₆ se capturó entonces añadiendo 4 mL de suspensión densa de agarosa Ni-NTA al 50% (Qiagen) al lisado limpiado. Después de agitar durante 1 hora a 4 °C, la mezcla de resina-lisado se vertió en una columna desechable. La resina sedimentada se lavó con 50 volúmenes de columna de Tris/HCl 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM e imidazol 20 mM. La elución se llevó a cabo con 6 volúmenes de columna de Tris/HCl 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM e imidazol 250 mM. La enzima Sfp se intercambió en tampón de escisión de TEV que contenía Tris/HCl 50 mM (pH 8) y NaCl 50 mM. La eliminación de la etiqueta His₆ se llevó a cabo mediante digestión con proteasa de TEV al 7% (p/p) a 23 °C durante 1 hora y después a 4 °C durante aproximadamente 16 horas. La enzima Sfp digerida con TEV se volvió a cargar entonces en columnas de Ni-NTA nuevas preequilibradas con PBS. La enzima escindida se recogió a partir de la fracción que atravesaba la columna y a partir de un paso de lavado que conllevaba 5 volúmenes de columna de Tris/HCl 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM e imidazol 20 mM. A continuación, la enzima Sfp purificada se dializó frente a Tris/HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM y glicerol al 10% utilizando cintas de diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce) con un límite de 3,5 kDa. Después de pasar el producto dializado a través de un filtro de 0,22 µm, el rendimiento de la enzima Sfp se cuantificó mediante espectroscopía ultravioleta a 280 nm (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) utilizando un coeficiente de extinción molar de 28620 M⁻¹cm⁻¹. Se obtuvieron 19 mg de enzima Sfp escindida con TEV por cultivo de un litro.

Después, se concentró la Sfp PPTasa hasta 151 μ M utilizando unidades de filtración centrífuga Amicon Ultra (Millipore) con un límite de 10 kDa. Se evaluó la pureza de la enzima mediante SDS-PAGE, y la eliminación de la etiqueta His₆ se verificó mediante LC-MS. De acuerdo con la cromatografía de exclusión de tamaños analítica, la Sfp PPTasa escindida con TEV es monomérica en un 90%. Se tomaron alícuotas de la enzima concentrada, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> IRM LLC

Uno, Tetsuo

<120> PÉPTIDOS CITOTÓXICOS Y CONJUGADOS DE ESTOS

<130> PAT056407-WO-PCT

<160> 31

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> cadena pesada anti-Her2 de origen natural

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

ES 2 758 506 T3

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

ES 2 758 506 T3

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> cadena ligera anti-Her2 de origen natural

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

ES 2 758 506 T3

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> región constante de la cadena ligera mutante de anti-Her2 LS-S159C y anticuerpo 20507 LC-S159C
 <400> 3

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 35 40 45

Gln Ser Gly Asn Cys Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 50 55 60

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 65 70 75 80

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 85 90 95

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 4
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> región constante de la cadena pesada mutante de anticuerpo 20507 HC-E155C
 <400> 4

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 20 25 30

Tyr Phe Pro Cys Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 35 40 45

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 50 55 60

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 85 90 95

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 115 120 125

ES 2 758 506 T3

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 260 265 270

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 290 295 300

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 5

<211> 331

<212> PRT

<213> región constante de la cadena pesada mutante de anticuerpo 20507 HC-S376C

<400> 5

ES 2 758 506 T3

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
20 25 30

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
35 40 45

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
50 55 60

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
85 90 95

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
245 250 255

Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
260 265 270

ES 2 758 506 T3

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
290 295 300

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 6

<211> 331

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región constante de la cadena ligera mutante de anti-Her2-HC-E152C-S375C y anticuerpo 20507-HC-E152C-S375C

<400> 6

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
20 25 30

Tyr Phe Pro Cys Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
35 40 45

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
50 55 60

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
85 90 95

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
165 170 175

ES 2 758 506 T3

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 245 250 255

Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 260 265 270

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 290 295 300

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> región constante de la cadena ligera mutante del anticuerpo 20507 LC-K107C
 <400> 7

Cys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 35 40 45

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 50 55 60

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 65 70 75 80

ES 2 758 506 T3

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 85 90 95

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 8

<211> 342

<212> PRT

<213> región constante de la cadena pesada de anti-Her2 HC-ins388-ybbR

<400> 8

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 20 25 30

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 35 40 45

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 50 55 60

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 85 90 95

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 210 215 220

ES 2 758 506 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
260 265 270

Asp Ser Leu Glu Phe Ile Ala Ser Lys Leu Ala Asn Asn Tyr Lys Thr
275 280 285

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
290 295 300

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
305 310 315 320

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
325 330 335

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 9

<211> 343

<212> PRT

<213> región constante de la cadena pesada mutante HC-ins388-A1 en anti-Her2 y anticuerpo 20507

<400> 9

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
20 25 30

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
35 40 45

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
50 55 60

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
85 90 95

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
115 120 125

ES 2 758 506 T3

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 260 265 270

Gly Asp Ser Leu Asp Met Leu Glu Trp Ser Leu Met Asn Asn Tyr Lys
 275 280 285

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 290 295 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 305 310 315 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 10

<211> 331

<212> PRT

<213> región constante de la cadena pesada de origen natural de anticuerpo 20507

<400> 10

ES 2 758 506 T3

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 20 25 30

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 35 40 45

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 50 55 60

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 85 90 95

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 100 105 110

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 260 265 270

ES 2 758 506 T3

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 290 295 300

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> región constante de la cadena ligera de origen natural de anticuerpo 20507

<400> 11

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 35 40 45

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 50 55 60

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 65 70 75 80

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 85 90 95

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector de expresión

<400> 12

Met Lys Thr Phe Ile Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Ile
 1 5 10 15

Phe Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala
 20

<210> 13

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia del cebador
 <400> 13
 agcggcaact gtcaggagag cgtcaccgag caggacagca a 41
 <210> 14
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 14
 ctctcctgac agttgccgct ctgcaggcg ttgtccacct 40
 <210> 15
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 15
 tacttccct gtcccgtgac cgtgtcctgg aacagcgga 39
 <210> 16
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 16
 ggtcacggga caggggaagt agtcctcac caggcagc 38
 <210> 17
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 17
 ttctaccct gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaacg 40
 <210> 18
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 18
 ggcgatgtcg caggggtaga agccctcac cagacagtc a 41
 <210> 19
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 19
 gtggagatct gtcgaacggt ggcccctccc agcgtgtca 40
 <210> 20
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 20
 accgttcgac agatctccac cttgtgacct tgtccgaac 39
 <210> 21
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador

ES 2 758 506 T3

<400> 21
 ctggagtcca tcgccagcaa gctggccaac aactacaaga ccacacctcc ag 52
 <210> 22
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 22
 cttgctggcg atgaactcca ggctgcctc gggctggccg ttgctc 46
 <210> 23
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 23
 ctggacatgc tggagtggag cctgatgaac aactacaaga ccacacctcc ag 52
 <210> 24
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 24
 ccactccagc atgtccaggc tgctgccctc gggctggccg ttgctc 46
 <210> 25
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de Sfp pET22b de B. subtilis
 <400> 25
 gaaggagata tacatatgaa aatttatggg atttacctgg atcgc 45
 <210> 26
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de Sfp pET22b de B. subtilis
 <400> 26
 gtggtggtgg tgggtgca gcaattctc ataggagacc atcg 44
 <210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de pET22b
 <400> 27
 caccaccacc accaccactg ag 22
 <210> 28
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de pET22b
 <400> 28
 catatgtata tctcctctt aaagttaaac aaaattatt c 41
 <210> 29
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador de TEV en Sfp pET22b de B.subtilis
 <400> 29

ES 2 758 506 T3

gagaacctgt acttccaagg ccaccaccac caccaccact gag 43

<210> 30

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de TEV en Sfp pET22b de B.subtilis

<400> 30

gccttgggaag tacaggttct ccagcaattc tcataggag accatcg 47

<210> 31

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sfp PPTasa de Bacillus subtilis con sitio de escisión de TEV C terminal y etiqueta His6

<400> 31

Met Lys Ile Tyr Gly Ile Tyr Met Asp Arg Pro Leu Ser Gln Glu Glu
1 5 10 15

Asn Glu Arg Phe Met Ser Phe Ile Ser Pro Glu Lys Arg Glu Lys Cys
20 25 30

Arg Arg Phe Tyr His Lys Glu Asp Ala His Arg Thr Leu Leu Gly Asp
35 40 45

Val Leu Val Arg Ser Val Ile Ser Arg Gln Tyr Gln Leu Asp Lys Ser
50 55 60

Asp Ile Arg Phe Ser Thr Gln Glu Tyr Gly Lys Pro Cys Ile Pro Asp
65 70 75 80

Leu Pro Asp Ala His Phe Asn Ile Ser His Ser Gly Arg Trp Val Ile
85 90 95

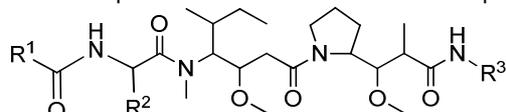
Cys Ala Phe Asp Ser Gln Pro Ile Gly Ile Asp Ile Glu Lys Thr Lys

ES 2 758 506 T3

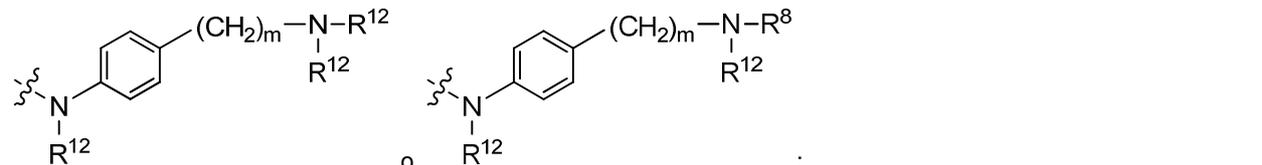
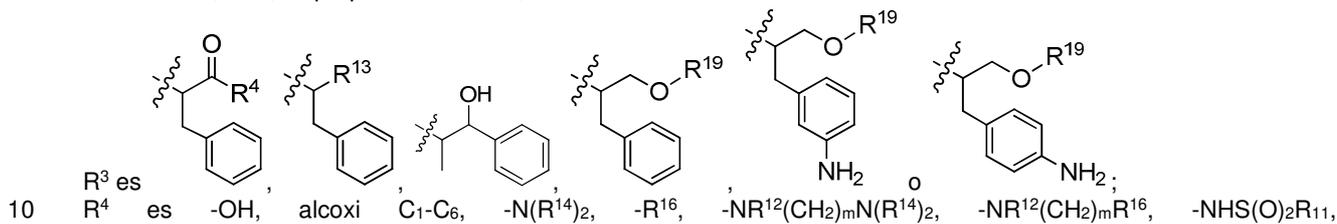
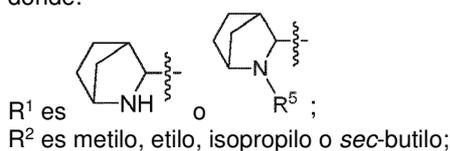
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| | 100 | | 105 | | 110 | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Ile | Ser | Leu | Glu | Ile | Ala | Lys | Arg | Phe | Phe | Ser | Lys | Thr | Glu | Tyr | | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | | | |
| Ser | Asp | Leu | Leu | Ala | Lys | Asp | Lys | Asp | Glu | Gln | Thr | Asp | Tyr | Phe | Tyr | | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | |
| His | Leu | Trp | Ser | Met | Lys | Glu | Ser | Phe | Ile | Lys | Gln | Glu | Gly | Lys | Gly | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | |
| Leu | Ser | Leu | Pro | Leu | Asp | Ser | Phe | Ser | Val | Arg | Leu | His | Gln | Asp | Gly | | | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | |
| Gln | Val | Ser | Ile | Glu | Leu | Pro | Asp | Ser | His | Ser | Pro | Cys | Tyr | Ile | Lys | | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | | |
| Thr | Tyr | Glu | Val | Asp | Pro | Gly | Tyr | Lys | Met | Ala | Val | Cys | Ala | Ala | His | | | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | | |
| Pro | Asp | Phe | Pro | Glu | Asp | Ile | Thr | Met | Val | Ser | Tyr | Glu | Glu | Leu | Leu | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | | |
| Glu | Asn | Leu | Tyr | Phe | Gln | Gly | His | | | | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | | | | | |

REIVINDICACIONES

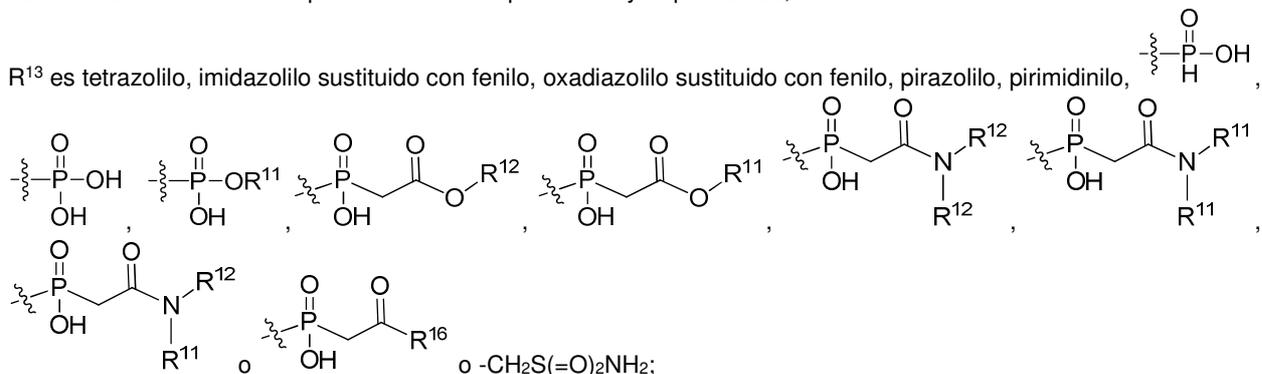
1. Un compuesto o estereoisómero de este que tiene la estructura de Fórmula (I)



5 Fórmula (I)
donde:

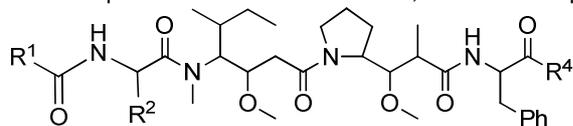


15 cada R¹¹ se selecciona independientemente entre alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ que se sustituye opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos;
cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;



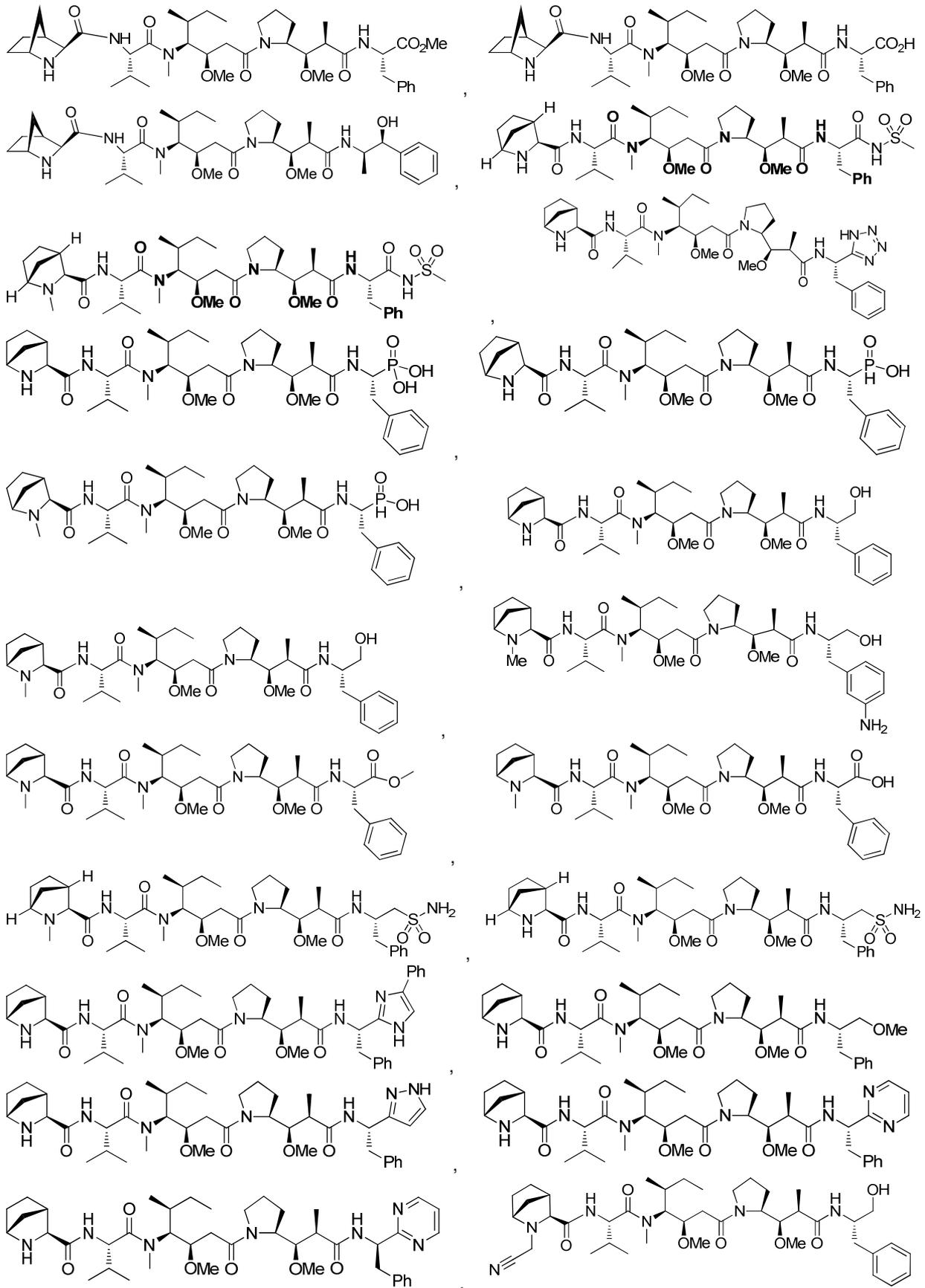
25 cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;
R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros sin sustituir conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;
R¹⁹ es H o alquilo C₁-C₆;
cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y
cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

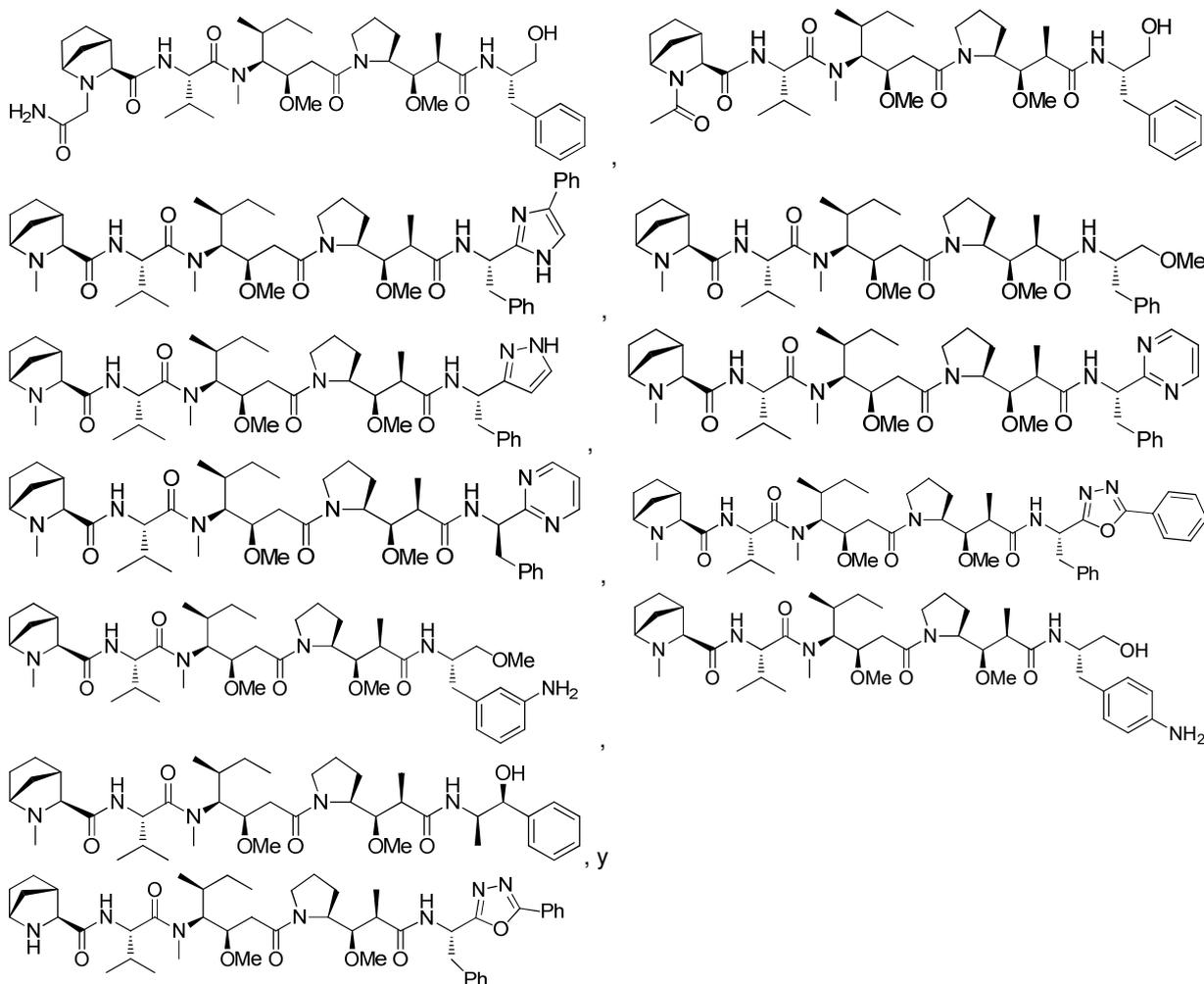
2. El compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto es un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (Ia):



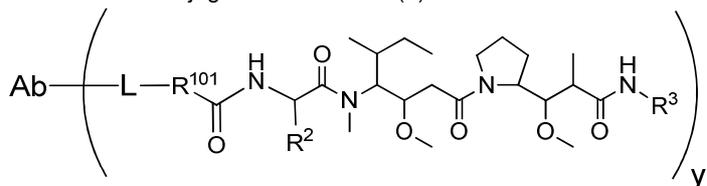
30 Fórmula (Ia).

3. El compuesto de la reivindicación 1 seleccionado entre,





4. Un inmunoconjugado de Fórmula (II):



Fórmula (II)

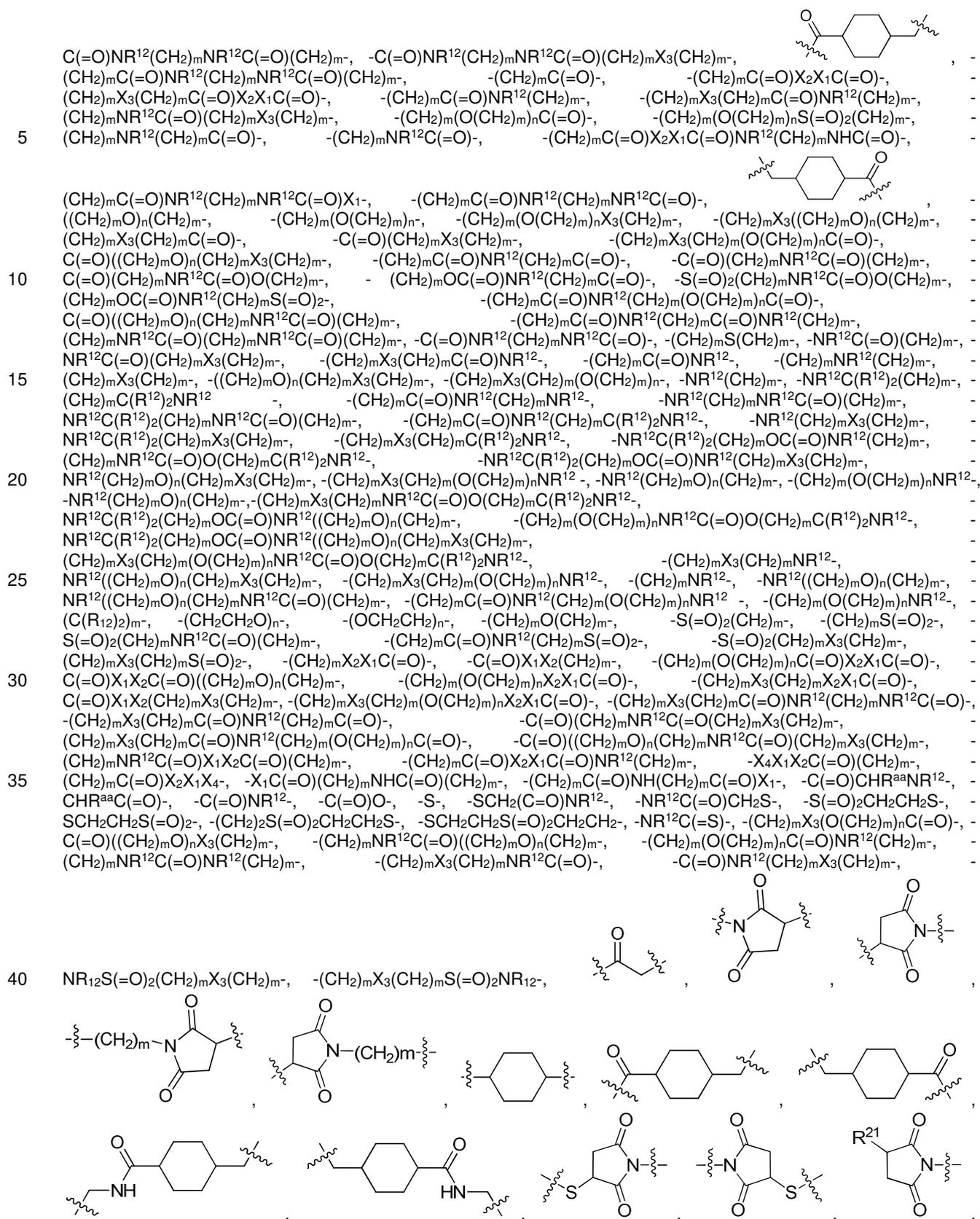
donde:

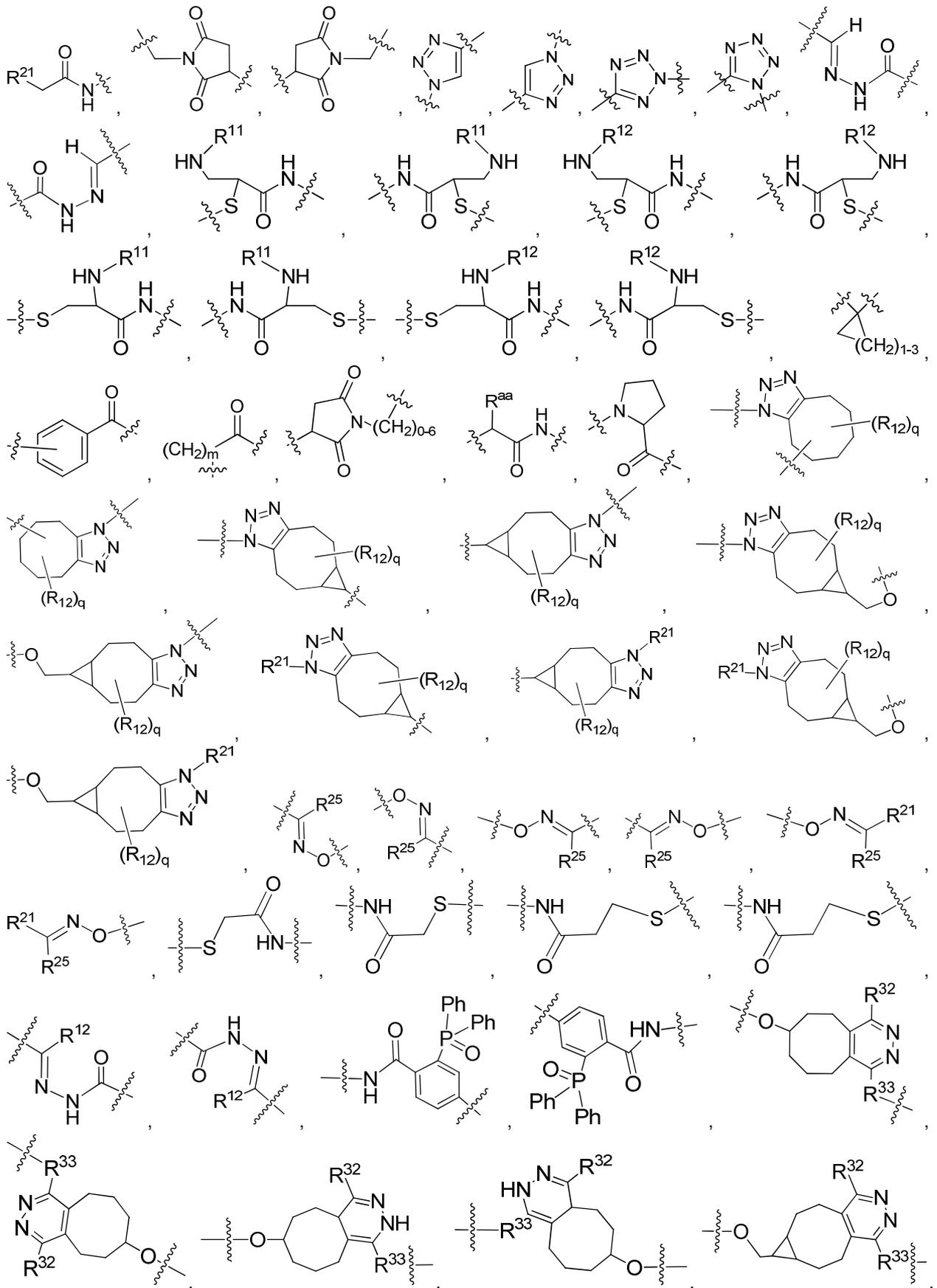
Ab representa un resto de unión a antígeno;

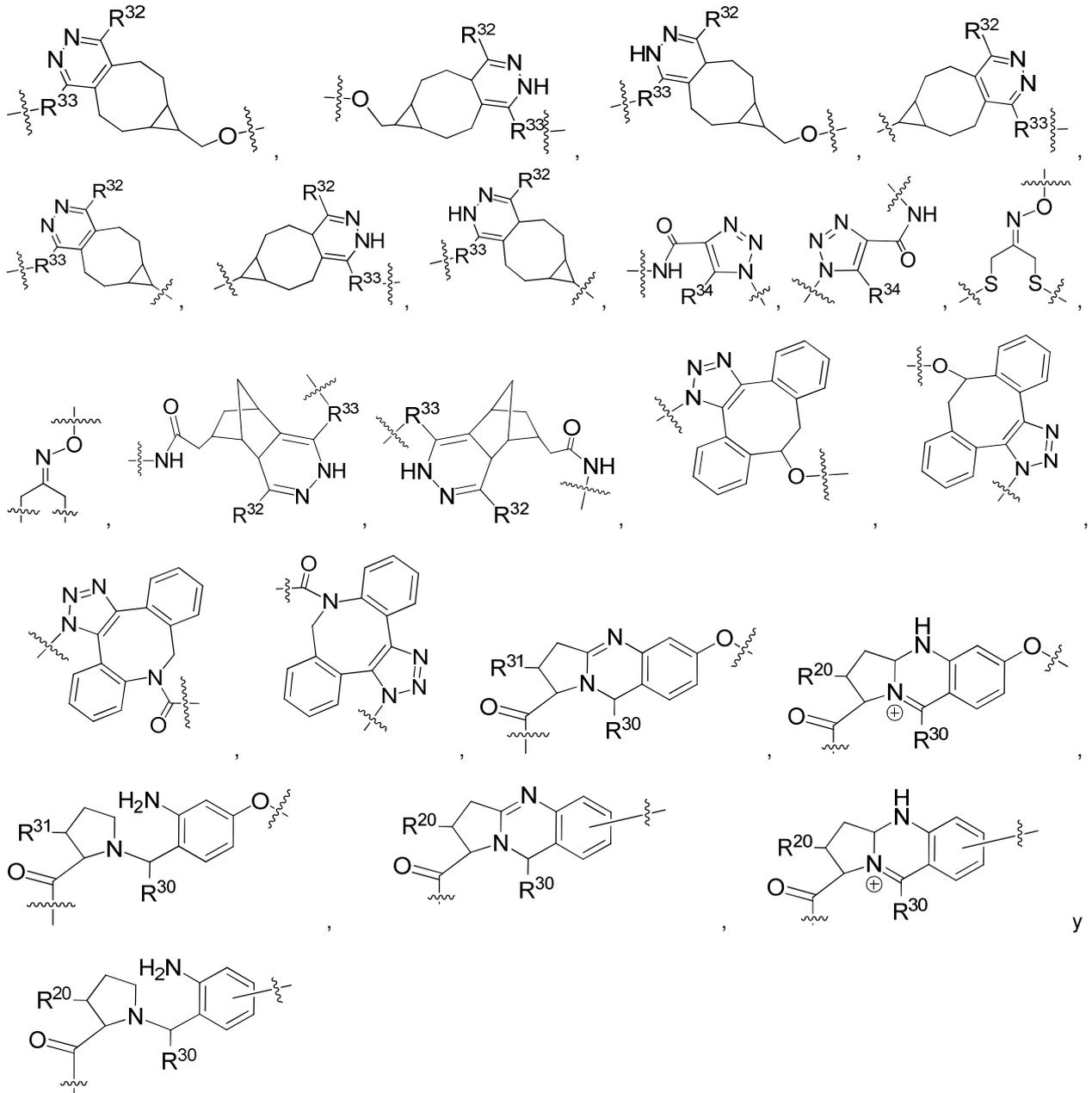
L se selecciona entre -L₁L₂L₃L₄L₅L₆-, -L₆L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄L₅-, -L₅L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃L₄-, -L₄L₃L₂L₁-, -L₁L₂L₃-, -L₃L₂L₁-, -L₁L₂-, -L₂L₁- y -L₁,

donde

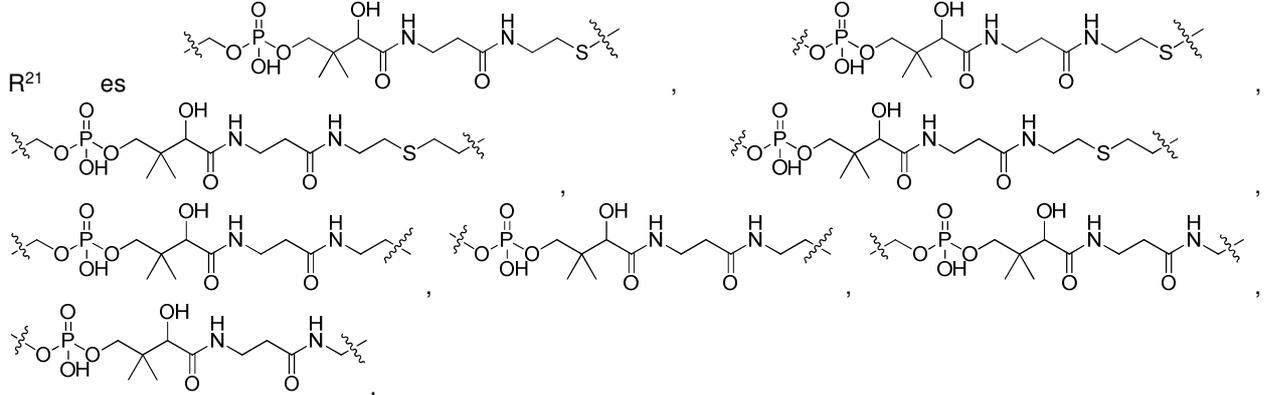
L₁ se selecciona entre -(CH₂)_m-, -C(=O)(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_mNR¹²C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_mNR¹²C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂(CH₂)_mNR¹²((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m-, -C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_mNR¹²((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-, (CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m-, -C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m-, -(CH₂)_mS((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m-, -C(=O)(CH₂)_mNR¹²(CH₂)_m-, -C(=O)NR¹²(CH₂)_m-, -C(=O)NR¹²(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-, -C(=O)NH(CH₂)_mNR¹²C(=O)X₁X₂C(=O)(CH₂)_m-, -C(=O)X₁C(=O)NR¹²(CH₂)_mNR¹²C(=O)(CH₂)_m-, -C(=O)X₁C(=O)NR¹²(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-,

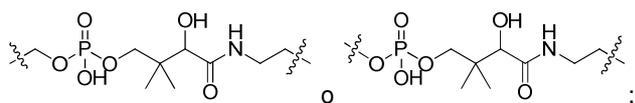






R^{20} es H o Me, y R^{30} es H, $-CH_3$ o fenilo;



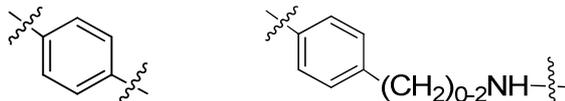


cada R²⁵ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁₋₄;

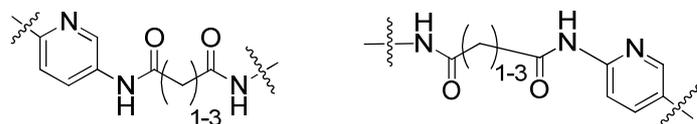
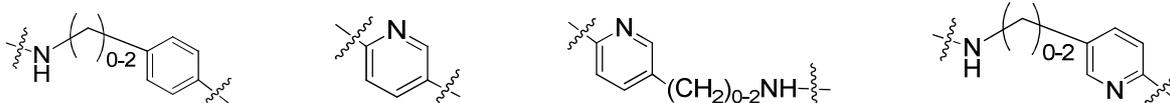
R^{aa} es una cadena lateral de un aminoácido seleccionado entre glicina, alanina, triptófano, tirosina, fenilalanina, leuceína, isoleucina, valina, asparagina, ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico, histidina, arginina, lisina, cisteína, metionina, serina, treonina, fenilglicina y *t*-butilglicina;

5

R³² se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₄, fenilo, pirimidina y piridina;

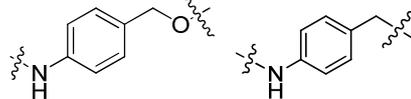


R³³ se selecciona independientemente entre

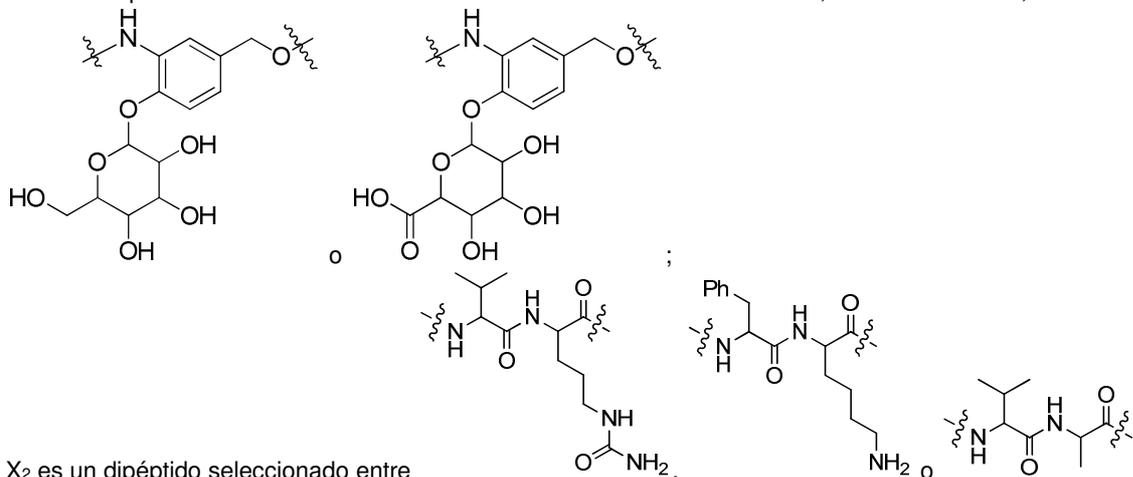


10

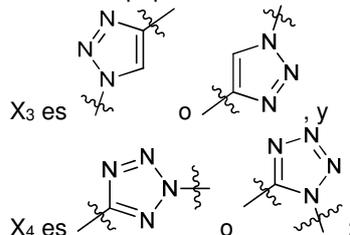
R³⁴ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₄, y haloalquilo C₁₋₆;



X₁ es un espaciador autodestructivo seleccionado entre



X₂ es un dipéptido seleccionado entre



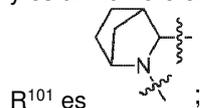
X₃ es

X₄ es

15

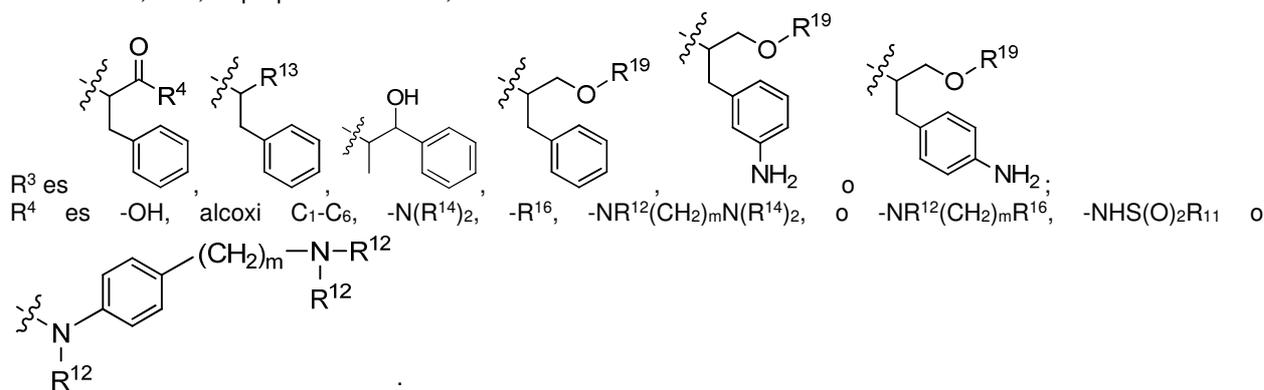
y L₂, L₃, L₄, L₅, y L₆ se seleccionan cada uno independientemente entre un enlace y L₁;

y es un número entero de 1 a 16;

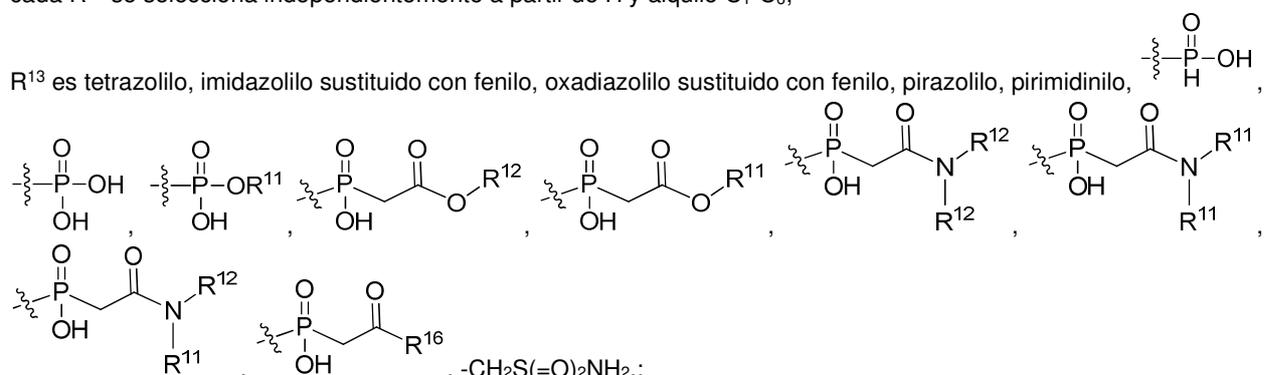


R¹⁰¹ es

R² es metilo, etilo, isopropilo o *sec*-butilo;

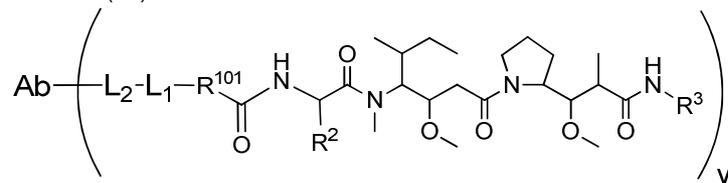


5 R¹¹ es alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆ que está sustituido opcionalmente con de 1 a 5 hidroxilos; cada R¹² se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;



10 cada R¹⁴ se selecciona independientemente a partir de H y alquilo C₁-C₆;
 R¹⁶ es un heterocicloalquilo de 4-8 miembros conectado en N que contiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente entre N y O;
 R¹⁹ es H o alquilo C₁-C₆;
 15 cada m se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10,
 y
 cada n se selecciona independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

5. El inmunoconjugado de la reivindicación 4, donde el inmunoconjugado de Fórmula (II) es un inmunoconjugado de Fórmula (IIb):



20 Fórmula (IIb).

6. El inmunoconjugado de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde:
 L₁ es -(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_mX₃(CH₂)_m*-, -(CH₂)_mC(=O)*-, -(CH₂)_m-, -(CH₂)_mC(=O)X₂X₁C(=O)*-, -(CH₂)_mX₂X₁C(=O)*-,
 25 -(CH₂)_m(O(CH₂)_m)_nC(=O)*-, -(CH₂)_m(O(CH₂)_m)_nC(=O)X₂X₁C(=O)*-, -(CH₂)_m(O(CH₂)_m)_nX₂X₁C(=O)*-,
 (CH₂)_m(O(CH₂)_m)_nS(=O)₂(CH₂)_m*-, -(CH₂)_mNH(CH₂)_mC(=O)*-, -((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m*-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)*-,
 (CH₂)_mX₃(CH₂)_m-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)X₂X₁C(=O)*-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mX₂X₁C(=O)*-,
 (CH₂)_mX₃(CH₂)_m(O(CH₂)_m)_nX₂X₁C(=O)*-, -(CH₂)_mNHC(=O)*-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_m(O(CH₂)_m)_nC(=O)*-,
 (CH₂)_mX₃((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m*-, -(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m*-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m*-,
 (CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_mNHC(=O)*-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mNHC(=O)*-, -(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_mC(=O)*-,
 30 (CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_mNHC(=O)*-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_mC(=O)*-,
 (CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m(O(CH₂)_m)_nC(=O)*-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m(O(CH₂)_m)_nC(=O)*-,
 (CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_m*-, -(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m*-,
 (CH₂)_mX₃(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m*-, -(CH₂)_mS(=O)₂*-, -(CH₂)_mX₃(CH₂)_mS(=O)₂*-, -(CH₂)_mOC(=O)NH(CH₂)_mC(=O)*-, y
 (CH₂)_mOC(=O)NH(CH₂)_mS(=O)₂*-, y donde el * indica el punto de unión a R¹⁰¹;

FIG. 1A

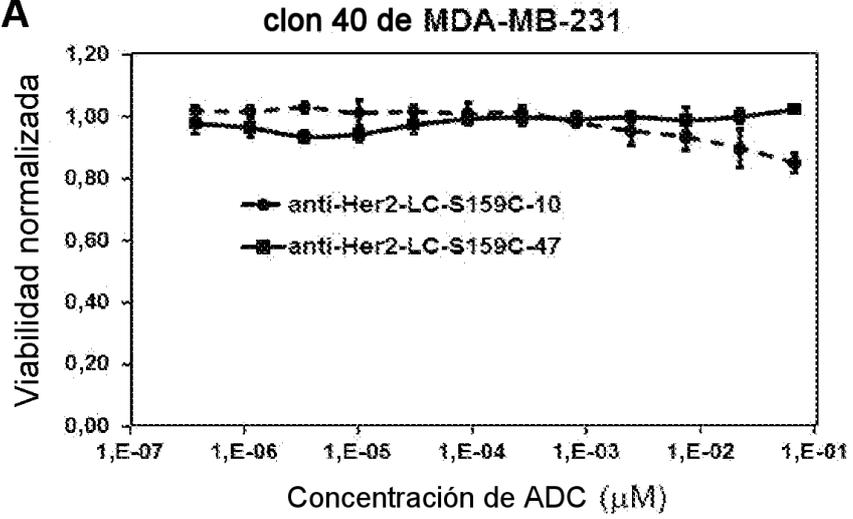


FIG. 1B

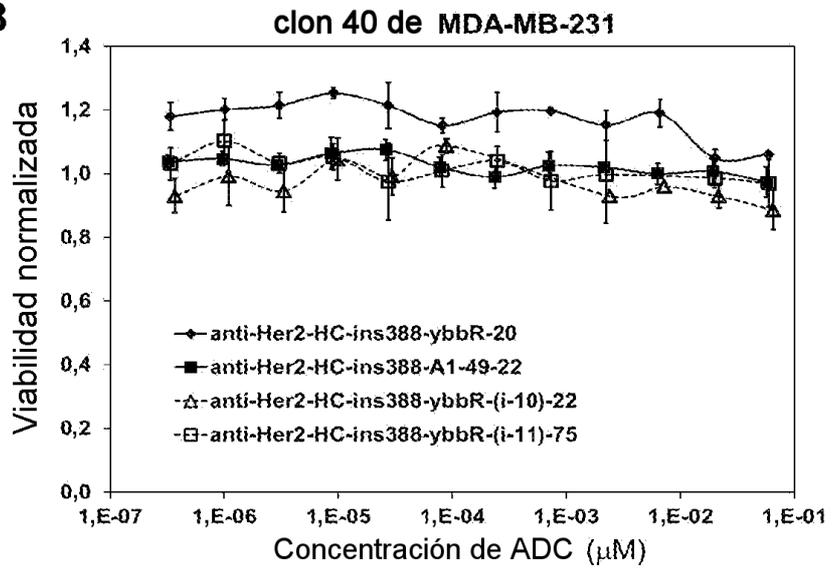


FIG. 1C

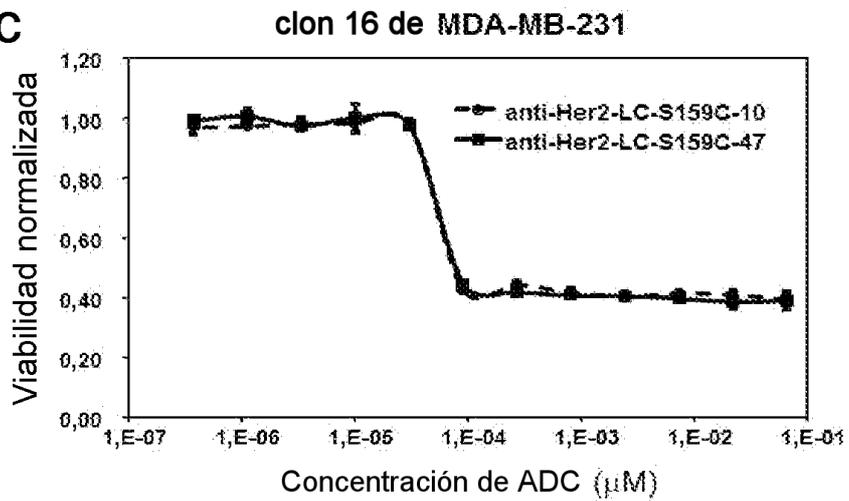


FIG. 1D

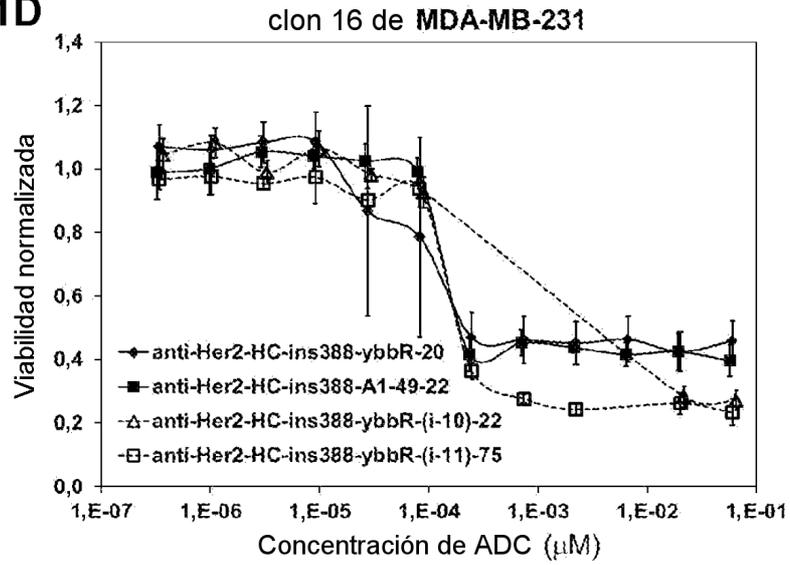


FIG. 1E

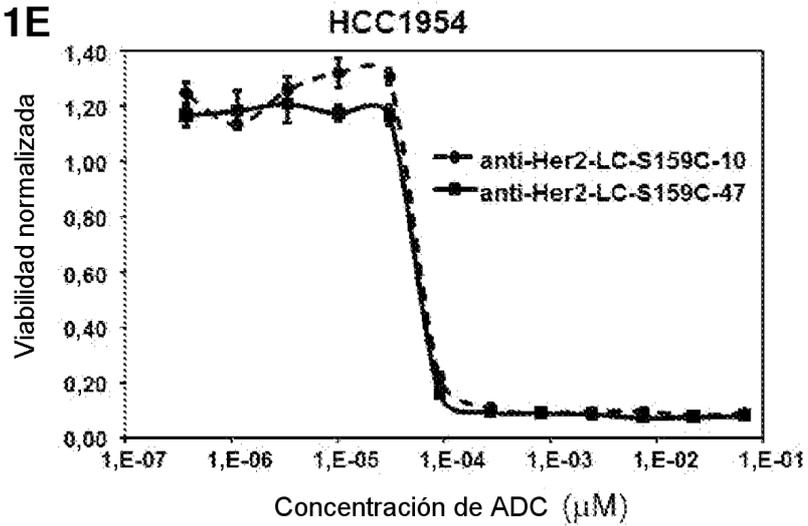


FIG. 1F

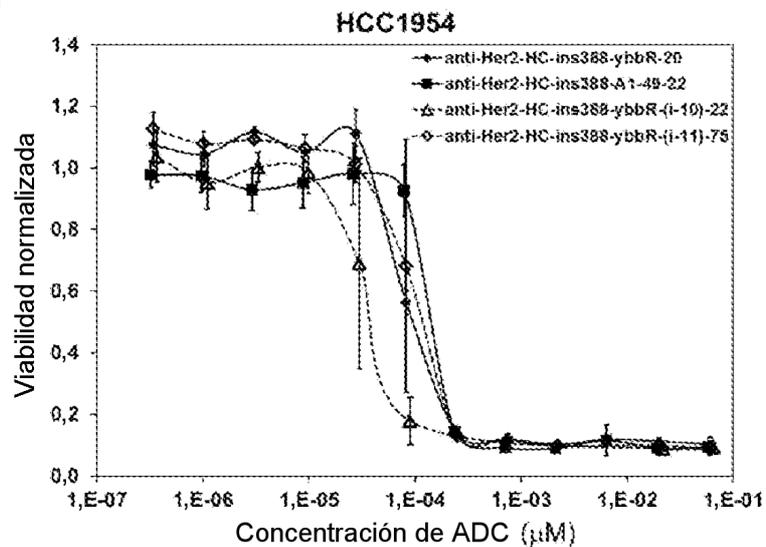


FIG. 1G

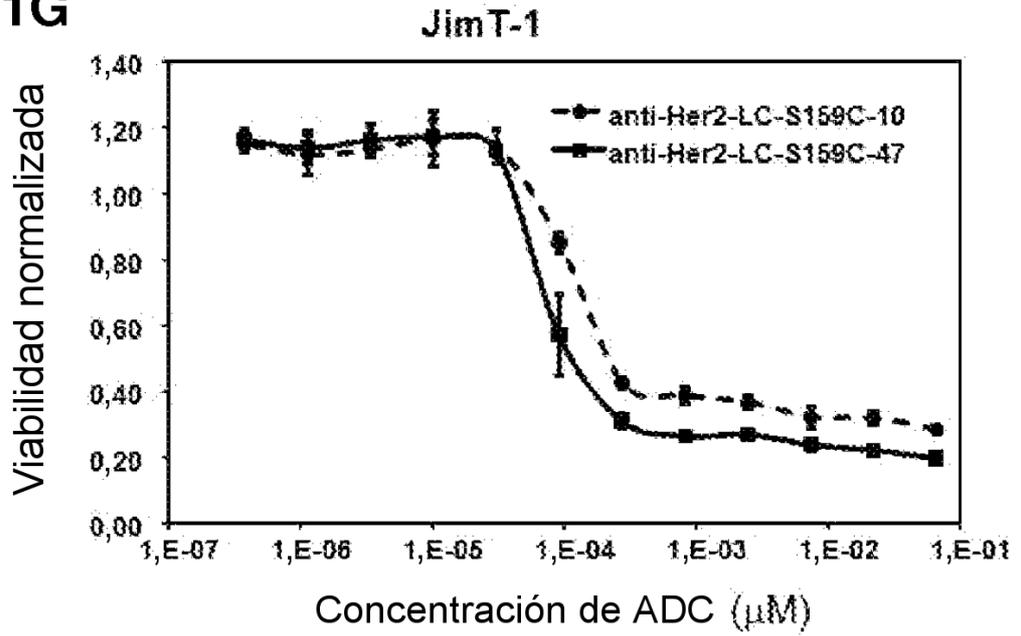


FIG. 1H

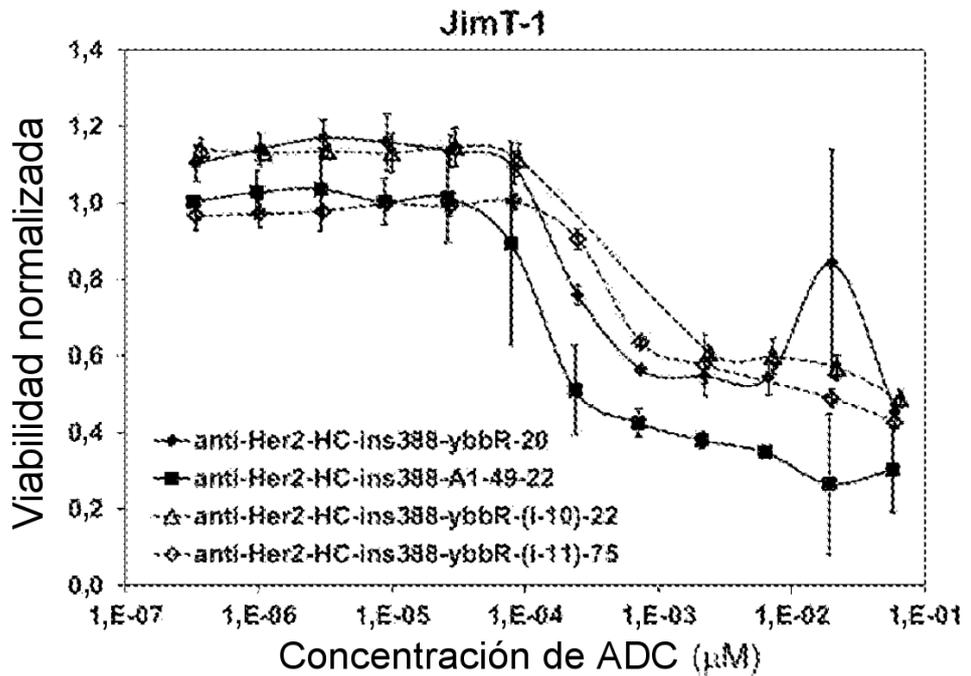


FIG. 2A

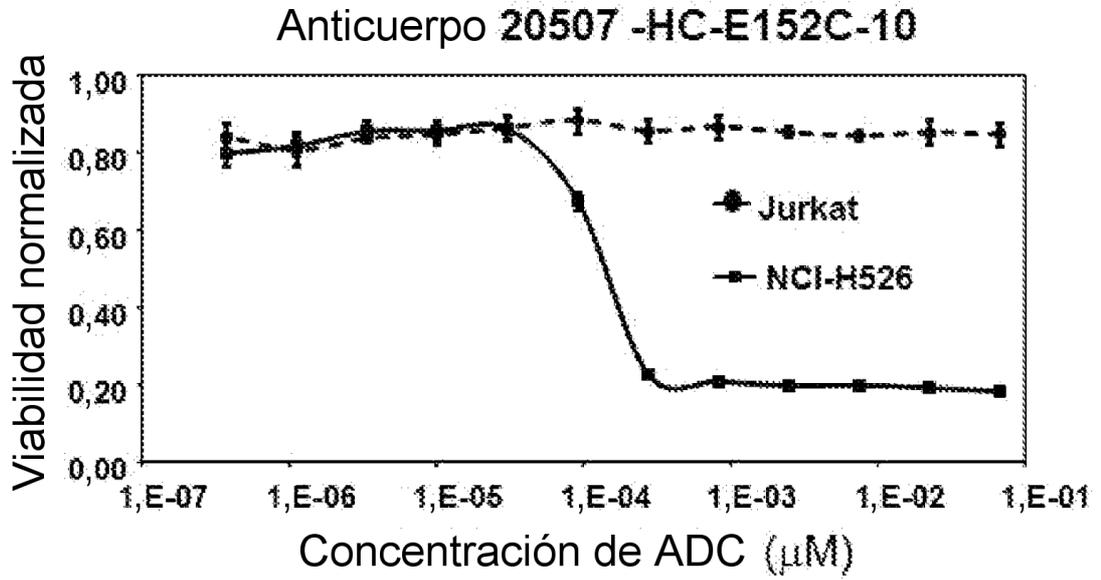


FIG. 2B

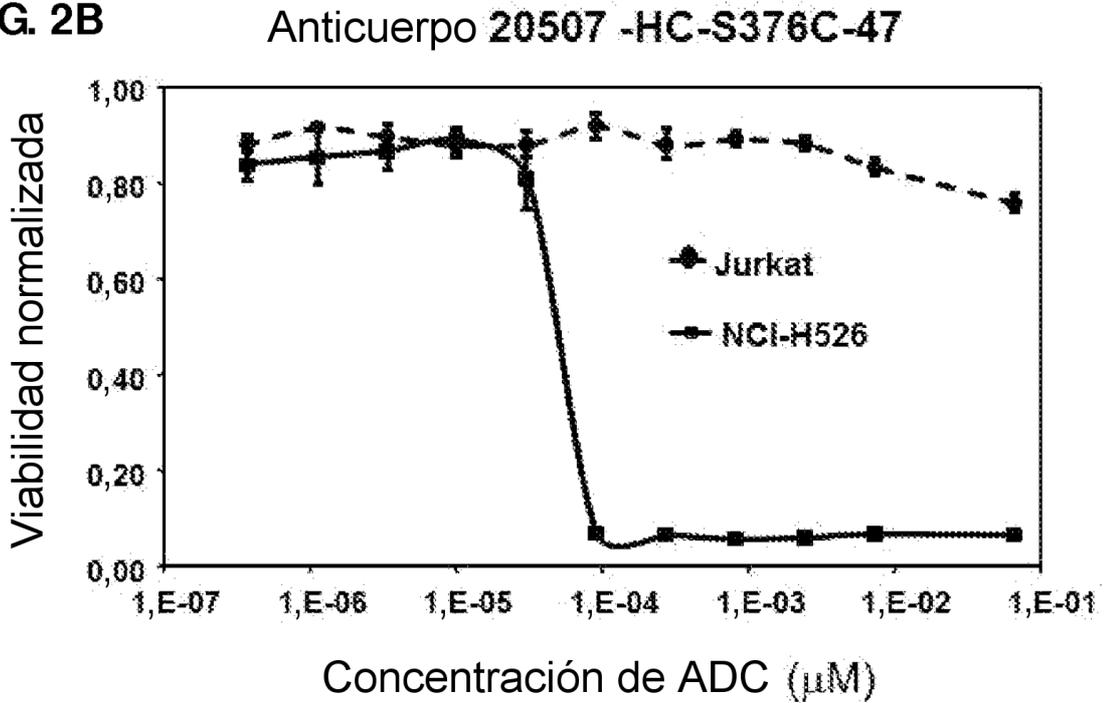


FIG. 2C Anticuerpo 20507 -HC-ins388-A1-20

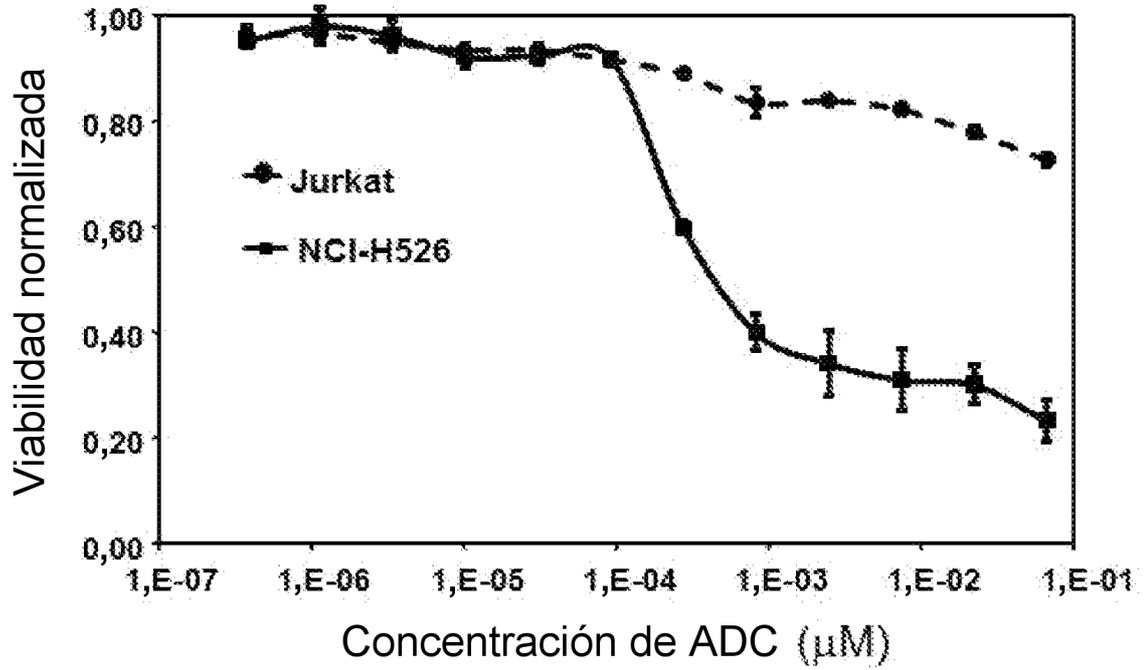


FIG. 2D Anticuerpo 20507-HC-ins388-A1-49-22

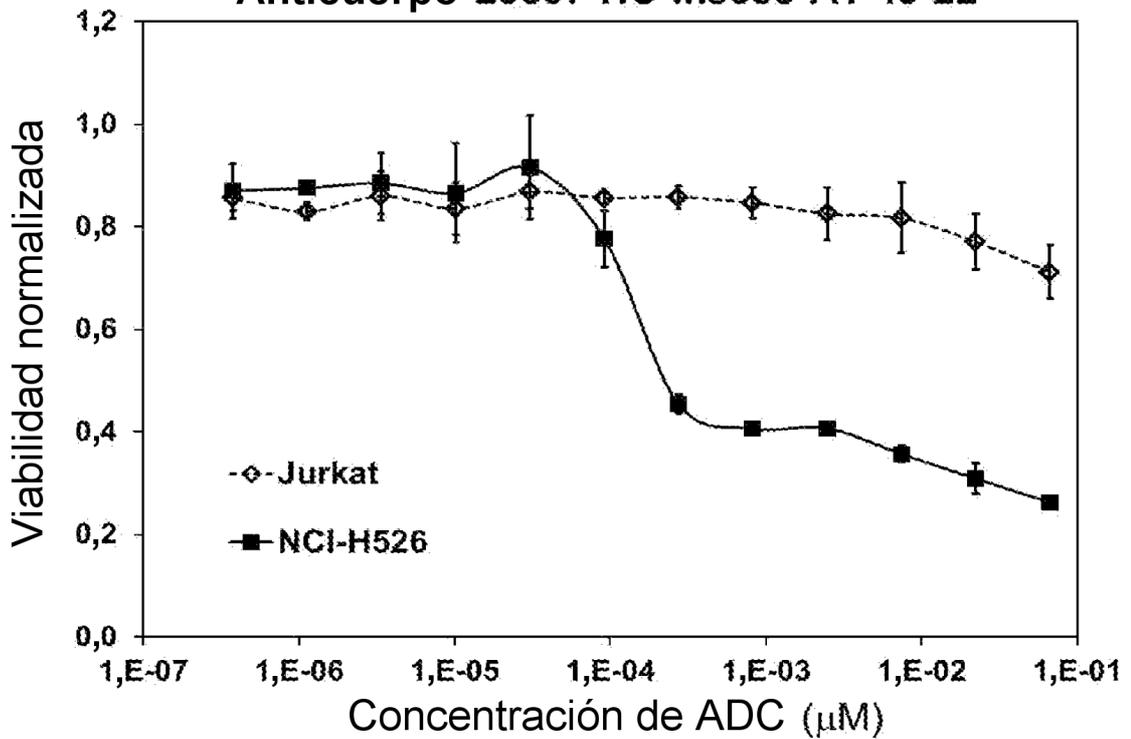


FIG. 3A

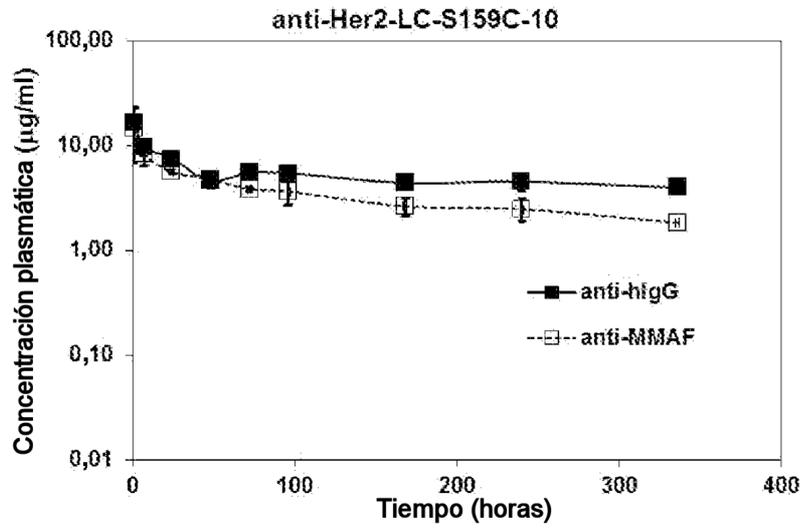


FIG. 3B

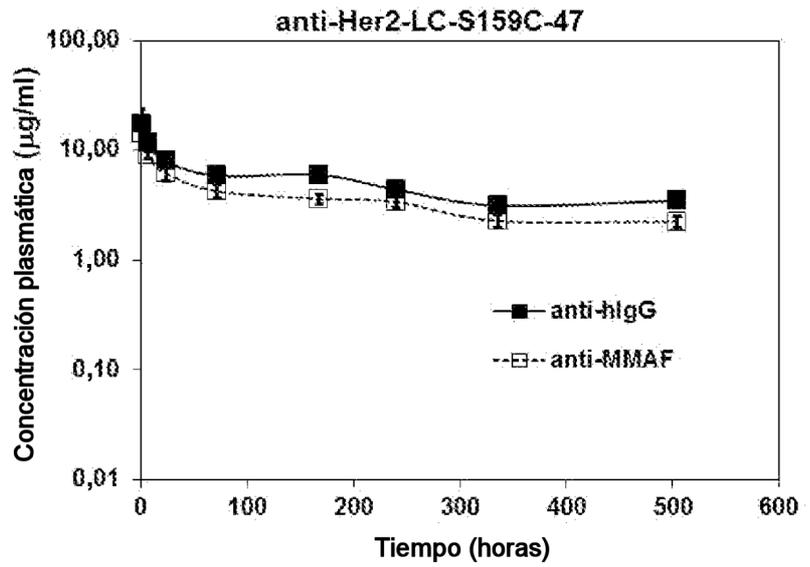


FIG. 3C

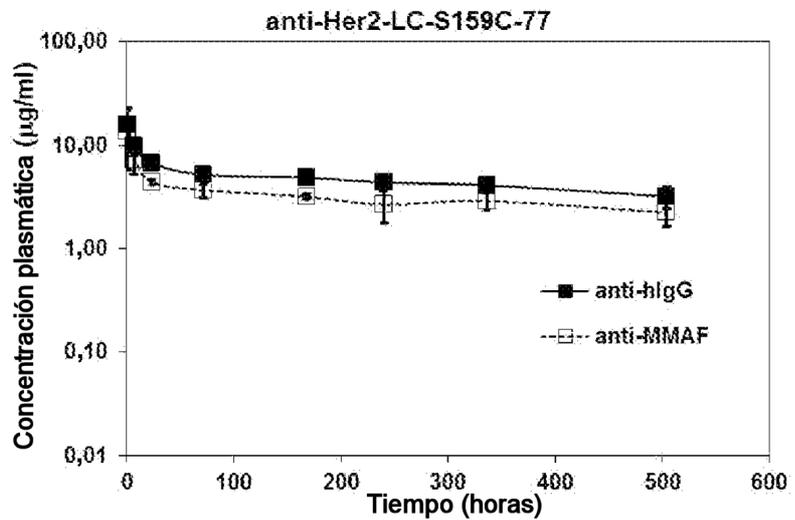


FIG. 3D

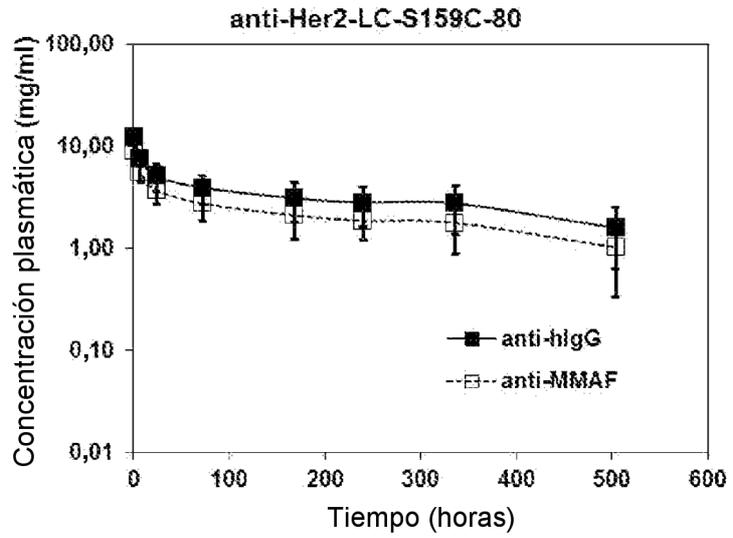


FIG. 3E

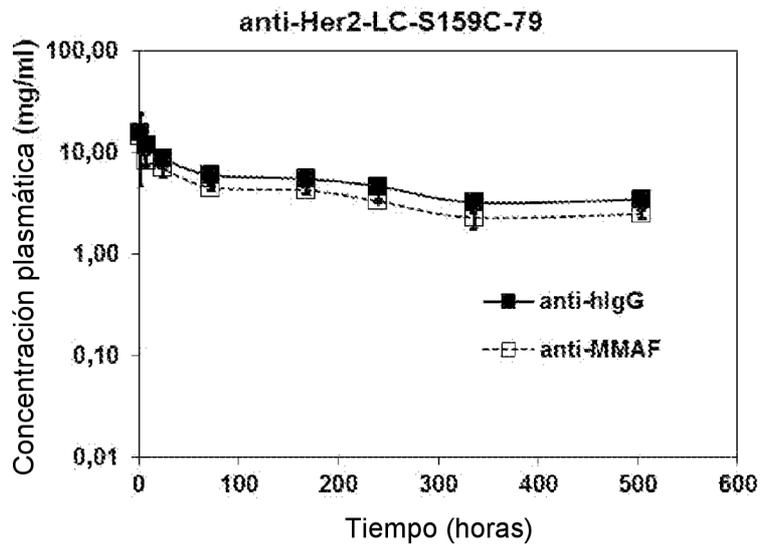


FIG. 3F

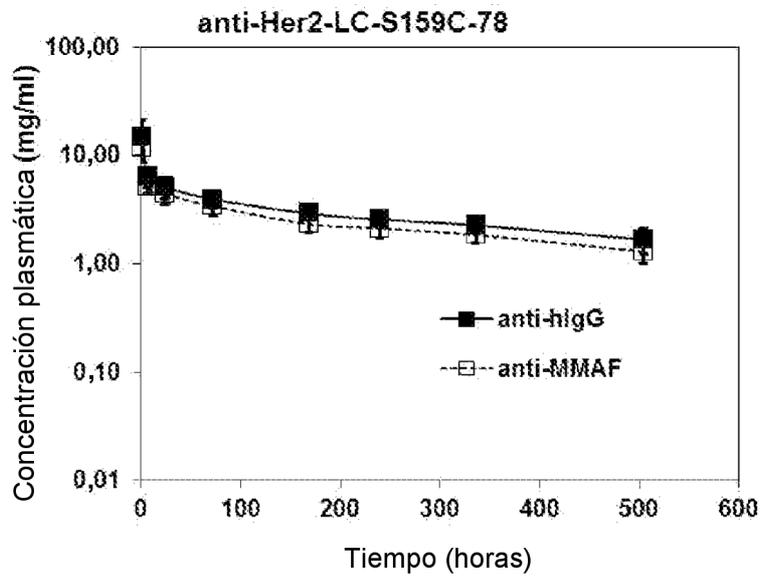


FIG. 3G

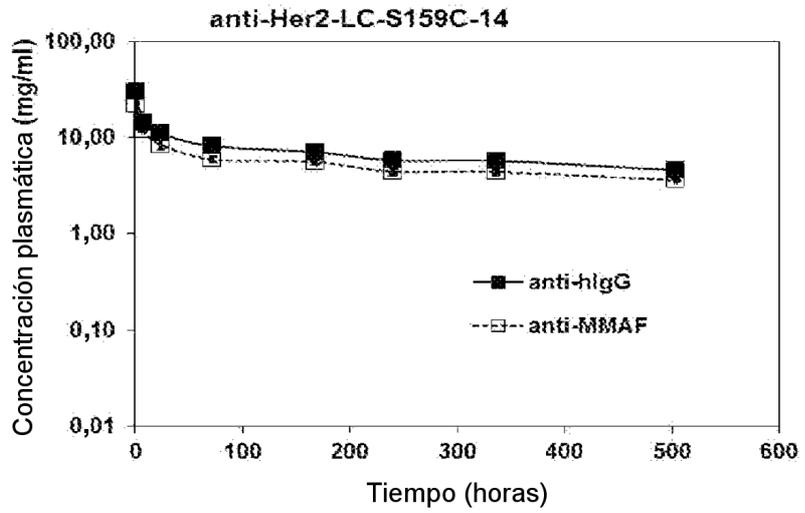


FIG. 3H

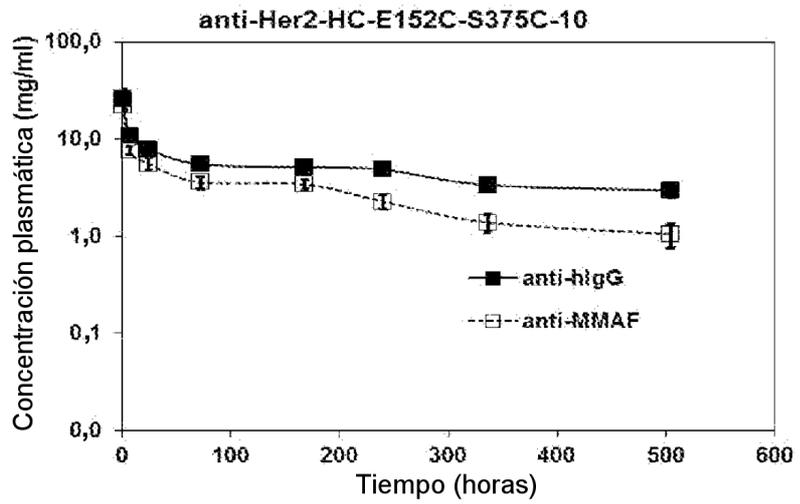


FIG. 3I

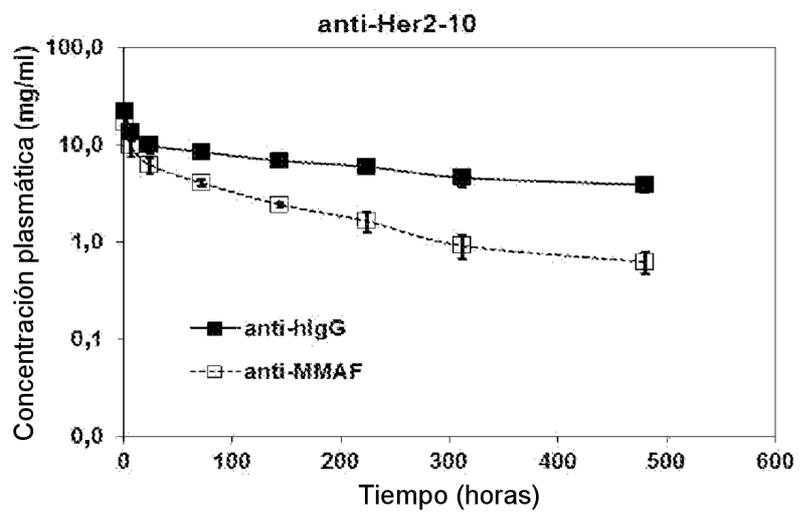


FIG. 4A

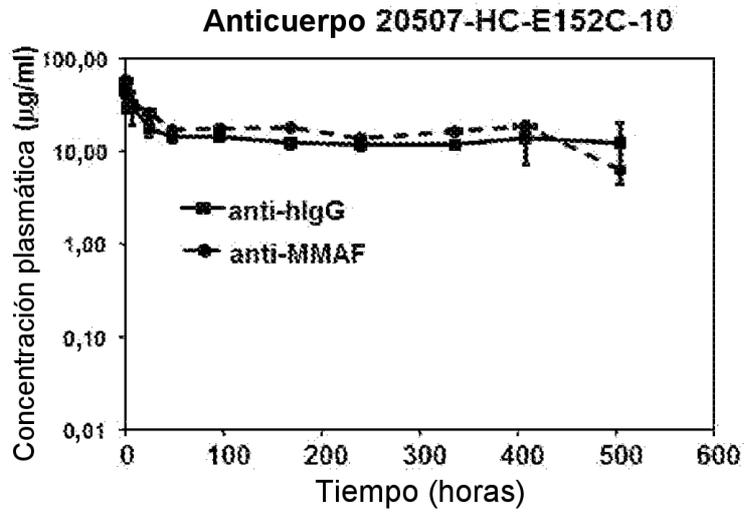


FIG. 4B

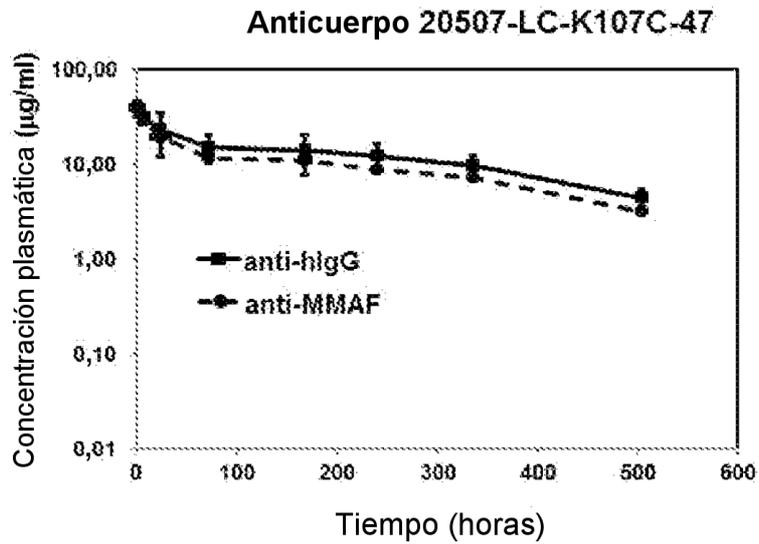


FIG. 4C

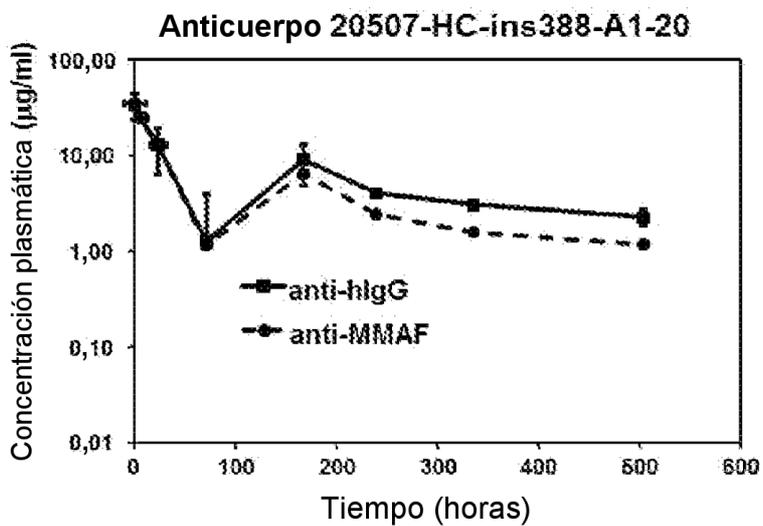


FIG. 4D

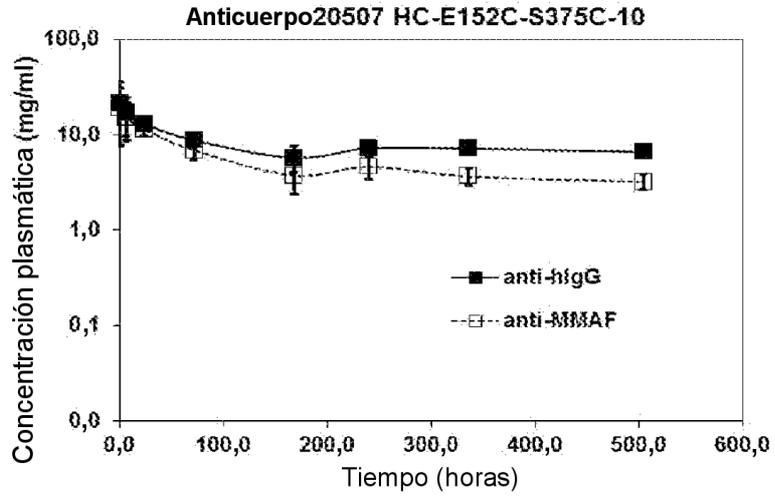


FIG. 4E

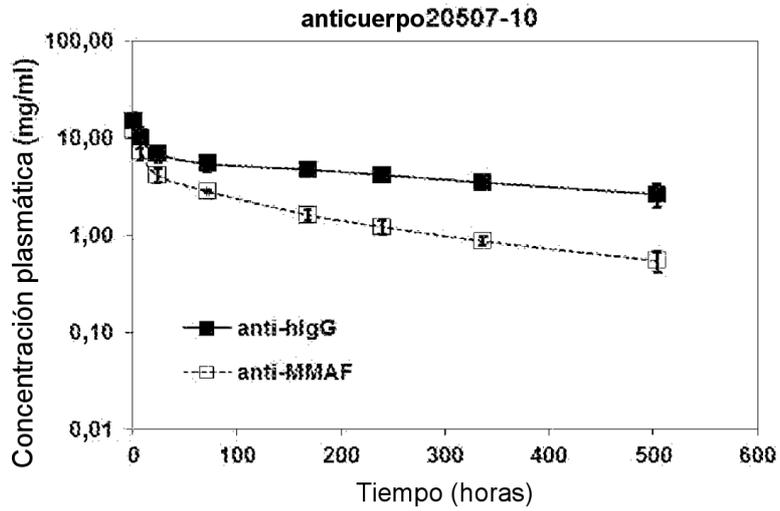


FIG. 4F

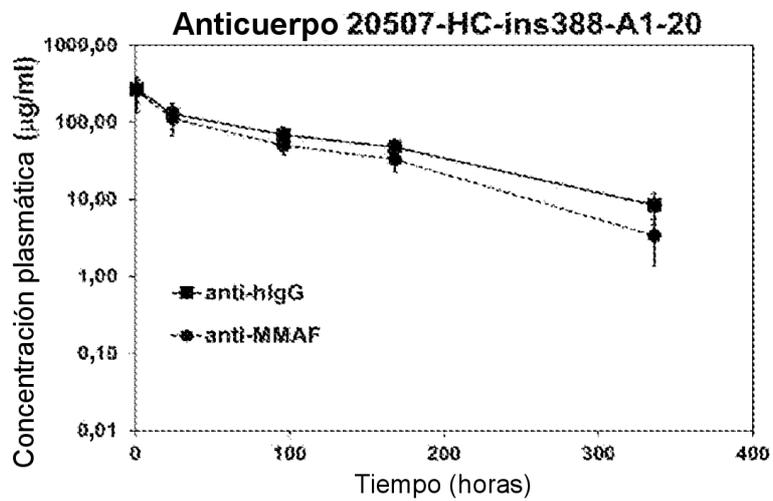


FIG. 4G

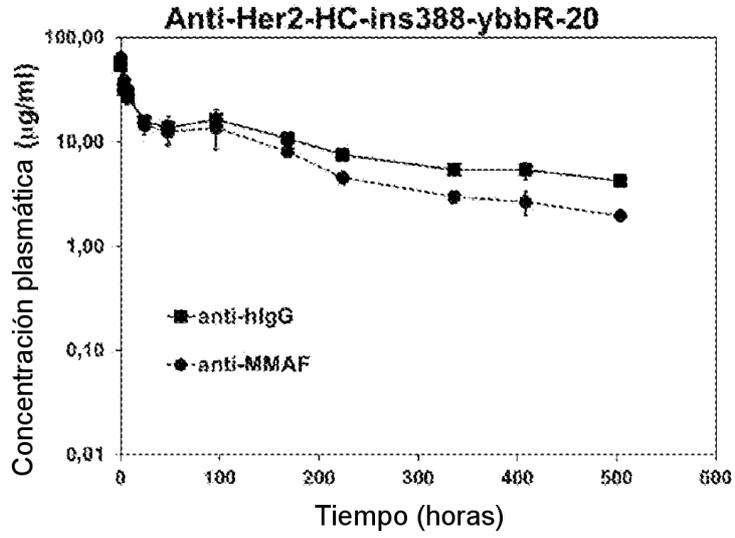


FIG. 4H

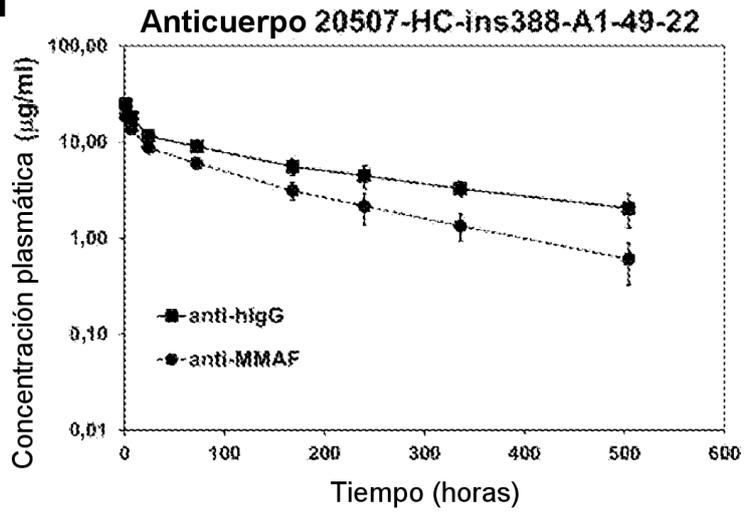


FIG. 4I

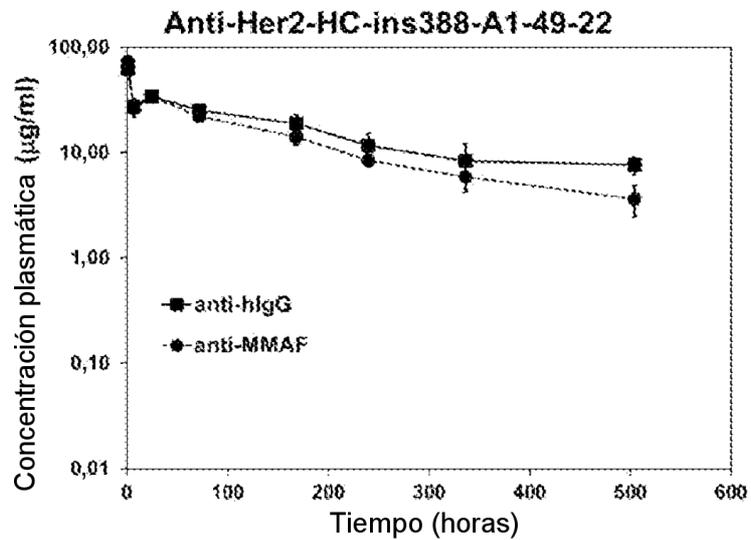


FIG. 4J

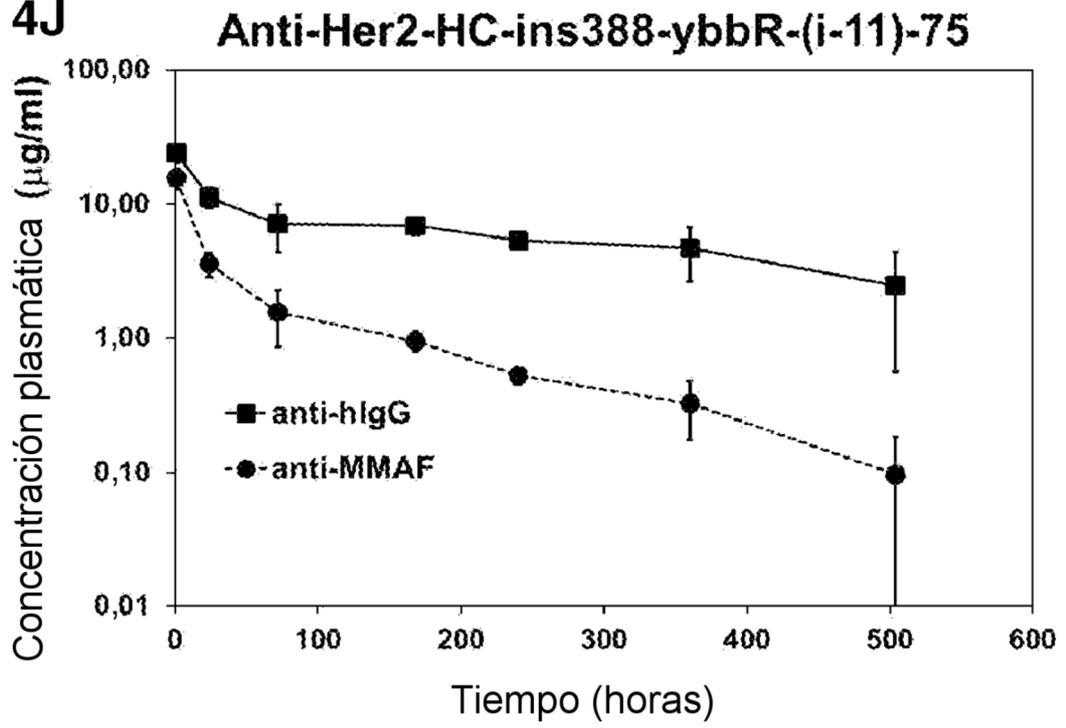


FIG. 5A

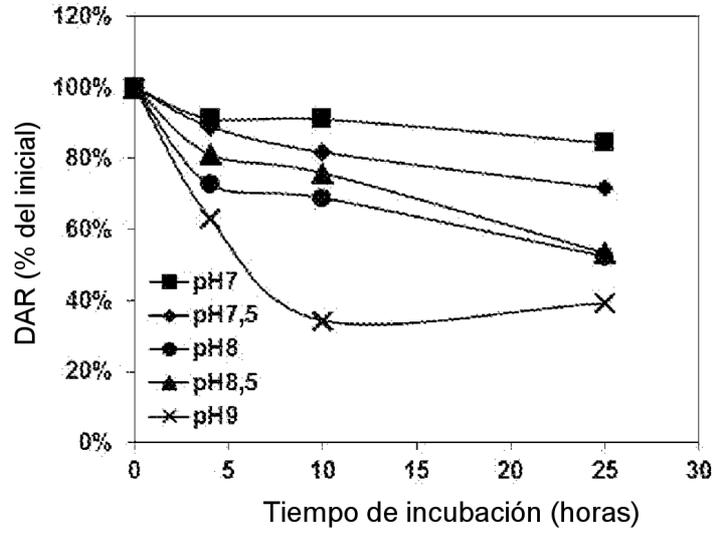


FIG. 5B

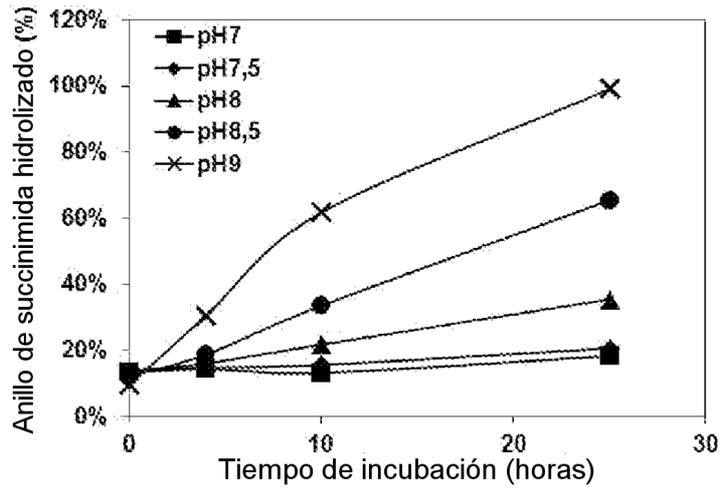


FIG. 5C

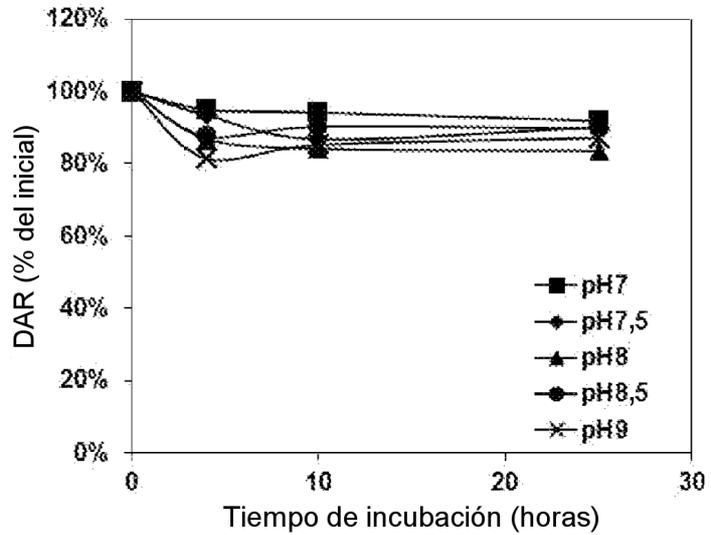


FIG. 5D

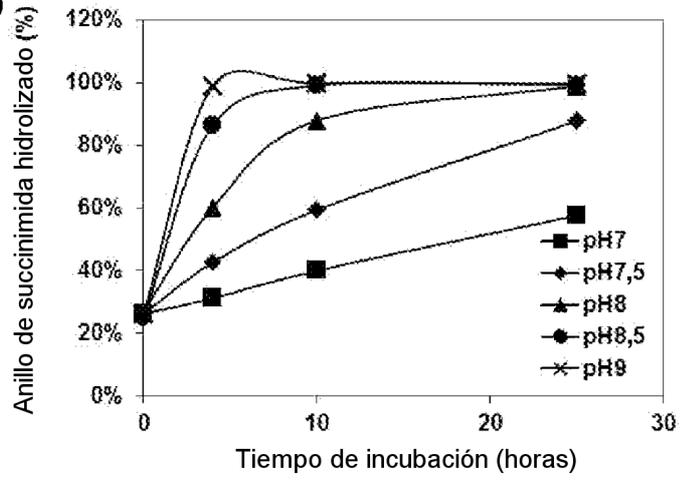


FIG. 5E

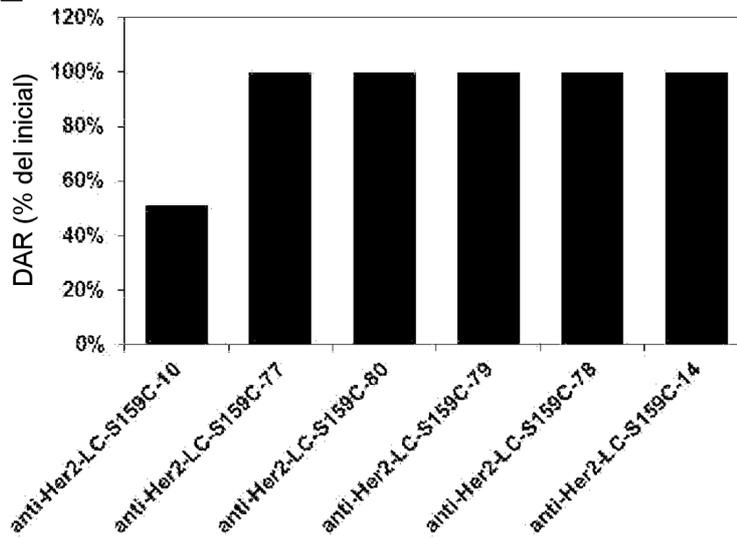


FIG. 5F

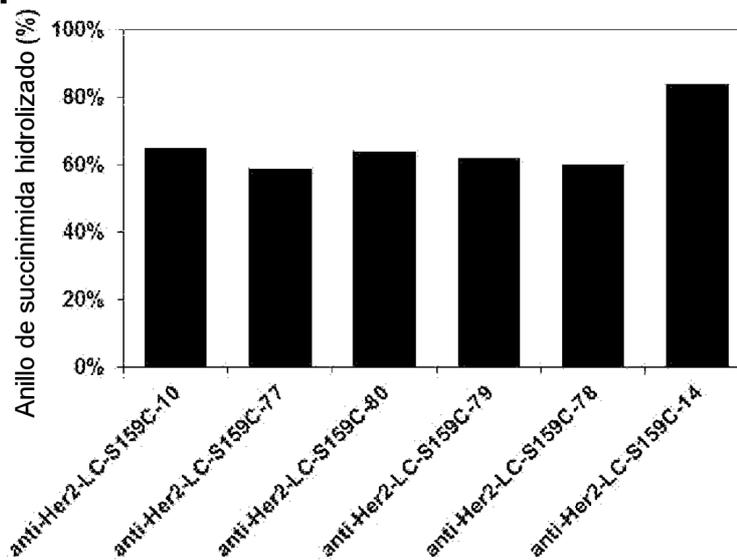


FIG. 6A

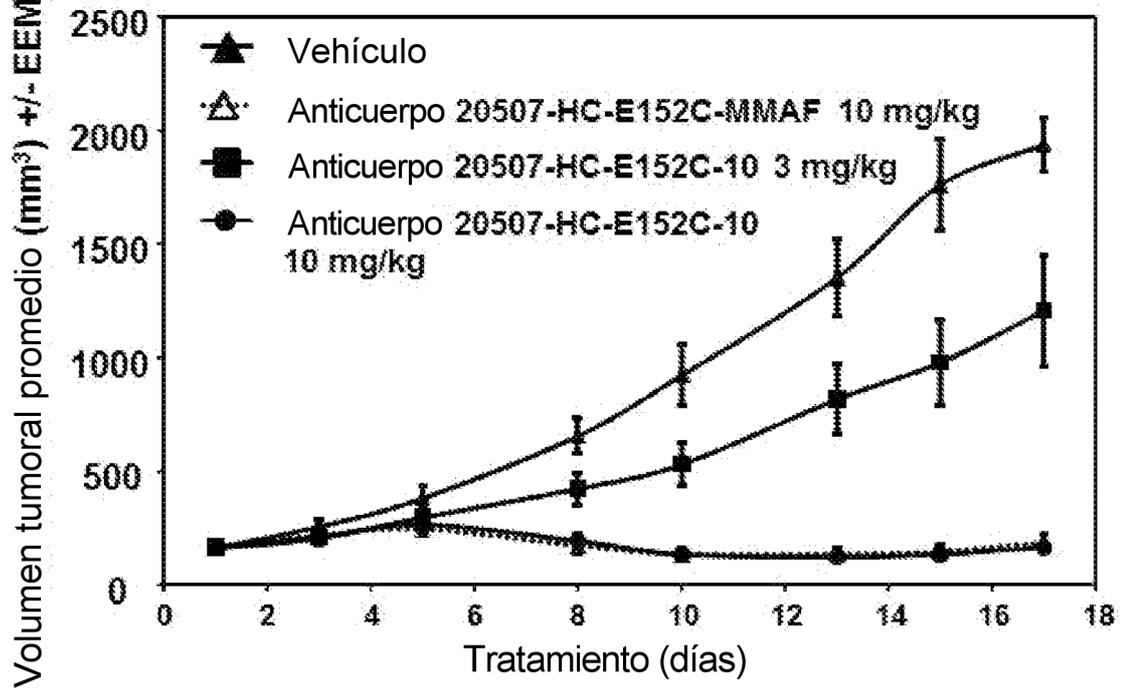


FIG. 6B

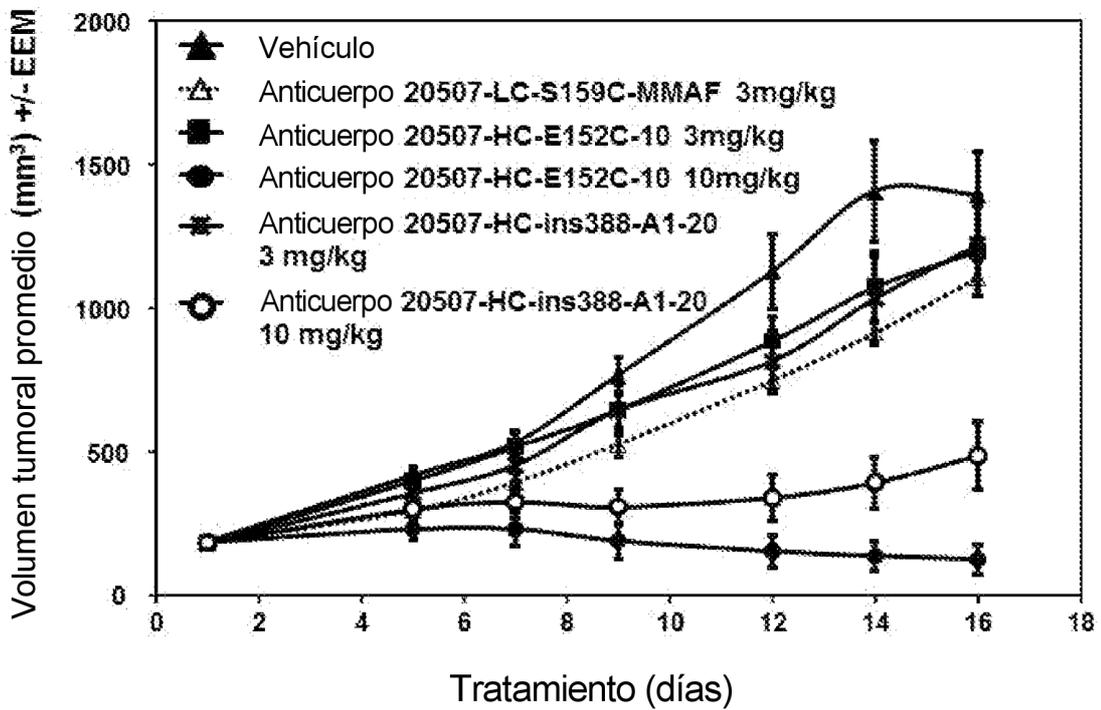


FIG. 6C

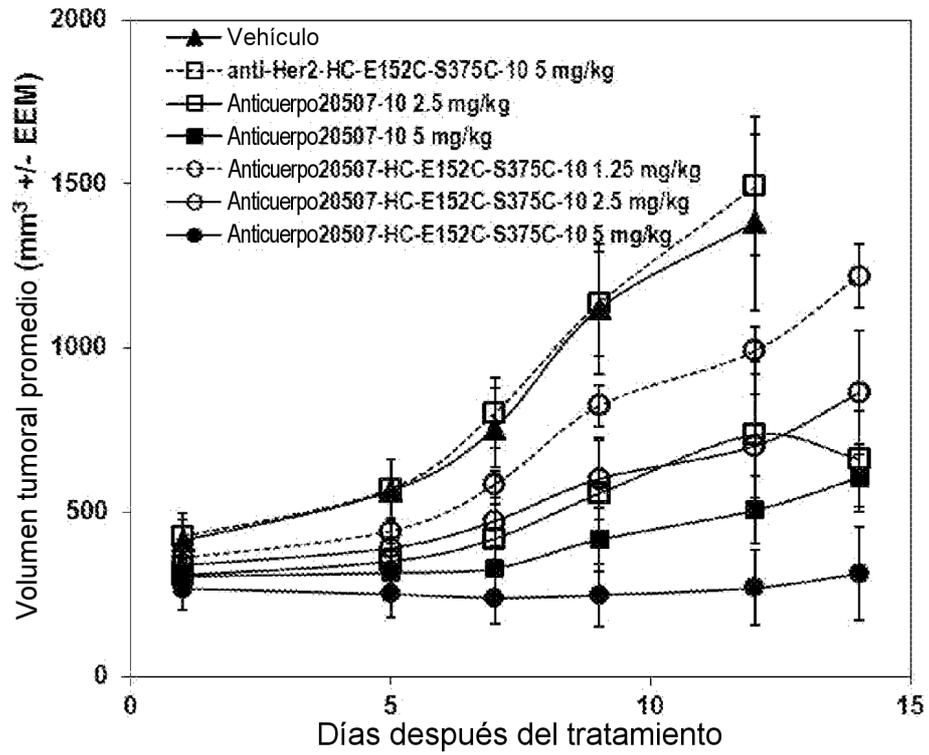


FIG. 6D

