

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 090**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2016** **PCT/IB2016/001772**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017** **WO17089890**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2016** **E 16868091 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3380124**

54 Título: **Conjugados que comprenden grupos autoinmolantes y métodos relacionados con los mismos**

30 Prioridad:

25.11.2015 US 201562260046 P

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

24.09.2024

73 Titular/es:

LIGACHEM BIOSCIENCES INC. (100.0%)
10, Gukjegwahak 10-ro, Yuseong-gu
Daejeon 34002, KR

72 Inventor/es:

KIM, YONG ZU;
OH, YEONG SOO;
CHAE, JEIWOOK;
SONG, HO YOUNG;
CHUNG, CHUL-WOONG;
PARK, YUN HEE;
CHOI, HYO JUNG;
PARK, KYUNG EUN;
KIM, HYOUNGRAE;
KIM, JINYEONG;
MIN, JI, YOUNG;
KIM, SUNG, MIN;
LEE, BYUNG SOO;
WOO, DONG HYUN;
JUN, JI EUN y
LEE, SU IN

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 979 090 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

Conjugados que comprenden grupos autoinmolantes y métodos relacionados con los mismos

5 Antecedentes

La tecnología de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) es una tecnología orientada a diana, que permite la apoptosis selectiva de células cancerosas. Típicamente, los ADC funcionan seleccionando como diana células cancerosas usando el anticuerpo y luego liberando un material tóxico (es decir, el fármaco) en una célula, desencadenando así la muerte celular. Dado que la tecnología de ADC permite que un fármaco se administre con precisión a una célula cancerosa diana y se libere en condiciones específicas, mientras se minimiza el daño colateral a las células sanas, la tecnología de ADC aumenta la eficacia de un anticuerpo terapéutico y disminuye el riesgo de una reacción adversa.

Una estructura básica de un conjugado anticuerpo-fármaco es un "anticuerpo-ligante-fármaco de bajo peso molecular (toxina)". El ligante permite idealmente que el fármaco presente un efecto sobre una célula cancerosa diana, por ejemplo, después de separarse del anticuerpo (por ejemplo, mediante hidrólisis mediada por enzimas), después de que el fármaco alcance una célula diana. El ligante también desempeña un papel funcional, conectando el anticuerpo y el fármaco. La eficacia y toxicidad del conjugado anticuerpo-fármaco depende, por tanto, en parte, de la estabilidad del ligante y, por tanto, el ligante desempeña un papel importante en la seguridad del fármaco.

Los ligantes de conjugados anticuerpo-fármaco pueden clasificarse aproximadamente como no escindibles o escindibles. Muchos ligantes no escindibles se unen a anticuerpos usando un tioéter, que comprende una cisteína del anticuerpo. El fármaco colgante generalmente no puede disociarse del anticuerpo *in vivo*. En el caso del método de tiol-maleimida ampliamente usado, sin embargo, el conjugado anticuerpo-fármaco es inestable, lo que puede dar como resultado la disociación del fármaco del conjugado antes o después de que alcance una célula diana.

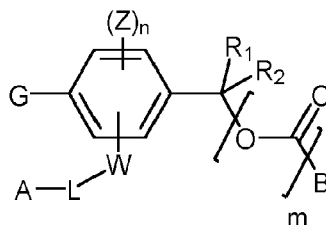
Los ligantes escindibles pueden hidrolizarse, por ejemplo, mediante una enzima lisosomal. Un ligante escindible puede comprender un enlace disulfuro, por ejemplo, que incluye una cisteína del anticuerpo. Un ligante disulfuro, que permite la disociación a través de una reacción de intercambio de tiol, se basa en parte en la captación de un conjugado anticuerpo-fármaco en una célula diana y la exposición del disulfuro al citosol, que es un entorno reductor. Puesto que están presentes en la sangre diversos tipos de tioles (por ejemplo, albúmina y glutatión), sin embargo, un fármaco puede disociarse del anticuerpo antes de alcanzar su diana.

Recientemente, se ha descrito un nuevo enfoque para preparar conjugados anticuerpo-fármaco, usando la prenilación de proteínas de una secuencia de aminoácidos C-terminal para instalar una unidad isoprenoide modificada que permite la unión de un fármaco u otro agente activo al anticuerpo de una manera suave y específica de sitio (por ejemplo, véase la publicación de patente estadounidense n.º 2012/0308584). Es posible un perfeccionamiento adicional. Lee *et al.* (2015), *Angewandte Chemie*, 54(41):12020-12024 describen la prenilación enzimática y la ligación de oxima para la síntesis de conjugados proteína-fármaco estables y homogéneos para terapia dirigida.

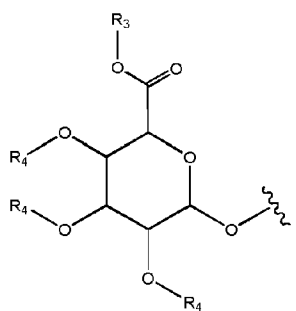
A la luz de lo anterior, son deseables ligantes mejorados para conjugados anticuerpo-fármaco.

45 Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones. La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un conjugado ligando-fármaco, que comprende un ligando, un ligante y un agente activo, que tiene la fórmula:



en la que:



G representa

A representa un anticuerpo;

5 B representa el agente activo;

W representa $-C(O)-$, $-C(O)NR'-$, $-C(O)O-$, $-S(O)_2NR'-$, $-P(O)R''NR'-$, $-S(O)NR'-$ o $-PO_2NR'-$, en cada caso donde el C(O), S o P se une directamente al anillo de fenilo,

10 y R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), cicloalquilo (C_3-C_8), alcoxilo (C_1-C_8), alquiltio (C_1-C_8), mono- o di-alquil (C_1-C_8)amino, heteroarilo (C_3-C_{20}) o arilo (C_6-C_{20});

cada Z representa independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o un grupo aceptor de electrones (tal como una amida, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, halógeno, ciano o nitro), alquilo (C_1-C_8), halógeno, ciano o nitro;

15 n es un número entero desde 1 hasta 3;

m es 0 ó 1 ;

20 L es un ligante que enlaza de manera covalente A a W, en el que el ligante comprende un péptido que comprende al menos un aminoácido hidrófilo;

R_1 y R_2 son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o cicloalquilo (C_3-C_8); o R_1 y R_2 tomados junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo de cicloalquilo (C_3-C_8);

25 R_3 es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo; y

cada R_4 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo.

30 Según una realización preferida el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, fragmento de anticuerpo, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena sencilla ("scFv"), diacuerpo, anticuerpo lineal, anticuerpo biespecífico, anticuerpo multiespecífico, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano o una proteína de fusión que comprende la porción de unión a antígeno de un anticuerpo.

35 Según otra realización preferida el anticuerpo es muromonab-CD3, abciximab, rituximab, daclizumab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, etanercept, basiliximab, gemtuzumab, alemtuzumab, ibritumomab, adalimumab, alefacept, omalizumab, efalizumab, tositumomab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, eculizumab, rilonacept, certolizumab, romiplostim, AMG-531, golimumab, ustekinumab, ABT-874, belatacept, belimumab, atacicept, un anticuerpo anti-CD20, canakinumab, tocilizumab, atlizumab, mepolizumab, pertuzumab, HuMax CD20,

40 tremelimumab, ticilimumab, ipilimumab, IDEC-114, inotuzumab, aflibercept, HuMax-CD4, teplizumab, oteclizumab, catumaxomab, el anticuerpo anti-EpCAM IGN101, adecatumomab, oregovomab, dinutuximab, girentuximab, denosumab, bapineuzumab, motavizumab, efumgumab, raxibacumab, un anticuerpo anti-CD20, LY2469298 o veituzumab.

45 Según una realización preferida R_3 y R_4 son cada uno hidrógeno.

Según una realización adicional preferida W es $-C(O)NR'-$, donde C(O) se une al anillo de fenilo y NR' se une a L.

50 Según una realización adicional preferida el ligante comprende un alquileo que tiene de 1 a 100 átomos de carbono y o bien: el alquileo incluye al menos un enlace insaturado; el alquileo incluye al menos un heteroarileno; un átomo de carbono del alquileo se reemplaza por uno o más heteroátomos seleccionados de nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre (S); o el alquileo se sustituye además con uno o más alquilos que tienen de 1 a 20 átomos de carbono.

55 Según una realización preferida el péptido comprende alanina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, glicina,

lisina, ornitina, prolina, serina o treonina.

Según una realización adicional preferida el péptido comprende aspartato o glutamato.

- 5 Según todavía una realización adicional preferida el ligante comprende un resto de aminoácido que se reconoce mediante una isoprenoide transferasa; y el enlace tioéter comprende un átomo de azufre de una cisteína del resto de aminoácido.

Según una realización preferida el ligante comprende al menos una unidad de isoprenilo.

- 10 Según otra realización preferida el ligante comprende una unidad de conexión representada por $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$, $-((CH_2)_pV)_q-$, $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_qY-$, $-((CH_2)_pV)_q(CH_2)_r-$, $-Y(((CH_2)_pV)_q)-$ o $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_qYCH_2-$

en las que:

- 15 r es un número entero desde 0 hasta 10;

p es un número entero desde 1 hasta 10;

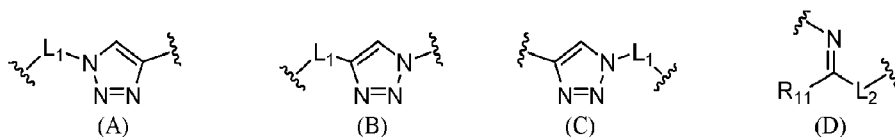
- 20 q es un número entero desde 1 hasta 20;

V e Y son cada uno independientemente un enlace sencillo, -O-, -S-, -NR₂₁-, -C(O)NR₂₂-, -NR₂₃C(O)-, -NR₂₄SO₂- o -SO₂NR₂₅-; y

- 25 R₂₁ a R₂₅ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquil (C₁-C₆)arilo (C₆-C₂₀) o alquil (C₁-C₆)heteroarilo (C₃-C₂₀).

Según una realización adicional preferida el ligante comprende una unidad de enlace que se representa mediante una cualquiera de las fórmulas A, B, C o D:

30



en las que:

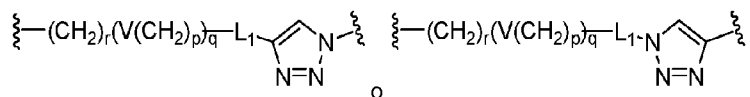
- 35 L₁ es un enlace sencillo o alquileo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono;

R₁₁ es hidrógeno o alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono; y

L₂ es alquileo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono.

40

Según aún una realización adicional preferida el ligante comprende:



- 45 V es un enlace sencillo, -O-, -S-, -NR₂₁-, -C(O)NR₂₂-, -NR₂₃C(O)-, -NR₂₄SO₂- o -SO₂NR₂₅-, preferiblemente -O-;

R₂₁ a R₂₅ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquil (C₁-C₆)arilo (C₆-C₂₀) o alquil (C₁-C₆)heteroarilo (C₃-C₂₀);

- 50 r es un número entero desde 1 hasta 10, preferiblemente 2 ó 3;

p es un número entero desde 0 hasta 10, preferiblemente 1 ó 2;

q es un número entero desde 1 hasta 20, preferiblemente de 1 a 6; y

55

L₁ es un enlace sencillo.

Según una realización preferida el agente activo se selecciona de:

- 60 (a) erlotinib, bortezomib, fulvestrant, sutent, letrozol, mesilato de imatinib, PTK787/ZK 222584, oxaliplatino, 5-

- 5 fluorouracilo, leucovorina, rapamicina, lapatinib, lonafarnib, sorafenib, gefitinib, AG1478, AG1571, tiotepa, ciclofosfamida, busulfano, improsulfano, piposulfano, benzodopa, carbocuna, meturedopa, uredopa, etilenimina, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilientiofosforamida, trimetilolomelamina, bullatacina, bullatacinona, camptotecina, topotecán, briostatina, callistatina, CC-1065, adozelesina, carzelesina, bizelesina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, KW-2189, CB1-TM1, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, predinimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, caliqueamicina gamma 1, caliqueamicina omega 1, dinemicina, dinemicina A, clodronato, esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina, aclacinomisinas, actinomicina, antimicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carninomicina, carzinoflina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina liposomal, desoxidoxorrubicina, epirubicina, esorubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptomigrina, estreptozocina, tuberculidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, 5-fluorouracilo, denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptapurina, tiampirina, tiguana, anticitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona, aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido folínico, aceglatona, glicósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestabucil, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, etoglucido, nitrato de galio, hidroxurea, lentinano, lonidainina, maitansina, ansamitocinas, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, 2-etilhidrazida, procarbazona, polisacárido-K, razoxano, rizoxina, sizofirano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, 2,2',2"-trichlorotrietilamina, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, gacitosina, arabinósido, ciclofosfamida, tiotepa, paclitaxel, formulación de nanopartículas de paclitaxel modificadas por ingeniería con albúmina, doxetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, carboplatino, vinblastina, platino, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, xeloda, ibandronato, CPT-11, inhibidor de topoisomerasa RFS 2000, difluorometilornitina, ácido retinoico, capecitabina o sales, solvatos o ácidos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores;
- 30 (b) monocina, una linfocina, una hormona polipeptídica tradicional, hormona paratiroidea, tiroxina, relaxina, prorrelaxina, una hormona glicoproteica, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante del tiroides, hormona luteinizante, factor de crecimiento hepático factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , hormona antimülleriana, péptido asociado a gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular, trombopoyetina, eritropoyetina, un factor osteoinductivo, un interferón, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , un factor estimulante de colonias ("CSF"), macrófago-CSF, granulocito-macrófago-CSF, granulocito-CSF, una interleucina ("IL"), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, un factor de necrosis tumoral, TNF- α , TNF- β , un factor polipeptídico, LIF, ligando en kit o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- 40 (c) toxina diftérica, toxina botulínica, toxina tetánica, toxina de disentería, toxina del cólera, amanitina, α -amanitina, un derivado de amanitina, pirrolobenzodiazepina, derivados de pirrolobenzodiazepina, tetrodotoxina, brevetoxina, ciguatoxina, ricina, toxina AM, auristatina (por ejemplo, auristatina E (MMAE) o auristatina F (MMAF)), tubulisina, geldanamicina, maitansinoides, caliqueamicina, daunomicina, doxorubicina, metotrexato, vindesina, SG2285, dolastatina, un análogo de dolastatina, criptoficina, camptotecina, un derivado o metabolito de camptotecina (por ejemplo, SN-38), rizoxina, un derivado de rizoxina, CC-1065, un análogo o derivado de CC-1065, duocarmicina, un antibiótico de enediina, esperamicina, epotilona, azonafida, aplidina, un toxoide o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- 45 (d) un ligando de afinidad, en el que el ligando de afinidad es un sustrato, un inhibidor, un agente estimulante, un neurotransmisor, un radioisótopo o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- 50 (e) un marcador radioactivo, ^{32}P , ^{35}S , un colorante fluorescente, un reactivo denso en electrones, una enzima, biotina, estreptavidina, dioxigenina, un hapteno, una proteína inmunogénica, una molécula de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- 55 (f) un compuesto inmunomodulador, un agente antineoplásico, un agente antiviral, un agente antibacteriano, un agente antifúngico y un agente antiparasitario o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- 60 (g) tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona o toremifeno;
- (h) 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, letrozol o anastrozol;
- 65 (i) flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, goserelina o troxacitabina;

(j) un inhibidor de aromatasas;

(k) un inhibidor de proteína cinasa; y

(l) un inhibidor de lípido cinasa.

Según una realización adicional preferida el agente activo se selecciona de un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una vacuna y un agente antiangiogénico.

La presente invención se refiere, en un segundo aspecto, a una composición farmacéutica que comprende el conjugado según el primer aspecto de la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere, en un tercer aspecto, a un conjugado según el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer.

La presente invención se refiere, en un tercer aspecto, a un método para elaborar el conjugado ligando-fármaco según el primer aspecto de la invención, que comprende hacer reaccionar una biomolécula con un profármaco, en el que:

la biomolécula comprende un ligando y una cetona o aldehído;

el profármaco comprende una alcoxiamina;

la reacción produce una oxima, ligando así de manera covalente el ligando al profármaco.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un mecanismo de liberación de fármaco activo a partir de un ligante a base de β -glucurónido.

La figura 2 es un gráfico que representa la hidrólisis de un ligante por β -glucuronidasa a partir del ejemplo experimental 1.

La figura 3 es un gráfico que representa la estabilidad plasmática de dos conjugados fármaco-ligante a partir del ejemplo experimental 2.

La figura 4 es un gráfico que representa la estabilidad plasmática del compuesto 47a, descrito en el ejemplo 68.

La figura 5 es un gráfico que representa la estabilidad plasmática del compuesto 49a, descrito en el ejemplo 70.

La figura 6 es un gráfico que representa la estabilidad plasmática del compuesto 48a, descrito en el ejemplo 69.

La figura 7 consiste en dos paneles, la figura 7A y la figura 7B. La figura 7A muestra una estrategia para conjugar un fármaco con un anticuerpo (DAR2). La figura 7B muestra una estrategia para conjugar un fármaco con un anticuerpo (DAR4).

La figura 8 muestra actividades *in vitro* relativas de los conjugados DAR2 MMAE, con longitud de PEG variable en el ligante, frente a células JIMT-1 (positivas para HER2) y MCF7 (negativas para HER2).

La figura 9 muestra actividades *in vitro* relativas de los conjugados DAR4 MMAE, que tienen una longitud de PEG diferente en la parte de ligante, frente a células JIMT-1 (positivas para HER2) y MCF7 (negativas para HER2).

La figura 10 muestra reactividad beta-glucuronidasa humana en ADC de DAR4, que tienen los diversos tipos de ligante. Se incubaron 12 μ M de ADC con 0,01 μ g de beta-glucuronidasa humana (R&D Systems) durante 3 horas a 37 °C.

La figura 11 muestra la estabilidad plasmática de ADC2 y Kadcyla en plasma de ratón o humano.

La figura 12 muestra la estabilidad de plasma humano de ADC33 y ADC34 durante 7 días.

La figura 13 muestra el perfil PK de rata de Herceptin y ADC2.

La figura 14 muestra el perfil PK de rata de ADC23 y ADC34.

La figura 15 muestra la mejora del perfil PK de rata de ADC basados en MMAE reemplazando el ligante-toxina de 2g a 11j.

La figura 16 muestra la mejora del perfil PK de rata mediante la unidad de ligante ramificado.

La figura 17 muestra el impacto de un aminoácido polar sobre el perfil PK de rata en ADC de MMAE.

La figura 18 muestra la mejora del perfil PK de rata mediante ligante-toxina ramificado con o sin aminoácido polar en ADC con DAR2.

La figura 19 muestra los efectos de Asp en la unidad de ligante-toxina sobre el perfil PK de rata de ADC con DAR4.

La figura 20 muestra los efectos de Glu en la unidad de ligante-toxina sobre el perfil PK de rata de ADC con DAR4.

La figura 21 muestra la eficacia *in vivo* de ADC de DAR4 de tipo amina representativo usando MMAF (ADC23) o MMAE (ADC24).

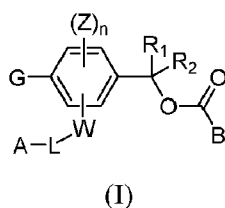
La figura 22 muestra la eficacia *in vivo* de ADC de DAR4 de tipo amida representativo usando MMAF (ADC34) o MMAE (ADC33).

Descripción detallada

En el presente documento se describen generalmente conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). El conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender un grupo autoinmolable, por ejemplo, para su uso en la separación de un agente activo del ADC. Sin embargo, como reconocería un experto en la técnica, la porción de anticuerpo de tales conjugados puede reemplazarse por cualquier ligando adecuado y, por tanto, la divulgación se refiere en igual medida a conjugados ligando-fármaco. Por consiguiente, las referencias y descripciones de conjugados anticuerpo-fármaco en el presente documento deben entenderse, cuando no se contradiga por el contexto, como igualmente aplicables a conjugados ligando-fármaco y a sus productos intermedios correspondientes (por ejemplo, conjugados ligando-ligante). En todos los aspectos relacionados con los diversos conjugados ligando-fármaco descritos en el presente documento, sin embargo, el ligando es preferiblemente un anticuerpo.

En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco, que comprende un anticuerpo, un ligante y un agente activo (por ejemplo, un fármaco). El ligante puede comprender una oxima O-sustituida. En realizaciones preferidas, el átomo de oxígeno de la oxima está sustituido con un grupo que une de manera covalente la oxima al agente activo, y el átomo de carbono de la oxima está sustituido con un grupo que une de manera covalente la oxima al anticuerpo. En algunas realizaciones, el átomo de carbono de la oxima está sustituido con un grupo que une de manera covalente la oxima al agente activo, y el átomo de oxígeno de la oxima está sustituido con un grupo que une de manera covalente la oxima al anticuerpo. En algunas realizaciones, el ligante no comprende una oxima. Por ejemplo, el ligante puede comprender un heterociclo que resulta de una cicloadición, tal como triazol sustituido, en lugar de una oxima.

Un ADC puede representarse por la fórmula (I), que comprende un anticuerpo (A) que tiene especificidad de unión por una molécula, un ligante y un agente activo (B), tal como un fármaco, una toxina, un ligando, una sonda de detección o similares, que tiene una función o actividad deseada:



en la que

G es un azúcar o ácido de azúcar, preferiblemente ácido glucurónico o un derivado del mismo;

A representa el anticuerpo;

B representa el agente activo, tal como un fármaco;

W representa un grupo aceptor de electrones, preferiblemente $-C(O)NR'$, donde $C(O)$ se une al anillo de fenilo y NR' se une a L;

cada Z representa independientemente alquilo (C_1-C_8), halógeno, ciano o nitro, preferiblemente hidrógeno;

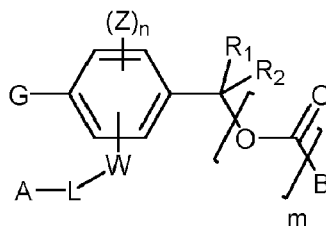
n es un número entero desde 0 hasta 3, preferiblemente 3;

L comprende una cadena de 3 a 100 átomos que enlaza de manera covalente A a W; y

- 5 R_1 y R_2 son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o cicloalquilo (C_3-C_8), preferiblemente hidrógeno o R_1 y R_2 tomados junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo de cicloalquilo (C_3-C_8).

Los restos que conectan A y B, tomados juntos (es decir, desde L hasta $OC(=O)$), forman el ligante.

- 10 En algunas realizaciones, el conjugado tiene la fórmula:



- 15 en el que G representa un azúcar, ácido de azúcar o azúcar modificada, preferiblemente un azúcar o ácido de azúcar, lo más preferiblemente ácido glucurónico;

A representa el ligando;

B representa el agente activo;

- 20 W representa $-C(O)-$, $-C(O)NR'-$, $-C(O)O-$, $-S(O)_2NR'-$, $-P(O)R''NR'-$, $-S(O)NR'-$ o $-PO_2NR'-$, en cada caso donde el C(O), S o P se une directamente al anillo de fenilo y R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), cicloalquilo (C_3-C_8), alcoxilo (C_1-C_8), alquiltio (C_1-C_8), mono- o di-alquil (C_1-C_8) amino, heteroarilo (C_3-C_{20}) o arilo (C_6-C_{20});

- 25 cada Z representa independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o un grupo aceptor de electrones (tal como una amida, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, halógeno, ciano o nitro), preferiblemente un hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), halógeno, ciano o nitro, lo más preferiblemente hidrógeno;

- 30 n es un número entero desde 1 hasta 3, preferiblemente 3;

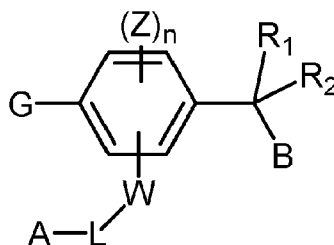
m es 0 ó 1, preferiblemente 1;

L es un ligante (por ejemplo, que comprende una oxima) que enlaza de manera covalente A a W;

- 35 R_1 y R_2 son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o cicloalquilo (C_3-C_8), preferiblemente hidrógeno o R_1 y R_2 tomados junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo de cicloalquilo (C_3-C_8).

En algunas realizaciones, el conjugado tiene la fórmula:

40



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

- 45 A representa el ligando;

B representa el agente activo;

- 50 G puede representar un azúcar, ácido de azúcar o azúcar modificada, preferiblemente un azúcar o ácido de azúcar, lo más preferiblemente ácido glucurónico;

W puede representar $-C(O)-$, $-C(O)NR'-$, $-C(O)O-$, $-S(O)_2NR'-$, $-P(O)R''NR'-$, $-S(O)NR'-$ o $-PO_2NR'-$, en cada caso donde el C(O), S o P se une directamente al anillo de fenilo y R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₈), alcoxilo (C₁-C₈), alquiltio (C₁-C₈), mono- o di-alquil (C₁-C₈)amino, heteroarilo (C₃-C₂₀) o arilo (C₆-C₂₀);

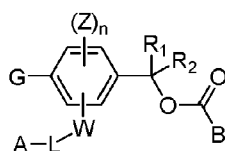
cada Z representa independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o un grupo aceptor de electrones (tal como una amida, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, halógeno, ciano o nitro), preferiblemente un hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), halógeno, ciano o nitro, lo más preferiblemente hidrógeno;

n es un número entero desde 1 hasta 3, preferiblemente 3;

L representa un ligante, que comprende la oxima, que enlaza de manera covalente A a W;

R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₈), preferiblemente hidrógeno o R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo de cicloalquilo (C₃-C₈).

Un conjugado ligando-fármaco puede comprender un ligando; un ligante; y un agente activo, representado por la siguiente estructura:



(I)

en la que:

G representa un azúcar o ácido de azúcar, preferiblemente ácido glucurónico;

A representa un ligando;

B representa el agente activo;

W representa un grupo aceptor de electrones, preferiblemente $-C(O)NR'-$, donde C(O) se une al anillo de fenilo y NR' se une a L;

cada Z representa independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o un grupo aceptor de electrones (tal como una amida, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, halógeno, ciano o nitro), preferiblemente un hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), halógeno, ciano o nitro, lo más preferiblemente hidrógeno;

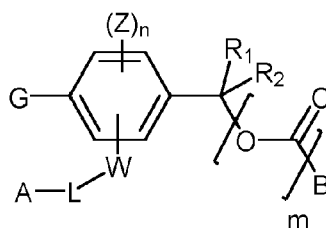
n es un número entero desde 1 hasta 3, preferiblemente 3;

L comprende una cadena de 3 a 100 átomos que enlaza de manera covalente A a W;

R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₈), preferiblemente hidrógeno o R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo de cicloalquilo (C₃-C₈); y

los restos que conectan A y B, tomados juntos (es decir, desde L hasta OC(=O)), forman el ligante.

Un conjugado ligando-fármaco puede comprender un ligando, un ligante y un agente activo, estando representado por la siguiente estructura:



en la que:

G representa un azúcar, ácido de azúcar o azúcar modificada, preferiblemente un azúcar o ácido de azúcar, lo más preferiblemente ácido glucurónico;

A representa el ligando;

B representa el agente activo;

W representa $-C(O)-$, $-C(O)NR'-$, $-C(O)O-$, $-S(O)_2NR'-$, $-P(O)R''NR'-$, $-S(O)NR'-$ o $-PO_2NR'-$, en cada caso donde el C(O), S o P se une directamente al anillo de fenilo y R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), cicloalquilo (C_3-C_8), alcoxilo (C_1-C_8), alquiltio (C_1-C_8), mono- o di-alquil (C_1-C_8) amino, heteroarilo (C_3-C_{20}) o arilo (C_6-C_{20}).

cada Z representa independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o un grupo aceptor de electrones (tal como una amida, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, halógeno, ciano o nitro), preferiblemente un hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), halógeno, ciano o nitro, lo más preferiblemente hidrógeno;

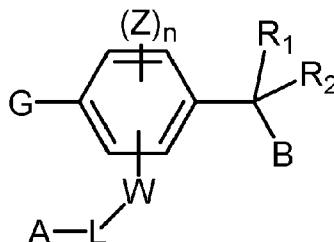
n es un número entero desde 1 hasta 3, preferiblemente 3;

m es 0 ó 1, preferiblemente 1;

L es un ligante que enlaza de manera covalente A a W;

R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o cicloalquilo (C_3-C_8), preferiblemente hidrógeno o R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo de cicloalquilo (C_3-C_8).

Un conjugado ligando-fármaco puede comprender un ligando, un ligante y un agente activo representado por la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

A representa el ligando;

B representa el agente activo;

G representa un azúcar, ácido de azúcar o azúcar modificada, preferiblemente un azúcar o ácido de azúcar, lo más preferiblemente ácido glucurónico;

W representa $-C(O)-$, $-C(O)NR'-$, $-C(O)O-$, $-S(O)_2NR'-$, $-P(O)R''NR'-$, $-S(O)NR'-$ o $-PO_2NR'-$, en cada caso donde el C(O), S o P se une directamente al anillo de fenilo y R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), cicloalquilo (C_3-C_8), alcoxilo (C_1-C_8), alquiltio (C_1-C_8), mono- o di-alquil (C_1-C_8) amino, heteroarilo (C_3-C_{20}) o arilo (C_6-C_{20}).

cada Z representa independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o un grupo aceptor de electrones (tal como una amida, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, halógeno, ciano o nitro), preferiblemente un hidrógeno, alquilo (C_1-C_8), halógeno, ciano o nitro, lo más preferiblemente hidrógeno;

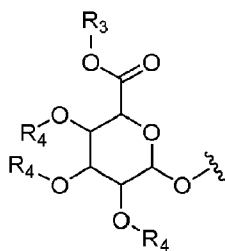
n es un número entero desde 1 hasta 3, preferiblemente 3;

L representa un ligante que enlaza de manera covalente A a W;

R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) o cicloalquilo (C_3-C_8), preferiblemente hidrógeno o R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo de cicloalquilo (C_3-C_8).

El ligante puede comprender un azúcar o ácido de azúcar, por ejemplo, acoplado por un enlace susceptible a escisión enzimática, tal como un enlace glicosídico. Este azúcar o ácido de azúcar está representado por G en la fórmula (I). El azúcar o ácido de azúcar es preferiblemente un monosacárido. El azúcar o ácido de azúcar puede ser

ácido glucurónico o un derivado del mismo, que es capaz de escindirse del ADC mediante una β -glucuronidasa. El ácido glucurónico o un derivado del mismo, puede representarse mediante la fórmula (II):



(II)

en la que R_3 es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo, preferiblemente hidrógeno y cada R_4 es independientemente hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, preferiblemente hidrógeno.

Un grupo protector de carboxilo puede ser cualquier grupo protector adecuado para enmascarar un ácido carboxílico, por ejemplo, en síntesis orgánica, tales como metilo, metoximetilo, metiltiommetilo, tetrahidropirano, benciloximetilo, fenacilo, N-ftalimidometilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-haloetilo, 2-(p-toluenosulfonil)etilo, t-butilo, cinnamilo, bencilo, trifenilmetilo, bis(o-nitrofenil)metilo, 9-antrilmetilo, 2-(9,10-dioxo)antrilmetilo, piperonilo, 2-trimetilsililetilo, trimetilsililo o t-butildimetilsililo. En algunas realizaciones, todo el resto $R_3\text{-OC(=O)-}$ se reemplaza por un resto enmascarador de carboxilo tal como 2-alkil-1,3-oxazolinilo.

Un grupo protector de hidroxilo puede ser cualquier grupo protector adecuado para enmascarar un grupo hidroxilo, por ejemplo, en síntesis orgánica, tales como acetilo, metilo, etoxietilo, benzoílo, bencilo, 4-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, tetrahidropirano (THP), tetrahydrofurano (THF), terc-butildimetilsililo (TBDMS), trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), terc-butildifenilsililo (TBDPS), tri-isopropilsililoximetilo (TOM), β -metoxietoximetilo (MEM), metoximetilo (MOM), alilo o tritilo.

El grupo aceptor de electrones W puede ser -C(O)- , -C(O)NR'- , -C(O)O- , $\text{-SO}_2\text{NR'-}$, -P(O)R''NR'- , -SONR'- o $\text{-PO}_2\text{NR'-}$, preferiblemente -C(O)NR'- y R' y R'' pueden ser cada uno independientemente hidrógeno, alquilo ($C_1\text{-C}_8$), cicloalquilo ($C_3\text{-C}_8$), alcoxilo ($C_1\text{-C}_8$), alquiltio ($C_1\text{-C}_8$), mono- o di-alquil ($C_1\text{-C}_8$)amino, heteroarilo ($C_3\text{-C}_{20}$) o arilo ($C_6\text{-C}_{20}$), preferiblemente hidrógeno. En tales realizaciones, W se orienta preferiblemente de manera que el grupo carbonilo, fosforilo, sulfonilo o sulfinilo se une directamente al anillo de fenilo. Cuando Z representa un grupo aceptor de electrones, Z puede representar cualquiera de los restos descritos en este párrafo para W.

El ligante puede comprender un grupo aceptor de electrones, seleccionado de -C(O)- , -C(O)NR'- , -C(O)O- , $\text{-SO}_2\text{NR'-}$, -P(O)R''NR'- , -SONR'- y $\text{-PO}_2\text{NR'-}$, preferiblemente -C(O)NR'- , en las que R' y R'' pueden ser cada uno independientemente hidrógeno, alquilo ($C_1\text{-C}_8$), cicloalquilo ($C_3\text{-C}_8$), alcoxilo ($C_1\text{-C}_8$), alquiltio ($C_1\text{-C}_8$), mono- o di-alquil ($C_1\text{-C}_8$)amino, heteroarilo ($C_3\text{-C}_{20}$) o arilo ($C_6\text{-C}_{20}$), preferiblemente hidrógeno.

L y/o el ligante puede comprender un alquileo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 100 átomos de carbono, preferiblemente de 16 a 50 átomos de carbono o de 50 a 100 átomos de carbono y satisfacer al menos uno, preferiblemente al menos dos, de lo siguiente (i) a (iv):

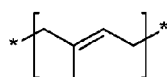
(i) el alquileo incluye al menos un enlace insaturado, preferiblemente 3 ó 4 dobles enlaces y ningún triple enlace,

(ii) el alquileo incluye al menos un heteroarileno,

(iii) al menos un átomo de carbono del alquileo se reemplaza por uno o más heteroátomos seleccionados de nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre (S), preferiblemente al menos un nitrógeno y al menos un oxígeno (por ejemplo, como en una oxima), y

(iv) el alquileo se sustituye con uno o más alquilos que tienen de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente 2 ó 3 metilos.

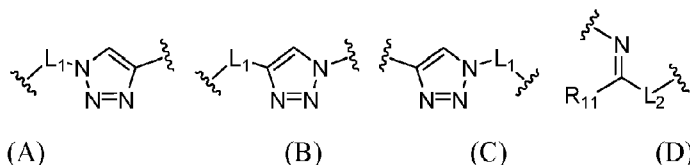
Por ejemplo, L y/o el ligante puede comprender al menos una unidad de isoprenilo, preferiblemente dos unidades de isoprenilo, cada una representada por la fórmula (III), que puede reconocerse preferiblemente mediante una isoprenoide transferasa, por ejemplo, como parte de un producto o sustrato de la isoprenoide transferasa.



(III)

En realizaciones preferidas, una cisteína del anticuerpo forma un enlace tioéter con un átomo de carbono de una unidad de isoprenilo, uniéndose de ese modo de manera covalente el anticuerpo al ligante.

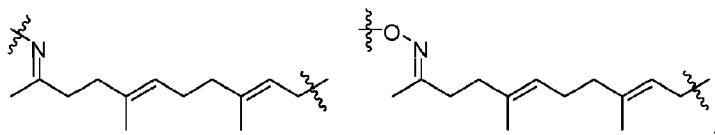
L y/o el ligante puede comprender una unidad de enlace formada por una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, reacción hetero-Diels-Alder, reacción de sustitución nucleofílica, reacción de carbonilo de tipo no aldol, adición a un enlace múltiple carbono-carbono, reacción de oxidación o reacción clic. Una unidad de enlace puede formarse mediante una reacción entre un acetileno y azida o una reacción de carbonilo de tipo no aldol, tal como una reacción entre un grupo aldehído o cetona e hidrazina o alcoxiamina; tales unidades de unión pueden representarse por la fórmula (A), (B), (C) o (D).



L₁ es un enlace sencillo o alquileo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, preferiblemente 12 átomos de carbono; R₁₁ es hidrógeno o un alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente metilo; y L₂ es un alquileo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, por ejemplo, 10 u 11, preferiblemente 11 átomos de carbono. En algunas realizaciones, L₁ y/o L₂ pueden comprender al menos una unidad de isoprenilo, representada por la fórmula (III), preferiblemente dos unidades de isoprenilo. L₂ puede consistir en al menos una unidad de isoprenilo, representada por la fórmula (III), preferiblemente dos unidades de isoprenilo. En realizaciones preferidas, un átomo de carbono de una unidad de isoprenilo forma un enlace tioéter con el átomo de azufre de una cisteína del anticuerpo, lo más preferiblemente en un extremo C-terminal de una cadena pesada o ligera, uniéndose de ese modo de manera covalente el anticuerpo y el ligante.

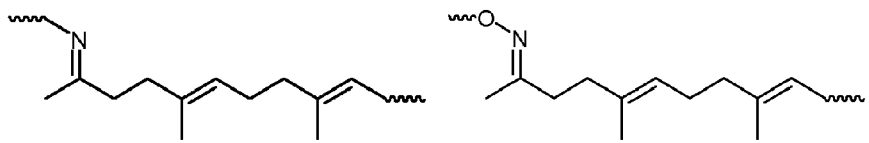
Un conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender la unidad de enlace representada por la fórmula (D) anteriormente, en la que L₂ consiste en al menos una unidad de isoprenilo, preferiblemente dos unidades de isoprenilo. La unidad de enlace puede ser una oxima O-sustituida, es decir, el nitrógeno de la unidad de enlace puede unirse de manera covalente a un oxígeno sustituido. Un átomo de carbono de una unidad de isoprenilo puede formar un enlace tioéter con el átomo de azufre de una cisteína del anticuerpo, lo más preferiblemente en un extremo C-terminal de una cadena pesada o ligera, uniéndose de ese modo de manera covalente la unidad de enlace y el anticuerpo.

L y/o el ligante puede comprender un grupo isoprenilo representado por



o, por ejemplo, en el que un átomo de carbono del grupo isoprenilo forma un enlace tioéter con un átomo de azufre de una cisteína del anticuerpo, uniéndose de ese modo de manera covalente el grupo isoprenilo y el anticuerpo. El nitrógeno del grupo isoprenilo puede unir de manera covalente el grupo isoprenilo a una unidad de polietilenglicol de L y/o el ligante.

En algunas realizaciones, L y/o el ligante puede comprender un grupo isoprenilo representado por



o, por ejemplo, en el que un átomo de carbono del grupo isoprenilo forma un enlace tioéter con un átomo de azufre de una cisteína del anticuerpo, uniéndose de ese modo de manera covalente el grupo isoprenilo y el anticuerpo. El nitrógeno del grupo isoprenilo puede unir de manera covalente el grupo isoprenilo a una unidad de polietilenglicol de L y/o el ligante.

Pueden llevarse a cabo reacciones de química clic en condiciones suaves, que pueden realizarse en presencia de un anticuerpo sin desnaturalizar el anticuerpo. Una reacción de química clic muestra alta especificidad de reacción. Por tanto, incluso aunque anticuerpos tienen diversos grupos funcionales (por ejemplo, aminas, carboxilos, carboxamidas y guanidínios), una reacción de química clic puede realizarse, por ejemplo, sin afectar las cadenas laterales de aminoácidos del anticuerpo. Una reacción de química clic entre un grupo azida y un grupo acetileno, por ejemplo, puede producirse en presencia de un anticuerpo sin modificar los grupos funcionales de cadena lateral de aminoácidos del anticuerpo. Además, una reacción de química clic puede seleccionarse como diana de manera precisa un grupo funcional específico, tal como grupos funcionales rara vez encontrados en la naturaleza, independientemente de la naturaleza de los reactantes. En algunos casos, los reactantes se seleccionan para mejorar la eficiencia de reacción global. Por ejemplo, una reacción de azida-acetileno de química clic puede producir triazol con un alto rendimiento (véase, por ejemplo, Hia, RK *et al.*, Chem. Rev., 109:5620 (2009); Meldal, M & Tornøe, CW, Chem Rev., 108:2952 (2008); Kolb, HC *et al.*, Angew. Chemie Int. Ed. Engl., 40:2004 (2001)).

Los grupos funcionales de azida y acetileno no existen en proteínas naturales. Por tanto, ninguna de las cadenas laterales de aminoácidos, aminas N-terminales o carboxilos C-terminales debería estar afectada por una reacción de química clic que utiliza estos grupos funcionales.

El resto L de fórmula I y/o el ligante puede incluir además una unidad de conexión representada por $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$ o $-(CH_2CH_2X)_w-$, en la que

V es un enlace sencillo, -O-, -S-, -NR₂₁-, -C(O)NR₂₂-, -NR₂₃C(O)-, -NR₂₄SO₂- o -SO₂NR₂₅-, preferiblemente -O-;

X es -O-, alquileo (C₁-C₈) o -NR₂₁-, preferiblemente -O-;

R₂₁ a R₂₅ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquil (C₁-C₆)arilo (C₆-C₂₀) o alquil (C₁-C₆)heteroarilo (C₃-C₂₀), preferiblemente hidrógeno;

r es un número entero desde 1 hasta 10, preferiblemente 2 ó 3;

p es un número entero desde 0 hasta 12, preferiblemente 1 ó 2;

q es un número entero desde 1 hasta 20; y

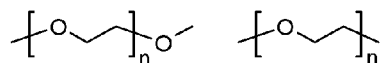
w es un número entero desde 1 hasta 20, preferiblemente 1, 3, 6 ó 12.

En algunas realizaciones, p es un número entero de 11 ó 12. En algunas realizaciones, q es un número entero de 11 a 20, tal como 11, 12, 13, 14, 15 ó 16. En algunas realizaciones, w es un número entero de 11 a 20, tal como 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

En determinadas realizaciones preferidas, q es un número entero desde 4 hasta 20. En otras realizaciones preferidas, q es un número entero desde 2 hasta 12.

L y/o el ligante comprenden preferiblemente la unidad de enlace representada por la fórmula (A), (B), (C) o (D) y la unidad de conexión representada por $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$ o $-(CH_2CH_2X)_w-$.

En realizaciones preferidas, L y/o el ligante comprenden al menos una unidad de polietilenglicol representada por

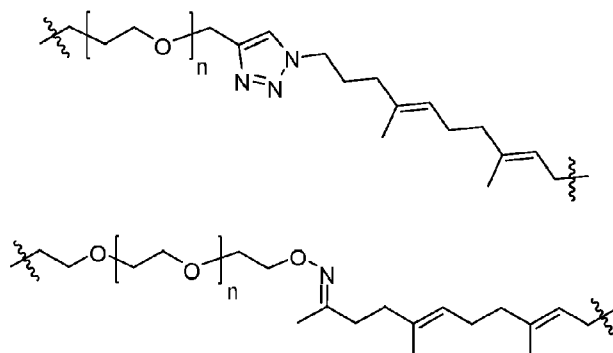


o bien la unidad de polietilenglicol puede ser -OCH₂CH₂-. El conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender desde 1 hasta 20 unidades de polietilenglicol, tales como de 1 a 12 unidades de polietilenglicol, de 5 a 12 unidades de polietilenglicol, de 6 a 12 unidades de polietilenglicol, de 5 a 20 unidades de polietilenglicol o de 6 a 20 unidades de polietilenglicol. El conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender desde 1 hasta 20 unidades de -OCH₂CH₂-, tales como de 1 a 12 unidades de -OCH₂CH₂-, de 5 a 12 unidades de -OCH₂CH₂-, de 6 a 12 unidades de -OCH₂CH₂-, de 5 a 20 unidades de -OCH₂CH₂- o de 6 a 20 unidades de -OCH₂CH₂-. En realizaciones en las que L y/o el ligante comprenden una oxima, una unidad de polietilenglicol une de manera covalente preferentemente la oxima al agente activo. En realizaciones en las que L y/o el ligante comprenden una oxima, una unidad de polietilenglicol une de manera covalente preferentemente la oxima a W, por ejemplo, en la que W se representa mediante -C(O)NR'-.

L y/o el ligante comprenden preferiblemente un grupo polietilenglicol representado por $-(CH_2CH_2O)_n-$, en la que n es de 1 a 20, tal como de 1 a 12, de 5 a 12, de 6 a 12, de 5 a 20 o de 6 a 20. En realizaciones en las que L y/o el ligante comprenden una oxima, un grupo polietilenglicol une de manera covalente preferentemente la oxima al agente activo. En realizaciones en las que L y/o el ligante comprenden una oxima, un grupo polietilenglicol une de manera

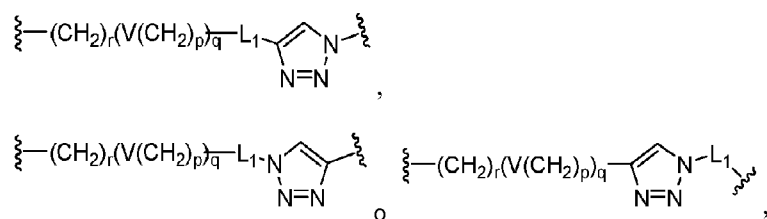
covalente preferentemente la oxima a W, por ejemplo, en la que W se representa mediante $-C(O)NR'$. Un carbono de un grupo polietilenglicol puede formar un enlace covalente con un átomo de W (por ejemplo, el nitrógeno de $-C(O)NR'$) y/o un oxígeno de un grupo polietilenglicol puede ser el oxígeno de una oxima.

- 5 En algunas realizaciones, L se representa preferiblemente mediante una de las siguientes dos estructuras y, por tanto, el ligante puede comprender una de las siguientes dos estructuras:



10 en las que n es un número entero desde 1 hasta 20. Por ejemplo, n puede ser un número entero desde 2 hasta 20, de 3 a 20, de 4 a 20, de 5 a 20, de 6 a 20, de 7 a 20, de 8 a 20, de 9 a 20, de 10 a 20, de 2 a 16, de 3 a 16, de 4 a 16, de 5 a 16, de 6 a 16, de 7 a 16, de 8 a 16, de 9 a 16 o de 10 a 16.

15 L y/o el ligante pueden comprender



20 en las que

25 V representa un enlace sencillo, $-O-$, $-S-$, $-NR_{21}-$, $-C(O)NR_{22}-$, $-NR_{23}C(O)-$, $-NR_{24}SO_2-$ o $-SO_2NR_{25}-$, preferiblemente $-O-$;

R_{21} a R_{25} representan cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), alquil (C_1-C_6)arilo (C_6-C_{20}) o alquil (C_1-C_6)heteroarilo (C_3-C_{20});

30 r es un número entero desde 1 hasta 10, preferiblemente 2 ó 3;

p es un número entero desde 0 hasta 10, preferiblemente 1 ó 2;

35 q es un número entero desde 1 hasta 20, preferiblemente de 1 a 6; y

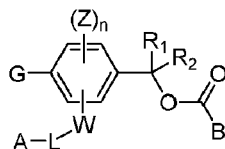
L_1 es un enlace sencillo.

En algunas realizaciones, q es un número entero desde 11 hasta 20, tal como 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

40 En algunas realizaciones, L y/o el ligante comprenden un aminoácido hidrófilo, por ejemplo, para aumentar la solubilidad en agua del conjugado anticuerpo-fármaco, ligante y/o precursores del conjugado anticuerpo-fármaco. El aminoácido hidrófilo puede ubicarse proximal al agente activo, proximal al anticuerpo o interpuesto en cualquier parte a lo largo del ligante. Específicamente, un aminoácido hidrófilo puede unir de manera covalente una oxima de L y/o el ligante a una unidad de polietilenglicol de L y/o al ligante. Un péptido puede unir de manera covalente una oxima de L y/o el ligante a una unidad de polietilenglicol de L y/o al ligante.

45 En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende un péptido y el péptido comprende al menos un aminoácido hidrófilo. Un péptido puede comprender de 2 a 20 aminoácidos. La mayoría de los aminoácidos del péptido pueden seleccionarse independientemente de alanina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, glicina, lisina, ornitina, prolina, serina y treonina. Por ejemplo, cada aminoácido del péptido puede seleccionarse independientemente de alanina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, glicina, lisina, ornitina, prolina, serina y treonina.

En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco tiene la estructura de fórmula (I) tal como se describió anteriormente o una estructura correspondiente en la que el grupo de escisión tiene una estructura de cualquiera de las fórmulas del grupo de escisión definidas en el presente documento.



(I)

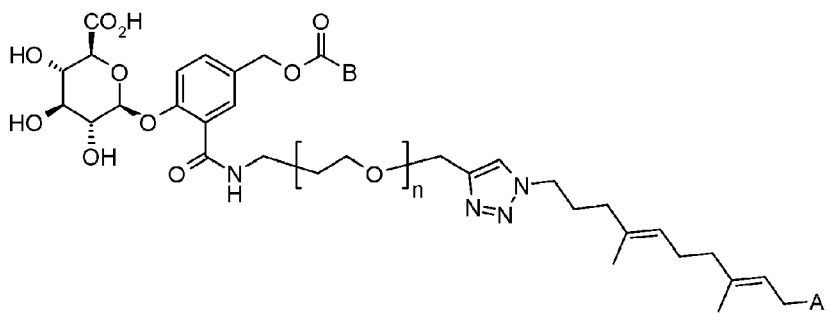
En determinadas de tales realizaciones, W puede representar $-C(O)NR'$ y el nitrógeno de W puede ser un átomo de nitrógeno de un aminoácido hidrófilo. De manera similar, W puede representar $-C(O)NR'$ y el nitrógeno de W puede ser un átomo de nitrógeno del aminoácido N-terminal en el péptido.

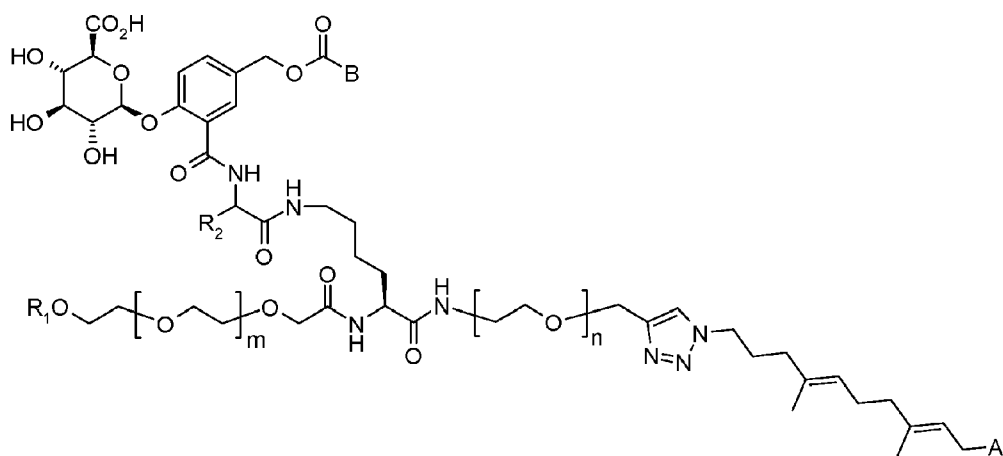
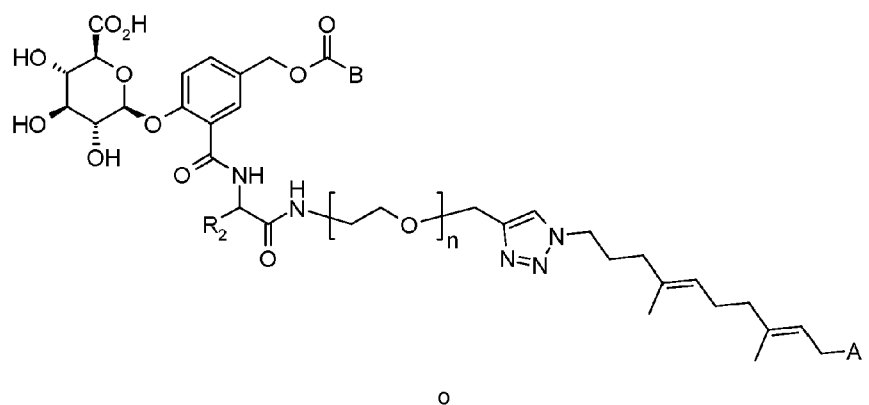
El aminoácido hidrófilo puede ser un aminoácido que se produce de manera natural o un aminoácido que no se produce de manera natural. El aminoácido hidrófilo puede ser un α -aminoácido o un β -aminoácido. El aminoácido hidrófilo puede ser arginina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, histidina, lisina, ornitina, prolina, serina o treonina y puede ser un D-aminoácido o un L-aminoácido. En determinadas realizaciones preferidas, el aminoácido hidrófilo es aspartato o glutamato, tal como L-aspartato o L-glutamato. En otras realizaciones preferidas, el aminoácido hidrófilo es lisina u ornitina, tal como L-lisina o L-ornitina. En determinadas realizaciones, el aminoácido hidrófilo es arginina, tal como L-arginina. En determinadas realizaciones, el aminoácido hidrófilo comprende una cadena lateral que tiene un resto que porta una carga a pH neutro en disolución acuosa (por ejemplo, un resto amina, guanidina o carboxilo).

El péptido puede comprender aminoácidos que se producen de manera natural y/o aminoácidos que no se producen de manera natural. El péptido puede comprender α -aminoácidos y/o β -aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido consiste esencialmente en α -aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido consiste esencialmente en aminoácidos que se producen de manera natural. El péptido puede comprender, consistir esencialmente en o incluso consistir en aminoácidos seleccionados de alanina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, glicina, lisina, ornitina, prolina, serina y treonina, cualquiera de los cuales puede ser L-aminoácidos y/o D-aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido consiste esencialmente en L-aminoácidos. En determinadas realizaciones, el péptido no comprende un aminoácido hidrófobo, tal como un aminoácido seleccionado de isoleucina, metionina, leucina, fenilalanina, triptófano, tirosina o valina; en otras palabras, en tales realizaciones, el péptido está libre o está esencialmente libre de estos aminoácidos. En realizaciones preferidas, el péptido no comprende ninguno de isoleucina, metionina, leucina, fenilalanina, triptófano, tirosina y valina.

Un aminoácido hidrófilo puede unir de manera covalente una oxima de L y/o el ligante a una unidad de polietilenglicol de L y/o el ligante. Un péptido puede unir de manera covalente una oxima de L y/o el ligante a una unidad de polietilenglicol de L y/o el ligante.

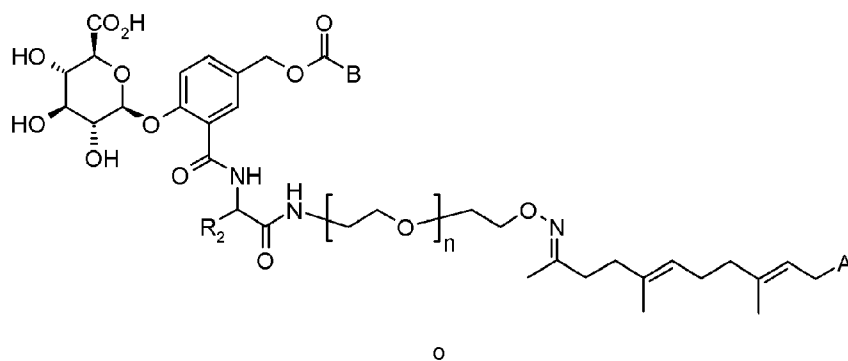
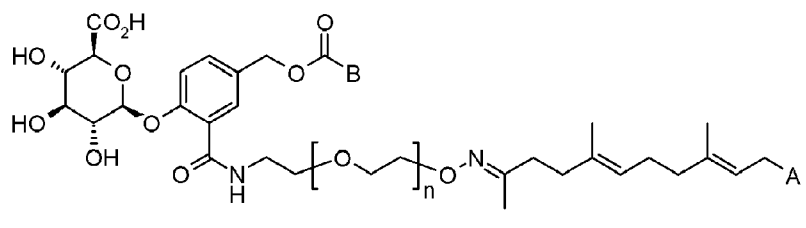
En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende la estructura:

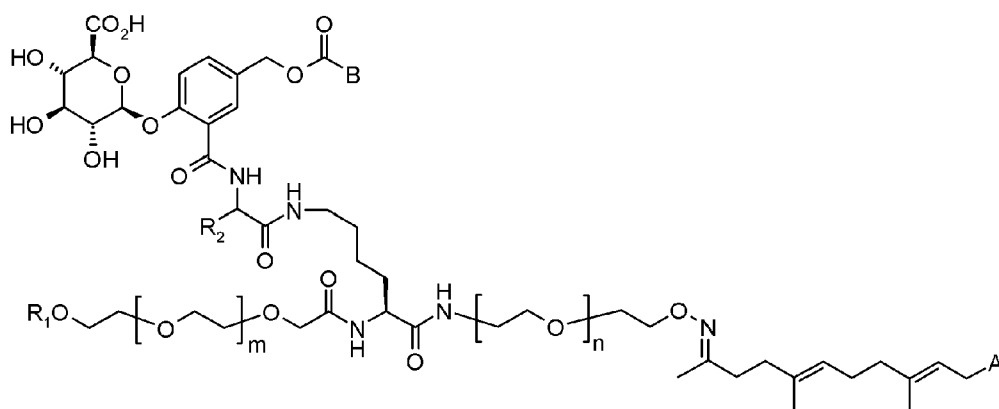




en las que A representa el anticuerpo, B representa el agente activo, m es un número entero desde 0 hasta 20 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10), n es un número entero desde 1 hasta 20 (preferiblemente desde 2 hasta 20, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16), R₁ es hidrógeno o un grupo metilo y R₂ es la cadena lateral de un aminoácido, preferiblemente un aminoácido hidrófilo, lo más preferiblemente aspartato o glutamato.

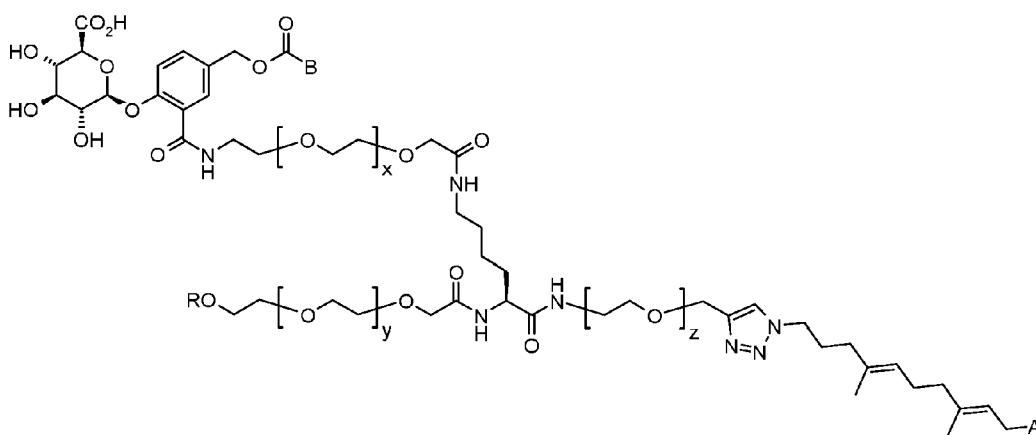
En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende la estructura:



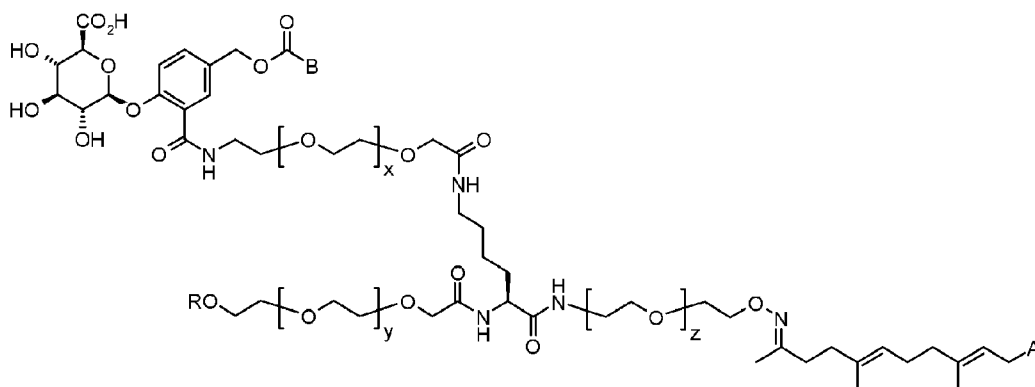


en las que A representa el anticuerpo, B representa el agente activo, m es un número entero desde 0 hasta 20 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10), n es un número entero desde 1 hasta 20 (preferiblemente desde 2 hasta 20, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16), R₁ es hidrógeno o un grupo metilo y R₂ es la cadena lateral de un aminoácido, preferiblemente un aminoácido hidrófilo, lo más preferiblemente aspartato o glutamato. En algunas realizaciones, n es un número entero desde 0 hasta 20, preferiblemente 0 o 2.

En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende la estructura:

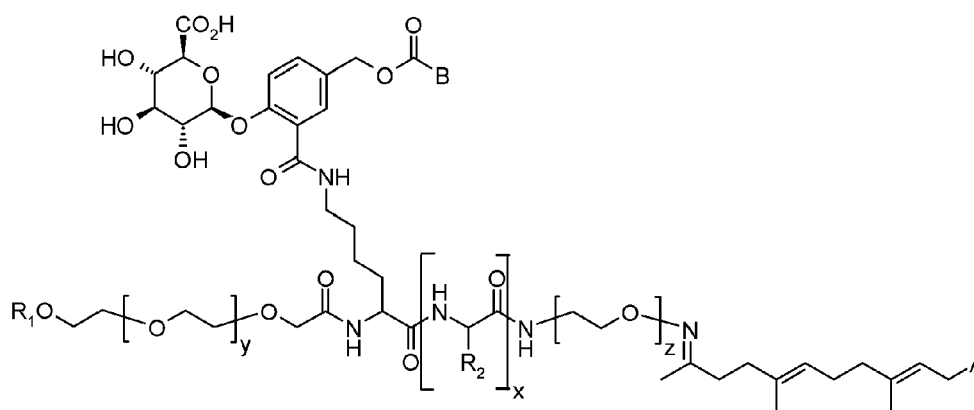
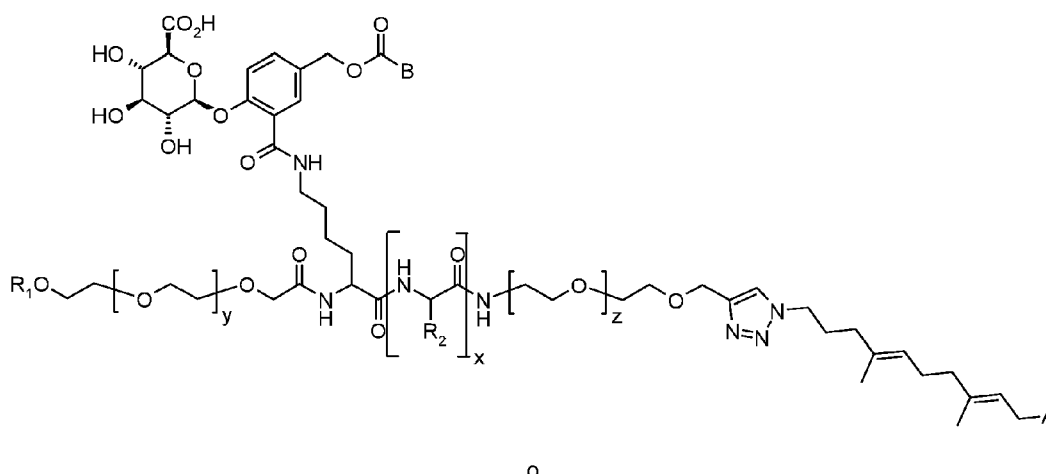


o



en las que A representa el anticuerpo, B representa el agente activo, x es un número entero desde 1 hasta 20 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10) y es un número entero desde 1 hasta 20 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10), z es un número entero desde 1 hasta 20 (preferiblemente de 2 a 20, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16) y R es hidrógeno o a metilo grupo. En algunas realizaciones, n es un número entero desde 0 hasta 20, preferiblemente 0 o 2.

En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco comprende la estructura:



en las que A representa el anticuerpo, B representa el agente activo, R_1 es hidrógeno o a metilo grupo, x es un número entero desde 0 hasta 20 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4 ó 5) y es un número entero desde 0 hasta 20 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10), z es un número entero desde 1 hasta 20 (preferiblemente de 2 a 20, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16) y cada R_2 se selecciona independientemente de una cadena lateral de aminoácido, preferiblemente una cadena lateral de aminoácido hidrófilo. Por ejemplo, en determinadas realizaciones preferidas, x es 1 y R_2 es la cadena lateral de aspartato o glutamato.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo comprende un resto de aminoácido que puede reconocerse mediante una isoprenoide transferasa. Por ejemplo, al menos un extremo C-terminal del anticuerpo puede comprender un resto de aminoácido que puede reconocerse mediante una isoprenoide transferasa (como sustrato, por ejemplo, antes de formar el conjugado anticuerpo-fármaco o como producto de una isoprenoide transferasa, por ejemplo, después de formar el conjugado anticuerpo-fármaco). El anticuerpo puede comprender además un espaciador, tal como un aminoácido o un tramo de aminoácidos que enlaza una cadena peptídica del anticuerpo al resto de aminoácido. El espaciador puede consistir en de 1 a 20 aminoácidos consecutivos, preferiblemente 7-20 aminoácidos. En algunas realizaciones, la glicina y prolina son aminoácidos preferidos para el espaciador y pueden usarse en cualquier combinación, tal como una serie de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 glicinas o una serie de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 glicinas. En otras realizaciones el resto de aminoácido se selecciona cada uno independientemente de glicina, ácido aspártico, arginina y serina. El anticuerpo puede comprender una adición o deleción en un extremo terminal carboxilo, por ejemplo, en relación con una forma del anticuerpo no incluida en un ADC.

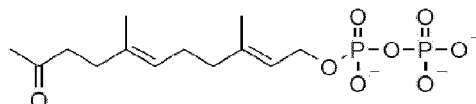
Los ejemplos de isoprenoide transferasas incluyen proteína farnesilo transferasa (FTasa) y geranilgeranilo transferasa (GGTasa), que pueden catalizar la transferencia de un grupo farnesilo o geranil-geranilo a al menos una cisteína C-terminal de una proteína diana. Una GGTasa puede clasificarse o bien como GGTasa I o bien como GGTasa II. La FTasa y GGTasa I puede reconocer un resto CAAX y la GGTasa II puede reconocer un resto XXCC, XCXC o CXX, en la que C representa cisteína, A representa un aminoácido alifático (por ejemplo, isoleucina, valina, metionina, leucina) y cada X representa independientemente, por ejemplo, glutamina, glutamato, serina, cisteína, metionina, alanina o leucina (véase Nature Rev. Cancer, 5(5):405-12 (2005); Nature Chemical Biology 17:498-506 (2010); Lane KT, Bees LS, J. Lipid Research, 47:681-699 (2006); Kasey PJ, Seabra MC, J. Biological Chemistry, 271(10):5289-5292 (1996)).

Los conjugados anticuerpo-fármaco según la presente divulgación pueden comprender un resto de aminoácido, tal como CYYX, XXCC, XCXC o CXX, preferiblemente CYYX (en la que, C representa cisteína y representa un aminoácido alifático, tal como leucina, isoleucina, valina y/o metionina y X representa un aminoácido que determina una especificidad de sustrato de la isoprenoide transferasa, tal como glutamina, glutamato, serina, cisteína, metionina, alanina y/o leucina).

Pueden usarse isoprenoide transferasas de diversas fuentes. Por ejemplo, la isoprenoide transferasa puede obtenerse de un humano, animal, planta, bacterias, virus u otra fuente. En algunas realizaciones, se usa una isoprenoide transferasa que se produce de manera natural. En algunas realizaciones, puede usarse una isoprenoide transferasa modificada de manera natural o modificada de manera artificial. Por ejemplo, la isoprenoide transferasa puede comprender una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácido y/o la isoprenoide transferasa puede modificarse mediante la adición de al menos uno de etiqueta de histidina, GST, GFP, MBP, CBP, Isopeptag, BCCP, etiqueta de Myc, etiqueta de calmodulina, etiqueta FLAG, etiqueta HA, etiqueta de proteína de unión a maltosa, etiqueta Nus, etiqueta de glutatión-S-transferasa, etiqueta de proteína fluorescente verde, etiqueta de tioredoxina, etiqueta S, Softag 1, Softag 3, etiqueta Strep, etiqueta SBP, etiqueta Ty y similares.

Las isoprenoide transferasas reconocen un isosustrato y/o un sustrato. El término isosustrato se refiere a un análogo de sustrato que comprende una modificación química. Las isoprenoide transferasas pueden alquilar un resto específico de aminoácido (por ejemplo, un resto CAAX) en el extremo C-terminal de un anticuerpo (véase, por ejemplo, Duckworth, BP *et al.*, ChemBioChem, 8:98 (2007); Uyen TT *et al.*, ChemBioChem, 8:408 (2007); Labadie, GR *et al.*, J. Org. Chem., 72(24):9291 (2007); Wollack, JW *et al.*, ChemBioChem, 10:2934 (2009)). Puede producirse un anticuerpo funcionalizado usando una isoprenoide transferasa y un isosustrato, que pueden alquilar una cisteína C-terminal.

El isosustrato puede ser, por ejemplo, el compuesto de fórmula IV.



(IV)

La cisteína de un resto CAAX C-terminal puede unirse a un isosustrato usando una isoprenoide transferasa. En algunas realizaciones, parte del resto, por ejemplo, AAX, puede retirarse posteriormente por una proteasa, por ejemplo, dejando sólo la cisteína a la que se une el isoprenoide. La cisteína puede metilarse opcionalmente en el extremo terminal de carboxilo, por ejemplo, mediante una enzima (véase, por ejemplo, Bell, IM, J. Med. Chem., 47(8): 1869 (2004)).

Los conjugados anticuerpo-fármaco de la divulgación pueden prepararse usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos de biología molecular y biología celular. Por ejemplo, pueden usarse métodos de transfección transitoria o estable. Las secuencias genéticas que codifican para un resto específico de aminoácido que puede reconocerse mediante una isoprenoide transferasa pueden insertarse en un vector plasmídico conocido usando tecnologías de ligamiento y/o PCR convencionales para expresar un anticuerpo que tiene el resto específico de aminoácido en un extremo C-terminal del mismo. Un anticuerpo que tiene al menos un resto de aminoácido capaz de reconocerlo la isoprenoide transferasa puede, por tanto, expresarse en un huésped adecuado, por ejemplo, una célula CHO o en *E. coli*.

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una molécula diferente a través del al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de una región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv), mutantes de Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multispecíficos tales como anticuerpos bispecíficos generados a partir de dos o más anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que incluye una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo y cualquier otra molécula modificada de inmunoglobulina que incluye un sitio de reconocimiento de antígeno. El anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada, referidos como alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. El término "anticuerpo" no se refiere a moléculas que no comparten homología con una secuencia de inmunoglobulina. Por ejemplo, el término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento no incluye estructuras proteicas con secuencias de aminoácidos repetidas.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a regiones

variables de determinación antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpo homogénea implicada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de un único determinante antigénico o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra una variedad de determinantes antigénicos diferentes. El término "anticuerpo monoclonal" incluye fragmentos de anticuerpo (tales Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFV), proteínas de fusión que incluyen una porción de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que incluye un sitio de reconocimiento de antígeno, así como anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa, pero sin limitarse a ellos. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos elaborados mediante cualquier número de métodos, incluyendo pero sin limitarse a hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulinas específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, murinas). En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante complementaria (CDR) se sustituyen por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo y hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)). En algunos casos, los residuos de la región de entramado Fv (FR) de una inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene una especificidad, afinidad y/o capacidad de unión deseada. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales en la región de entramado Fv y/o dentro de los residuos no humanos sustituidos para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad de unión del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado incluye sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones de entramado (FR) tienen las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede incluir al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en la patente estadounidense n.º 5.225.539.

El término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo codificado por una secuencia de nucleótido humana o a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un humano usando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos de longitud completa y/o fragmentos de los mismos.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una secuencia de aminoácidos de una molécula de inmunoglobulina deriva de dos o más especies, una de las cuales es preferiblemente humana. En general, las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas corresponden a regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra especie (normalmente humana), por ejemplo, para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.

Los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a la porción de un antígeno capaz de ser reconocida y unida específicamente por un anticuerpo concreto. Cuando el antígeno es o comprende un polipéptido o proteína, los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos y/o no contiguos, por ejemplo, yuxtapuestos por plegamiento secundario, terciario y/o cuaternario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan tras la desnaturalización de la proteína, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario pueden perderse tras la desnaturalización de la proteína. Un epítipo normalmente incluye 3 o más, 5 o más, o de 8 a 10 o más aminoácidos en una conformación espacial única.

Un anticuerpo se "une específicamente" a un epítipo o molécula antigénica, lo que significa que el anticuerpo interactúa o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad o con alguna combinación de lo anterior a un epítipo o molécula antigénica que otras sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. En realizaciones específicas, "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con una K_D de aproximadamente 0,1 mM o menos, pero más habitualmente, menos de aproximadamente 1 μM. En realizaciones específicas, "se une específicamente" significa que un anticuerpo se une a una proteína en ocasiones con una K_D de aproximadamente 0,1 μM o menos, y en otras ocasiones, con una K_D de aproximadamente 0,01 μM o menos. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconozca una proteína particular en más de una especie. Se entiende que un anticuerpo o residuo de unión que se une específicamente a una primera diana puede o no unirse específicamente a una segunda diana. Tal como se describió anteriormente, la

“unión específica” no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva, es decir, la unión a una única diana. En general, pero no necesariamente, el término unión usado en el presente documento significa unión específica.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos/derivados de los mismos y anticuerpos monoclonales, pueden obtenerse usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554 (1990); Clackson *et al.*, Nature 352:624-628; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Waterhouse *et al.*, Nucleic Acids Res. 21:2265-2266 (1993); Morimoto *et al.*, J Biochemical & Biophysical Methods 24:107-117 (1992); Brennan *et al.*, Science 229:81(1985); Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992); Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975); Kilpatrick *et al.*, Hybridoma 16(4):381-389 (1997); Wring *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal. 19(5):695-707 (1999); Bynum *et al.*, Hybridoma 18(5):407-411 (1999); Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year Immuno. 7:33 (1993); Barbas *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, Gene 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992), las patentes estadounidenses n.ºs 4.816.567, 5.514.548, 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669, 5.545.807; publicación de solicitud de patente PCT n.º WO 97/17852).

El anticuerpo puede ser muromonab-CD3 abciximab, rituximab, daclizumab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, etanercept, basiliximab, gemtuzumab, alemtuzumab, ibritumomab, adalimumab, alefacept omalizumab, efalizumab, tositumomab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, eculizumab, rilonacept, certolizumab, romiplostim, AMG-531, golimumab, ustekinumab, ABT-874, belatacept, belimumab, atacicept, un anticuerpo anti-CD20, canakinumab, tocilizumab, atlizumab, mepolizumab, pertuzumab, HuMax CD20, tremelimumab, ticilimumab, ipilimumab, IDEC-114, inotuzumab, aflibercept, HuMax-CD4, teplizumab, orelizumab, catumaxomab, el anticuerpo anti-EpCAM IGN101, adecatumomab, oregovomab, dinutuximab, girentuximab, denosumab, bapineuzumab, motavizumab, efumgumab, raxibacumab, un anticuerpo anti-CD20, LY2469298 o veltuzumab.

En determinadas realizaciones preferidas, el anticuerpo no se une específicamente a CD19 o EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). En otras realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD19 o EGFR.

Cuando el anticuerpo comprende al menos una cadena ligera y al menos una cadena pesada, al menos una cadena ligera del anticuerpo, o al menos una cadena pesada del anticuerpo, o ambas pueden comprender una región de aminoácidos que tenga un resto de aminoácidos que puede reconocerse mediante una isoprenoide transferasa. Como un anticuerpo puede comprender cuatro cadenas polipeptídicas (por ejemplo, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), un anticuerpo puede comprender cuatro restos de aminoácidos, cada uno de los cuales puede usarse para conjugar un agente activo con el anticuerpo a través de un ligante. Por tanto, un conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender 4 ligantes, cada uno conjugado con un agente activo, por ejemplo, cada uno conjugado con el extremo C-terminal de una cadena diferente del anticuerpo. Por consiguiente, un conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender al menos un ligante y al menos un agente activo. Un conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender al menos dos ligantes, y un conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender al menos dos agentes activos. Un conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender 1, 2, 3 ó 4 ligantes. Un conjugado anticuerpo-fármaco puede comprender 1, 2, 3 ó 4 agentes activos. En un conjugado anticuerpo-fármaco que incluye 2 o más agentes activos, los agentes activos pueden ser todos iguales, pueden ser todos diferentes, o pueden estar presentes en cualquier mezcla o razón.

El agente activo puede ser un fármaco, una toxina, un ligando de afinidad, una sonda de detección o una combinación de cualquiera de los anteriores.

El agente activo puede seleccionarse entre erlotinib; bortezomib; fulvestrant; sunitinib; letrozol; mesilato de imatinib; PTK787/ZK 222584; oxaliplatino; 5-fluorouracilo; leucovorina; rapamicina (sirolimus); lapatinib; lonafarnib; sorafenib; gefitinib; AG1478; AG1571; agentes alquilantes (por ejemplo, tiotepa o ciclofosfamida); sulfonato de alquilo (por ejemplo, busulfán, improsulfán o piposulfán); aziridina (por ejemplo, benzodopa, carbocuna, meturedopa, o uredopa); etilenimina, metilmelamina, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida, trimetilolmelamina; acetogeninas (por ejemplo, bullatacina o bullatacinona); camptotecina; un derivado o metabolito de la camptotecina (por ejemplo, SN-38); topotecán; briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina o bizelesina); criptoficinas (por ejemplo, criptoficina 1 o criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo sus análogos sintéticos, por ejemplo, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongistatina; mostaza nitrogenada (por ejemplo, clorambucilo, cloronafazina, clorofosfamidina, estramustina, ifosfamidina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamidina o mostaza uracilo); nitrosourea (por ejemplo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina o ranimustina); antibióticos (por ejemplo, antibióticos de enedina tales como calicheamicina seleccionada de calicheamicina gamma 1I y calicheamicina omega 1I, o dinemicina, incluyendo la dinemicina A); bifosfonato (por ejemplo, clodronato; esperamicina, cromóforo neocarzinostatina, o cromóforos antibióticos relacionados enediina, aclacinomisinina, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carninomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (por ejemplo, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina liposomal o deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, marcelomicina,

mitomicinas (por ejemplo, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptomigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina o zorrubicina); antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo); análogos del ácido fólico (por ejemplo, denopterina, metotrexato, pteropterina o trimetrexato); análogos de las purinas (por ejemplo, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina o tiuanina); análogos de las pirimidinas (por ejemplo, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina o floxuridina); andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano) o testolactona; antiadrenales (por ejemplo, aminoglutetimida, mitotano o trilostano); reponedores de ácido fólico (por ejemplo, ácido folínico); aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides (por ejemplo, maitansina o ansamitocinas); tricotecenos (en particular, toxina T-2, verracurina A, roridina A o anguidina); mitoguanona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido K; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-trichlorotrietilamina; tricotecenos (en particular, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido; ciclofosfamida; tiotepa; taxoides (por ejemplo, paclitaxel), formulación de nanopartículas de paclitaxel modificadas por ingeniería con albúmina ABRAXANE™, doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogo del platino (por ejemplo, cisplatino o carboplatino); vinblastina; platino; etopósido; ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa (RFS 2000); difluorometilornitina; retinoide (por ejemplo, ácido retinoico); capecitabina, y sales, solvatos, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, pero sin limitarse necesariamente a ellos.

El agente activo puede seleccionarse de (i) agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno; (ii) inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, letrozol y anastrozol (iii) antiandrógenos tales como la flutamida, la nilutamida, la bicalutamida, la leuprolida y la goserelina; así como la troxacitabina (un nucleósido de 1,3-dioxolano análogo de la citosina); (iv) inhibidores de la aromatasa; (v) inhibidores de la proteína cinasa; (vi) inhibidores de la lípido cinasa; (vii) oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en células adherentes, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras; (viii) ribozima, por ejemplo, inhibidor de VEGF tal como ribozima e inhibidores de la expresión de HER2; (ix) vacunas tales como una vacuna de terapia génica; vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN, vacuna VAXID; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1LURTOTECAN®, ABARELIX® rmRH; (x) un agente antiangiogénico, tal como bevacizumab; y (xi) sales, solvatos, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Además, pueden usarse citocinas como agente activo. Las citocinas son pequeñas moléculas proteicas de señalización celular que segregan numerosas células y constituyen una categoría de moléculas de señalización extensamente usadas en la comunicación intercelular. Las citocinas incluyen monocinas, linfocinas, hormonas polipeptídicas tradicionales y similares. Los ejemplos de citocinas incluyen hormona del crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo o hormona del crecimiento bovino); hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormona glicoproteica (por ejemplo, hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) u hormona luteinizante (LH)); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β ; hormona antimülleriana; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina, trombopoyetina (TPO); factor de crecimiento nervioso (por ejemplo, NGF- β); factor de crecimiento plaquetario; factor de crecimiento transformante (TGF) (por ejemplo, TGF- α o TGF- β); factor de crecimiento similar a la insulina-I, factor de crecimiento similar a la insulina-II; eritropoyetina (EPO); factor osteoinductor; interferón (por ejemplo, interferón- α , interferón- β o interferón- γ); factor estimulante de colonias (CSF) (por ejemplo, macrófago-CSF (M-CSF), granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF) o granulocito-CSF (G-CSF)); interleucina (IL) (por ejemplo, IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 o IL-12); factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, TNF- α o TNF- β); y factor polipeptídico (por ejemplo, LIF o ligando en kit), pero sin limitarse a los mismos. Además, el término "citocina" también incluye citocinas de fuentes naturales o cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

El término "toxina" se refiere a sustancias venenosas para las células u organismos vivos. Las toxinas pueden ser pequeñas moléculas, péptidos o proteínas capaces de provocar disfunción o muerte celular tras entrar en contacto o ser absorbidas por el tejido corporal, por ejemplo, a través de una interacción con una o más macromoléculas biológicas tales como enzimas o receptores celulares. Las toxinas incluyen toxinas vegetales y toxinas animales. Los ejemplos de toxinas animales incluyen toxina diftérica, toxina botulínica, toxina tetánica, toxina de la disentería, toxina del cólera, tetrodotoxina, brevetoxina y ciguatoxina, pero sin limitarse a las mismas. Los ejemplos de toxinas vegetales incluyen ricina y toxina AM, pero sin limitarse a las mismas.

Los ejemplos de toxinas de moléculas pequeñas incluyen auristatina, tubulisina, geldanamicina (Kerr *et al.*, 1997, Bioconjugate Chem. 8(6):781-784), maitansinoide (documento EP 1391213, ACR 2008, 41, 98-107), calicheamicina (publicación de patente estadounidense n.º 2009/0105461, Cancer Res. 1993, 53, 3336-3342), daunomicina, doxorubicina, metotrexato, vindesina, SG2285 (Cancer Res. 2010, 70(17), 6849-6858), dolastatina, análogos de dolastatina, auristatina (patente estadounidense n.º 5.635.483), criptofecina, camptotecina, un derivado o metabolito de la camptotecina, (por ejemplo, SN-38), derivado de rizoxina, análogo o derivado de CC-1065, duocarmicina, antibiótico de enedina, esperamicina, epotilona, derivados de pirrolobenzodiazepina (PBD), amanitina, derivados de amanitina, α -amanitina, aplidina, azonafida y toxoide, pero sin limitarse a los mismos. Las toxinas pueden presentar citotoxicidad y actividad inhibidora del crecimiento celular mediante la unión a la tubulina, la unión al ADN, la supresión de la topoisomerasa y similares.

“Resto detectable” o “etiqueta” se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, radiactivos o químicos. Por ejemplo, las etiquetas útiles incluyen ^{32}P , ^{35}S , colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, enzimas comúnmente usadas en un ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para las que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales, o moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. El resto detectable a menudo genera una señal medible, tal como una señal radiactiva, cromogénica o fluorescente, que puede usarse para cuantificar la cantidad de resto detectable unida en una muestra. La cuantificación de la señal puede lograrse, por ejemplo, mediante recuento por centelleo, densitometría, citometría de flujo, ELISA o análisis directo por espectrometría de masas de péptidos intactos o digeridos posteriormente (pueden evaluarse uno o más péptidos).

El término “sonda” usado en el presente documento se refiere a un material que puede (i) proporcionar una señal detectable, (ii) interactuar con una primera sonda o una segunda sonda para modificar una señal detectable proporcionada por la primera o segunda sonda, tal como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), (iii) estabilizar una interacción con un antígeno o un ligando o aumentar la afinidad de unión; (iv) afectar a la movilidad por electroforesis o a la actividad de intrusión celular mediante un parámetro físico tal como la carga, la hidrofobia, etc., o (v) controlar la afinidad del ligando, la unión antígeno-anticuerpo o la formación de complejos iónicos.

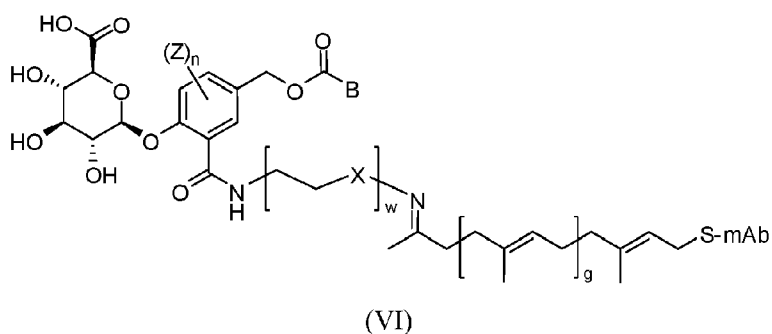
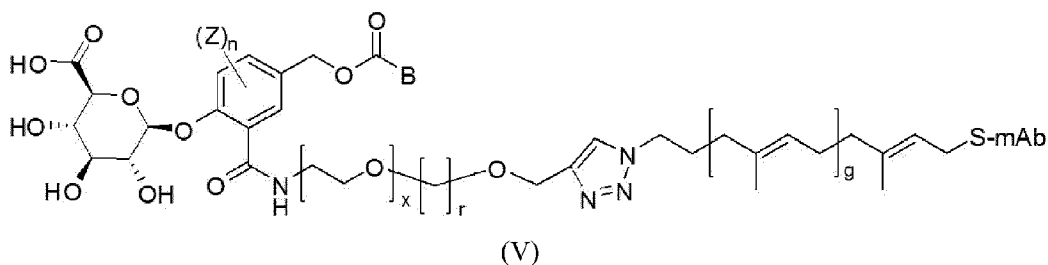
El agente activo puede ser un compuesto inmunomodulador, un agente anticancerígeno, un agente antiviral, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiparasitario o una combinación de los mismos.

Un compuesto inmunomodulador puede seleccionarse de ácido aminocaproico, azatioprina, bromocriptina, clorambucilo, cloroquina, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, danazol, dehidroepiandrosterona, dexametasona, etanercept, hidrocortisona, hidroxilcloroquina, infliximab, meloxicam, metotrexato, micofenilato mofetil, prednisona, sirolimus y tacrolimus. Un agente antineoplásico puede seleccionarse de ion 1-metil-4-fenilpiridinio, 5-etil-1-beta-D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (EICAR), 5-fluorouracilo, 9-aminocamptotecina, actinomicina D, asparaginasa, bicalutamida, bis-cloroetilnitrosourea (BCNU), bleomicina, bleomicina A2, bleomicina B2, busulfán, camptotecina, un derivado o metabolito de la camptotecina, por ejemplo, SN-38, carboplatino, carmustina, CB1093, clorambucilo, cisplatino, crisnatol, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citosina, citoxano, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, decarbazina, deferoxamina, demetoxi-hipocrelina A, docetaxel, doxiluridina, doxorubicina, EB1089, epirubicina, etopósido, floxurridina, fludarrabina, flutamida, gemcitabina, goserelina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, interferón- α , interferón- γ , irinotecán, KH1060, acetato de leuprolida, lomustina, lovastatina, megestrol, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitomicina C, mitoxantrona, ácido micofenólico, mostaza nitrogenada, nitrosourea, paclitaxel, peplomicina, fotosensibilizador Pe4, ftalocianina, pirarubicina, plicamicina, procarbazona, raloxifeno, raltitrexed, revlimid, ribavirina, estaurosporina, tamoxifeno, tenipósido, talomid, taspargina, tioguanina, tiazofurina, topotecán, treosulfán, trimetrexato, factor de necrosis tumoral, velcade, verapamilo, verteporfina, vinblastina, vincristina, vinorelbina y zorrubicina. Un agente antiviral puede seleccionarse de penciclovir, valaciclovir, ganciclovir, foscarnet, ribavirina, idoxuridina, vidarabina, trifluridina, aciclovir, famciclovir, amantadina, rimantadina, cidofovir, oligonucleótido antisentido, inmunoglobulina e interferón. Un agente antibacteriano puede seleccionarse de cloranfenicol, vancomicina, metronidazol, trimetoprima, sulfametozol, quinupristina, dalfopristina, rifampicina, espectinomicina y nitrofurantoína. El agente antifúngico puede seleccionarse de anfotericina B, candicidina, filipina, hamicina, natamicina, nistatina, rimocidina, bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, isconazol, ketoconazol, luliconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, albaconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol, terconazol, voriconazol, abafungina, amorolfina, butenafina, naftifina, terbinafina, anidulafungina, caspofungina, micafungina, ácido benzoico, ciclopirox, flucitosina, griseofulvina, haloprogina, tolnaftato, ácido undecilénico, violeta cristal, bálsamo de Perú, ciclopirox olamina, piroctona olamina, piritiona de zinc y sulfuro de selenio. Un agente antiparasitario puede seleccionarse de mebendazol, pamoato de pirantel, tiabendazol, dietilcarbamazina, ivermectina, niclosamida, praziquantel, albendazol, rifampicina, anfotericina B, melarsoprol, eflornitina, metronidazol, tinidazol y miltefosina.

El anticuerpo puede comprender un resto de aminoácido seleccionado de Ab-HC-(G)_zCVIM, Ab-HC-(G)_zCVLL, Ab-LC-(G)_zCVIM y Ab-LC-(G)_zCVLL, Ab-HC-(G)_zCVIM/LC-(G)_zCVIM, Ab-HC-(G)_zCVLL/LC-(G)_zCVIM, Ab-HC-(G)_zCVIM/LC-(G)_zCVLL y Ab-HC-(G)_zCVLL/LC-(G)_zCVLL, en las que Ab representa un anticuerpo, -HC- representa

una cadena pesada, -LC- representa una cadena ligera, G representa una glicina, C representa cisteína, V representa valina, I representa isoleucina, M representa metionina, L representa leucina, y z es un número entero desde 0 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 10.

5 Un conjugado anticuerpo-fármaco puede tener la estructura de fórmula (V) o (VI).



Z es hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), halógeno, ciano o nitro, preferiblemente hidrógeno;

X es -O-, alquileo (C₁-C₈) o -NR₂₁-, preferiblemente -O-;

R₂₁ es hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquil (C₁-C₆)arilo (C₆-C₂₀) o alquil (C₁-C₆)heteroarilo (C₃-C₂₀);

n es un número entero desde 1 hasta 3, preferiblemente 3 y cuando n es un número entero desde 2 o más, cada de una de las Z son iguales o diferentes entre sí, preferiblemente iguales;

r es un número entero desde 1 hasta 10, preferiblemente 3;

w es un número entero desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 2-10, lo más preferiblemente 3;

x es un número entero desde 0 hasta 10, preferiblemente 0;

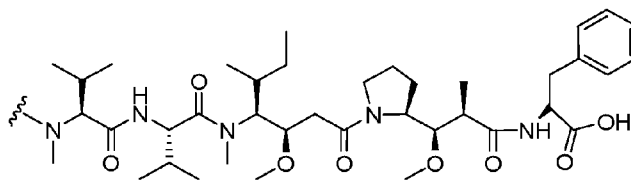
q es un número entero desde 1 hasta 10, preferiblemente 1 ó 2, lo más preferiblemente 1;

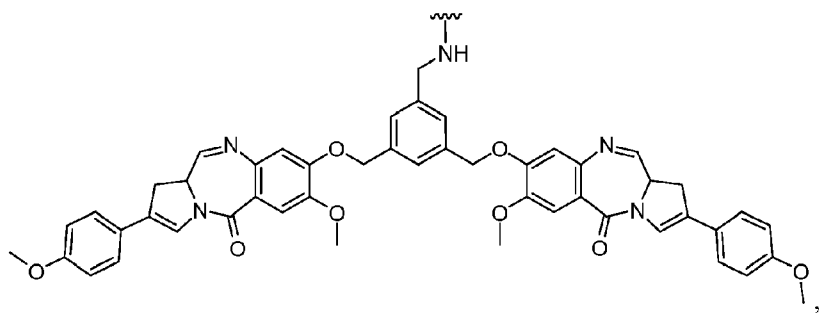
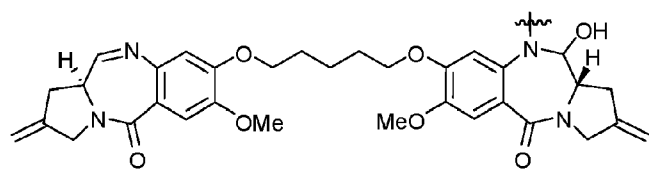
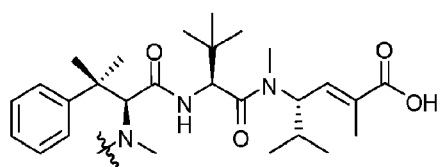
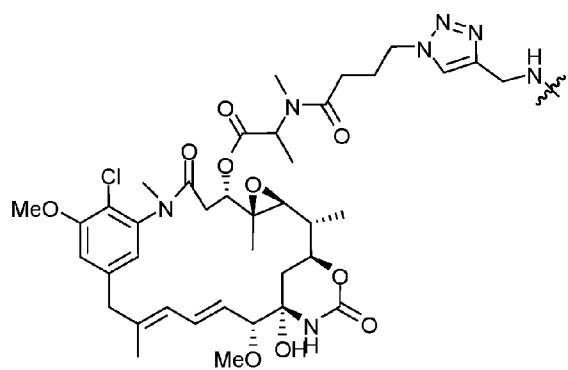
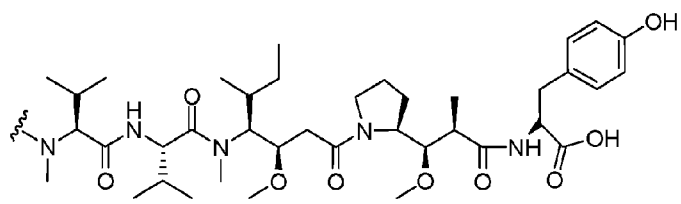
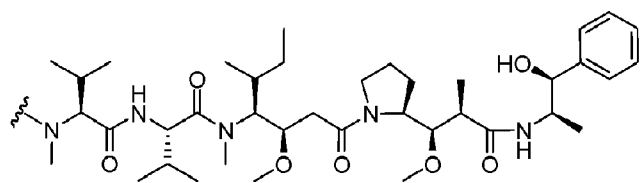
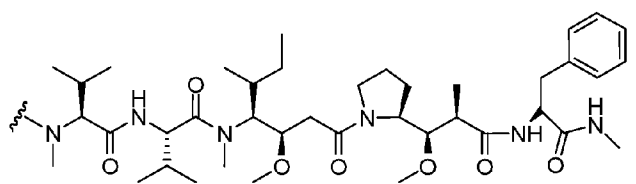
-S-mAb es el anticuerpo; y

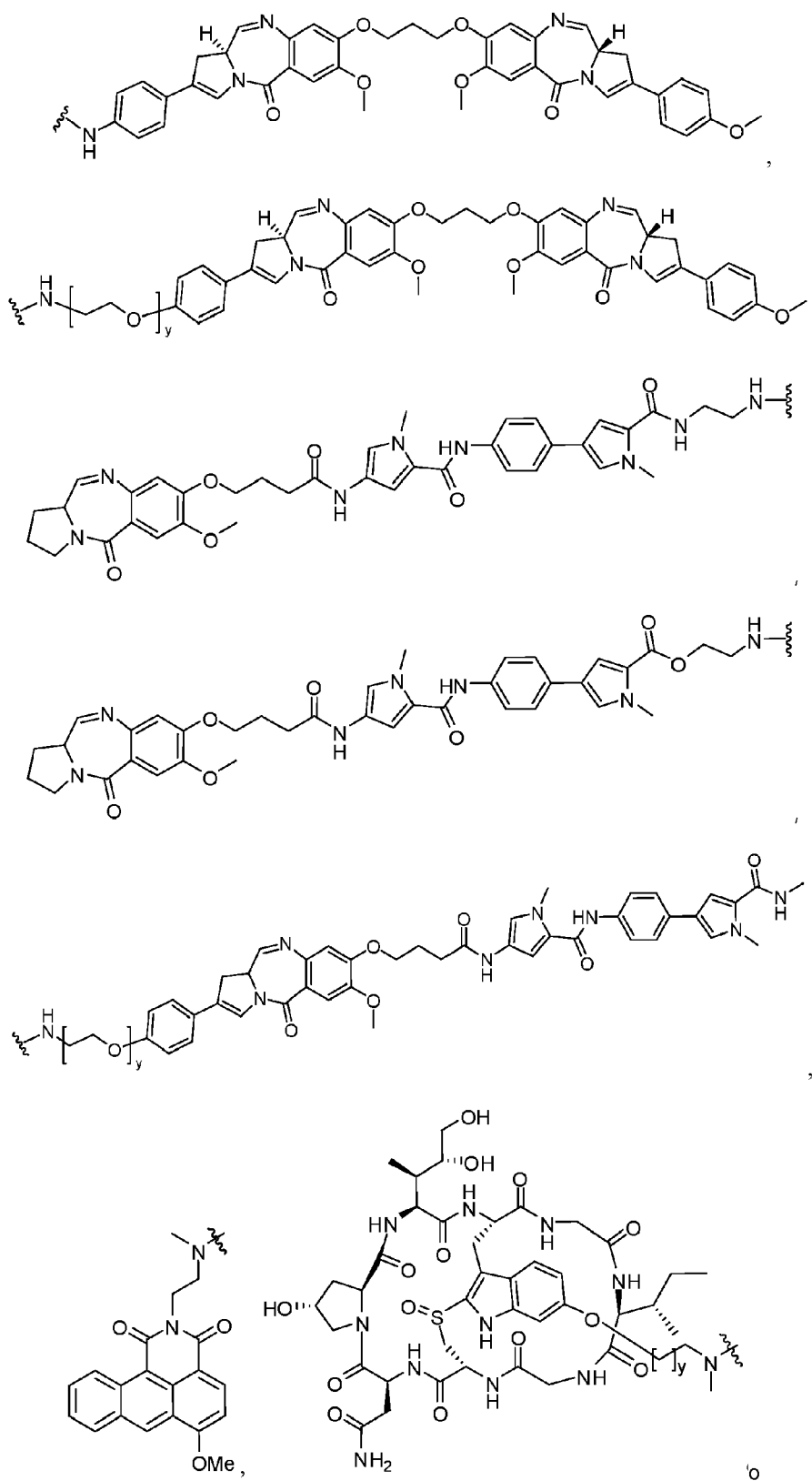
B es el agente activo.

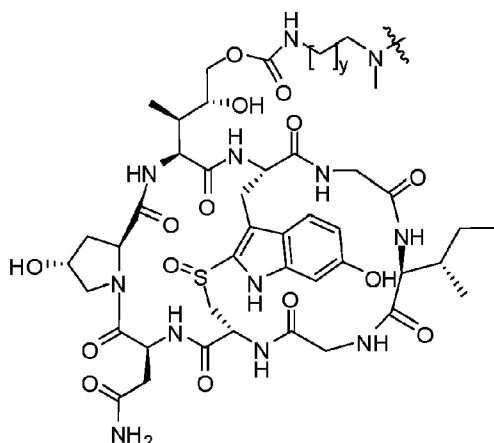
En algunas realizaciones, w es un número entero desde 11 hasta 20, tal como 11, 12, 13, 14, 15 ó 16.

En algunas realizaciones, B se selecciona de una cualquiera de las siguientes estructuras:









en las que y es un número entero desde 1 hasta 10.

- 5 El conjugado anticuerpo-fármaco puede usarse para transferir el agente activo a una célula diana de un sujeto para tratar al sujeto usando un método de preparación de una composición conocido por los expertos en la técnica. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un conjugado anticuerpo-fármaco tal como se describe en el presente documento.
- 10 Las composiciones pueden prepararse en forma inyectable, o bien como disolución líquida o bien como suspensión. También pueden prepararse formas sólidas inyectables, por ejemplo, como emulsiones, o con el conjugado anticuerpo-fármaco encapsulado en liposomas. Los conjugados anticuerpo-fármaco pueden combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable, que incluye cualquier portador que no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el sujeto que recibe el portador. Los portadores adecuados comprenden normalmente
- 15 macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente, por ejemplo, proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos y similares.

Las composiciones también pueden contener diluyentes, por ejemplo, agua, solución salina, glicerol y etanol. También pueden contener sustancias auxiliares, por ejemplo, agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras del pH y similares. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral por inyección, en las que tal inyección puede ser o bien subcutánea o bien intramuscular. En algunas realizaciones, puede administrarse una composición en un tumor. La composición puede insertarse (por ejemplo, inyectarse) en un tumor. Formulaciones adicionales son adecuadas para otras formas de administración, tales como supositorios o administración oral. Las composiciones orales pueden administrarse como disolución, suspensión, comprimido,

25 pastilla, cápsula o formulación de liberación sostenida.

Las composiciones pueden administrarse de manera compatible con una dosis y una formulación. La composición comprende preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una dosis única o una composición administrada en una pauta posológica

30 múltiples que sea eficaz para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno. Una dosis puede variar, dependiendo del sujeto que va a tratarse, de las condiciones físicas y de salud del sujeto, del grado de protección que se desee y de otros factores relevantes. La cantidad exacta de un principio activo (por ejemplo, el conjugado anticuerpo-fármaco) puede depender del criterio de un médico. Por ejemplo, puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco o de la composición que lo contenga a un paciente que

35 padezca un cáncer o un tumor para tratar el cáncer o el tumor.

El conjugado anticuerpo-fármaco según la presente divulgación o la composición que lo contiene puede administrarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo. En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco según la presente divulgación o la composición que lo contiene puede

40 administrarse con un portador farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable. La cantidad eficaz y el tipo de sal o solvato, excipiente y aditivo farmacéuticamente aceptables pueden medirse usando métodos convencionales (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18ª edición, 1990).

45 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" con respecto al cáncer o al tumor significa una cantidad que puede disminuir el número de células cancerosas; disminuir el tamaño de las células cancerosas; inhibir la intrusión de las células cancerosas en sistemas periféricos o disminuir la intrusión; inhibir la propagación de las células cancerosas a otros sistemas o disminuir la propagación; inhibir el crecimiento de las células cancerosas; y/o mejorar al menos un síntoma relacionado con el cáncer. En el tratamiento del cáncer, la eficacia de un fármaco puede evaluarse por el

50 tiempo hasta la progresión tumoral (TTP) y/o la tasa de respuesta (RR).

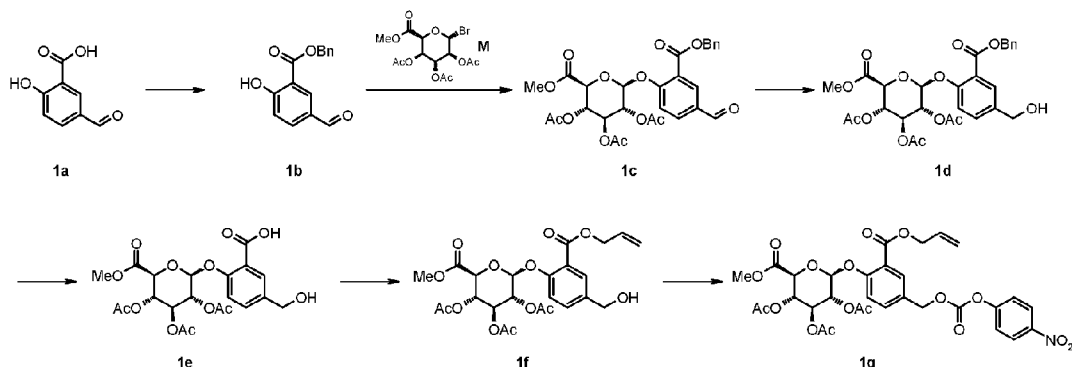
- El término "sales farmacéuticamente aceptables" usado en el presente documento incluye sales orgánicas y sales inorgánicas. Los ejemplos de las mismas incluyen clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantonato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucoronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, sulfonato de metano, sulfonato de etano, sulfonato de benceno, sulfonato de p-tolueno y pamoato (es decir, 1,1'-metilenobis-(2-hidroxi-3-naftoato)). La sal farmacéuticamente aceptable puede incluir otra molécula (por ejemplo, iones acetato, iones succinato y/u otros contraiones).
- Los solvatos a modo de ejemplo que pueden usarse para solvatos farmacéuticamente aceptables de los conjugados anticuerpo-fármaco descritos en el presente documento incluyen agua, isopropanol, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.
- Tal como se usa en el presente documento, una opción terapéutica que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con la muestra de control no tratada.
- El término "tratar" incluye tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. El término tratamiento "profiláctico o terapéutico" está reconocido en la técnica e incluye la administración al huésped de una o más de las composiciones objeto. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped), el tratamiento es profiláctico (es decir, protege al huésped contra el desarrollo de la afección no deseada), mientras que si se administra después de la manifestación de la afección no deseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, está destinado a disminuir, mejorar o estabilizar la afección no deseada existente o los efectos secundarios de la misma).
- En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un conjugado anticuerpo-fármaco tal como se describe en el presente documento. En realizaciones preferidas, el sujeto es un mamífero. Por ejemplo, el sujeto puede seleccionarse de roedores, lagomorfos, felinos, caninos, porcinos, ovinos, bovinos, equinos y primates. En determinadas realizaciones preferidas, el sujeto es un humano.
- A continuación en el presente documento, las configuraciones de la presente invención se describirán en detalle a través de los ejemplos, pero los siguientes ejemplos son sólo para ayudar a la comprensión de la presente invención. El alcance de la presente invención no está limitado a los mismos. Además, a menos que se describa específicamente lo contrario, el reactivo, el disolvente y el material de partida descritos en la memoria descriptiva pueden obtenerse fácilmente de un proveedor comercial.

Ejemplos

La tabla a continuación enumera las abreviaturas usadas en la totalidad de los siguientes ejemplos:

Abreviatura	Referencia
Ac	acetilo
AcOH	ácido acético
ac.	acuoso
Bn	bencilo
salmuera	disolución de cloruro de sodio acuosa saturada
Boc	<i>t</i> -butoxicarbonilo
Cbz	benciloxicarbonilo
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
Et	etilo
Et ₂ O	dietil éter
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
HBTU	hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
Hex	n-hexano
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento
Me	metilo
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
MMAE	auristatina de monometilo E
MMAF	auristatina de monometilo F
MMAF-OMe	éster metílico de auristatina de monometilo F
<i>i</i> -PrOH	isopropanol
PyBOP	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio
TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
TBS	<i>t</i> -butildimetilsililo
THF	tetrahidrofurano
TFA	ácido trifluoroacético
Ts	<i>p</i> -toluenosulfonilo
p	peso

Ejemplo 1. Preparación del compuesto 1i



5 Preparación del compuesto 1b

A una suspensión de ácido 5-formilsalicílico 1a (10,0 g, 60,1 mmol) en THF (30 ml) se le añadió DIPEA (29,8 ml, 180 mmol) y bromuro de bencilo (7,15 ml, 60,1 mmol) a temperatura ambiente. Luego se calentó la mezcla de reacción a reflujo. Después de 18 horas a reflujo, se diluyó la mezcla de reacción con HCl ac. 2 N (100 ml). Se extrajo la mezcla resultante con EtOAc (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 1b (12,9 g, 83 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 11,38 (s, 1H), 9,86 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,01 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,44 (m, 5H), 7,12 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H).

15 Preparación del compuesto 1c

A una disolución del compuesto 1b (5,0 g, 19,5 mmol) y compuesto M (8,5 g, 21,4 mmol, véase el ejemplo 66) en MeCN (100 ml) se le añadieron tamiz molecular de 4 Å (10 g) y Ag₂O (18,0 g, 78,0 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 horas bajo N₂, se concentró la mezcla de reacción. Luego se diluyó la mezcla de reacción concentrada con H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 1c (8,63 g, 77 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,94 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,02 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,46-7,28 (m, 6H), 5,41-5,32 (m, 6H), 4,27 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 3,71 (s, 3H), 2,05 (m, 9H).

25 Preparación del compuesto 1d

A una disolución del compuesto 1c (3,10 g, 5,41 mmol) en *i*-PrOH/CHCl₃ (9 ml/45 ml) se le añadió gel de sílice (3 g) y NaBH₄ (0,41 g, 10,82 mmol) a 0 °C. Después de agitar a 0 °C durante 2 horas bajo N₂, se extinguió la mezcla de reacción con H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (200 ml). Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 1d (2,73 g, 87 %) como un sólido de color blanco. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (s, 1H), 7,48-7,34 (m, 6H), 7,16 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,35-5,26 (m, 5H), 5,15 (m, 1H), 4,17 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,04 (s, 9H), 1,73 (t, 1H).

Preparación del compuesto 1e

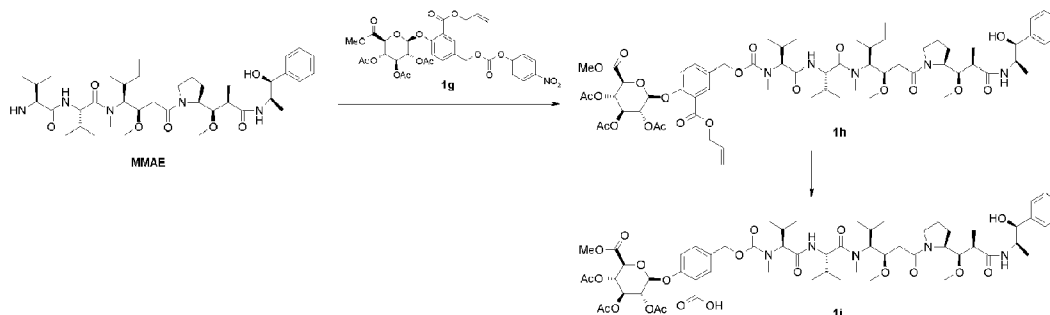
A una disolución del compuesto 1d (2,40 g, 4,17 mmol) en EtOH (150 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 240 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos bajo hidrógeno. Luego se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con EtOH (100 ml). Se concentró el filtrado para proporcionar el producto en bruto 1e como un sólido de color blanco (2,10 g), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,06 (s, 1H), 7,61 (dd, J = 8,8 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,43-5,29 (m, 5H), 4,17 (s, 2H), 4,32 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,11-2,08 (t, 9H), 1,24 (t, 1H).

Preparación del compuesto 1f

A una disolución del compuesto en bruto 1e (2,10 g, 4,33 mmol) en DMF (50 ml) se le añadieron K₂CO₃ (1,79 g, 13,01 mmol) y bromuro de alilo (0,41 ml, 4,76 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, se diluyó la mezcla de reacción con HCl ac. 2 N (100 ml). Se extrajo la mezcla resultante con EtOAc (200 ml). Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 1f (1,55 g, 70 % para 2 etapas). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (s, 1H), 7,45 (dd, J = 8,0 Hz, 2,0 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,02 (m, 1H), 5,40-5,26 (m, 5H), 5,16 (m, 1H), 4,76 (m, 2H), 4,66 (s, 2H), 4,19 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,07-2,05 (m, 9H), 1,68 (t, 1H).

Preparación del compuesto 1g

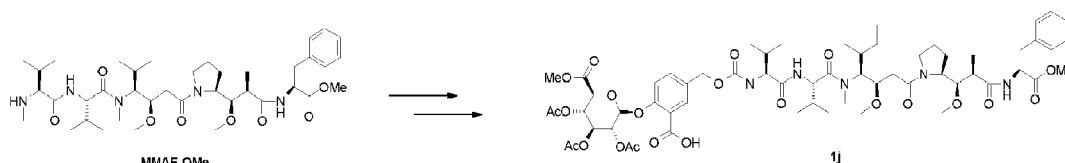
A una disolución del compuesto 1f (2,50 g, 4,77 mmol) en DMF (20 ml) se le añadieron carbonato de bis(4-nitrofenilo) (1,30 g, 4,29 mmol) y DIPEA (0,80 ml, 4,77 mmol) a 0 °C bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 min y se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (200 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (100 ml) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 1g (2,80 g, 85 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,28 (d, *J* = 15,2 Hz, 2H), 7,85 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,55 (dd, *J* = 3,2 Hz, 2,4 Hz, 1H), 7,38 (d, *J* = 15,2 Hz, 2H), 7,20 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H) 6,03 (m, 1H), 5,42-5,19 (m, 8H), 4,78 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 4,12 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 3,74 (s, 3H).

Preparación del compuesto 1h

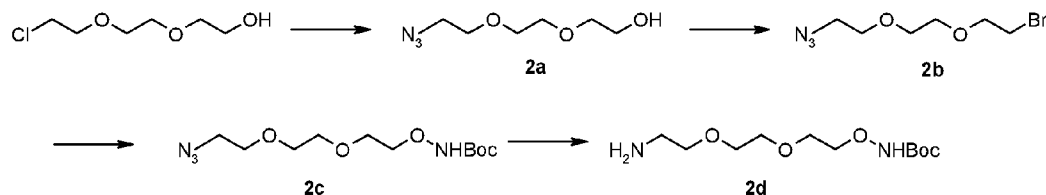
Se disolvieron el compuesto 1g (528 mg, 0,77 mmol), MMAE (500 mg, 0,7 mmol) y HOBt anhidro (19 mg, 0,14 mmol) en DMF (3 ml) a 0 °C. Luego se añadieron piridina (0,7 ml) y DIPEA (0,24 ml, 1,39 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con disolución de H₂O/NH₄Cl acuosa saturada (100 ml/50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 1h (600 mg, 67 %). EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 1269,5, [M+Na]⁺ 1291,5.

Preparación del compuesto 1i

A una disolución del compuesto 1h (600 mg, 0,47 mmol) y trifetilfosfina (31 mg, 0,12 mmol) en DCM (10 ml) se le añadieron pirrolidina (0,047 ml, 0,57 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (27 mg, 0,02 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O/HCl ac. 1 N (50 ml/50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (de Hex/EtOAc 1/1 a EtOAc) para producir el compuesto 1i (480 mg, 82 %) como un sólido de color blanco. EI-MS *m/z*: [M+H]⁺ 1228,4, [M+Na]⁺ 1250,4.

Ejemplo 2. Preparación del compuesto 1j

Se preparó el compuesto 1j a partir de MMAF-OMe mediante un método similar de preparación del compuesto 1i en el ejemplo 1.

Ejemplo 3. Preparación del compuesto 2g

Preparación del compuesto 2a

Se disolvió 2-(2-(2-cloroetoxi)eto)etanol (10 g, 59,3 mmol) en DMF (90 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadió NaN₃ (5,78 g, 88,9 mmol). Después de agitar a 100 °C durante 13 horas, se le añadieron cloroformo (200 ml) y agua destilada (300 ml) para extraer la fase orgánica y se secó la fase orgánica extraída sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que produjo el compuesto 2a (10,3 g, 99 %). ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 3,75-3,73 (m, 2H), 3,70-3,68 (m, 6H), 3,63-3,61 (m, 2H), 3,40 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H), 2,20 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H).

Preparación del compuesto 2b

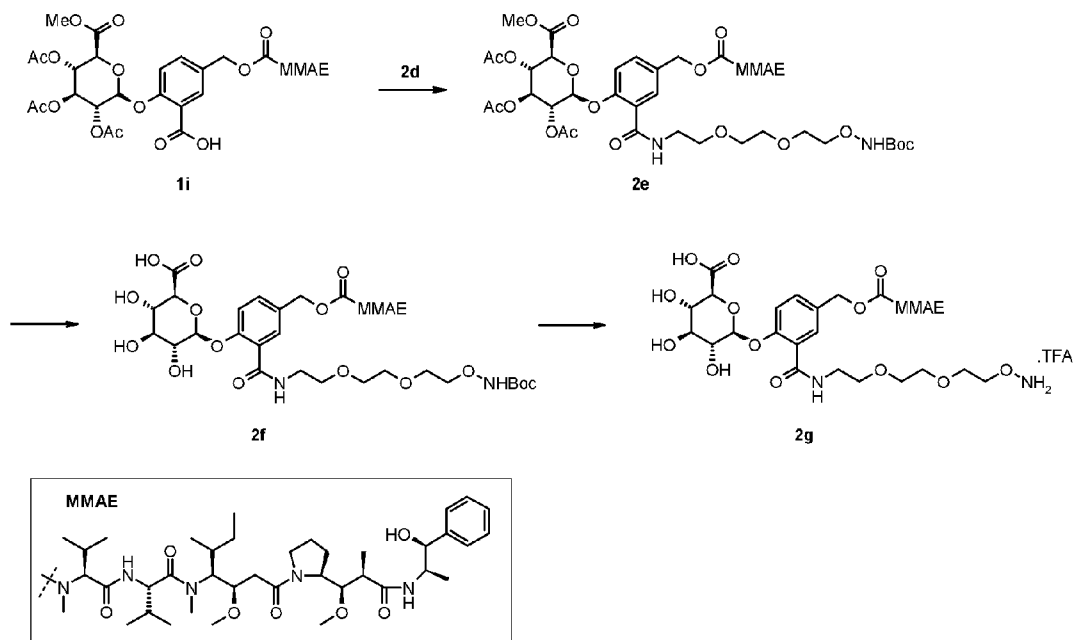
Se disolvió CBr₄ (21,4 g, 64,6 mmol) en DCM (100 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadieron trifenilfosfina (16,9 g, 64,6 mmol) en DCM (100 ml) y el compuesto 2a (10,3 g, 58,7 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 13 horas. Después de completarse la reacción, se le añadieron DCM (300 ml) y agua destilada (300 ml) para extraer la fase orgánica y se secó la fase orgánica extraída sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que produjo el compuesto 2b (12 g, 85 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,83 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,72-3,67 (m, 6H), 3,48 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,40 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 2c

Se disolvió el compuesto 2b (1 g, 4,20 mmol) en MeCN a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadieron *N*-Boc-hidroxilamina (643 mg, 4,82 mmol) y DBU (0,66 ml, 4,41 mmol). Después de agitar a 60 °C durante 13 horas, se le añadieron DCM (300 ml) y agua destilada (300 ml) para extraer la fase orgánica y se secó la fase orgánica extraída sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que produjo el compuesto 2c (748 mg, 70 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,55 (s, 1H), 4,05-4,03 (m, 2H), 3,76-3,74 (m, 2H), 3,74-3,69 (m, 6H), 3,42 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 1,49 (s, 9H).

Preparación del compuesto 2d

Se disolvió el compuesto 2c (200 mg, 0,688 mmol) en MeOH (5 ml) y luego se le añadió Pd/C (10 % en peso, 70 mg) y se agitó bajo hidrógeno durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró a presión reducida, que produjo el compuesto 2d (180 mg, 98 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,04-4,01 (m, 2H), 3,74-3,62 (m, 7H), 3,55 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 2,88 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 2,81 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 1,64 (s, 2H), 1,48 (s, 9H).

Preparación del compuesto 2e

Se añadieron DIPEA (0,042 ml, 0,32 mmol) y PyBOP (126 mg, 0,24 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 1i (200 mg, 0,16 mmol) y el compuesto 2d (51 mg, 0,19 mmol) en DMF (4 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se

concentraron. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 2e (142 mg, 60 %). EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1474,7.

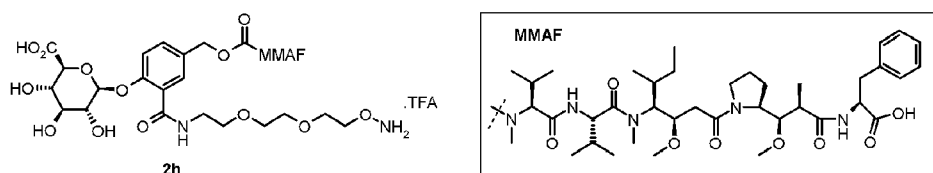
Preparación del compuesto 2f

A una disolución del compuesto 2e (142 mg, 0,096 mmol) en MeOH (2 ml) se le añadió LiOH monohidratado (36 mg, 0,86 mmol) en H₂O (2 ml) a -20 °C. Después de agitar a 0 °C durante 1 hora, se diluyó la mezcla de reacción con disolución de H₂O/HCl ac. 2 N (50 ml/2 ml) y se extrajo con CHCl₃ (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto en bruto 2f (128 mg), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1334,5.

Preparación del compuesto 2g

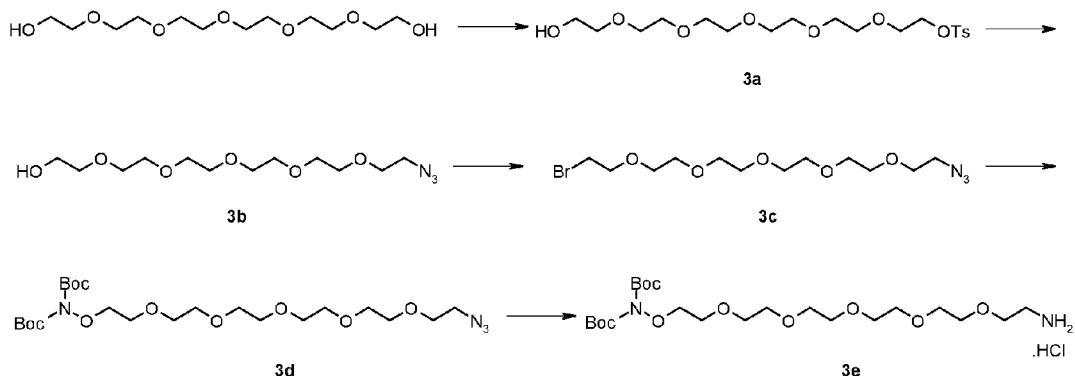
A una disolución del compuesto en bruto 2f (105 mg, 0,08 mmol) en DCM (3 ml) se le añadió HCl (4 M en 1,4-dioxano, 1 ml) a 0 °C. Después de 1 hora, se eliminaron el disolvente y HCl en exceso mediante flujo de N₂ y luego se purificó el residuo mediante HPLC, que produjo el compuesto 2g (47 mg, 46 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1234,4.

Ejemplo 4. Preparación del compuesto 2h



Se preparó el compuesto 2h a partir del compuesto 1j y compuesto 2d mediante un método similar de preparación del compuesto 2g en el ejemplo 3. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1248,9.

Ejemplo 5. Preparación del compuesto 3f



Preparación del compuesto 3a

Se sometió a sonicación una mezcla de hexaetilenglicol (1,0 g, 3,54 mmol), Ag₂O (1,23 g, 5,31 mmol) y KI (117 mg, 0,71 mmol) en DCM (10 ml) durante 15 min. Se enfrió la suspensión hasta -30 °C y se añadió gota a gota una disolución de cloruro de *p*-toluenosulfonilo (688 mg, 3,61 mmol) en DCM (13 ml). Luego se calentó gradualmente la mezcla hasta 0 °C y se mantuvo durante 15 minutos a esta temperatura. Luego se secó la mezcla de reacción sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró para producir el residuo viscoso. Luego, se purificó el residuo viscoso mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1). Se evaporaron las fracciones puras a vacío para dar el compuesto 3a (1,18 g, 77 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,16 (m, 2H), 3,72-3,58 (m, 22H), 2,97 (a, 1H), 2,45 (s, 3H).

Preparación del compuesto 3b

Se disolvieron el compuesto 3a (1,18 g, 2,71 mmol) y NaN₃ (264 mg, 4,07 mmol) en DMF (3 ml). Y luego se calentó la mezcla de reacción a 100 °C. Después de 15 horas a 100 °C, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1) para dar el compuesto 3b (728 mg, 87 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,75-3,70 (m, 2H), 3,69-3,63 (m, 18H), 3,62-3,60 (m, 2H), 3,39 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,07 (a, 1H).

Preparación del compuesto 3c

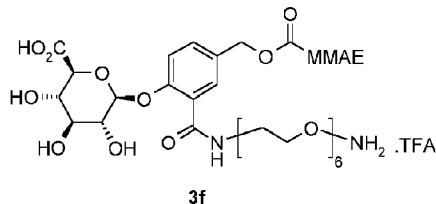
A una disolución con agitación del compuesto 3b (728 mg, 2,36 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C se le añadieron trietilamina (0,73 ml, 5,21 mmol) y anhídrido metanosulfónico (619 mg, 3,55 mmol). Después de 2 horas, se añadió LiBr (1,03 g, 11,8 mmol) a una disolución con agitación y se sometió a reflujo la mezcla de reacción resultante durante 5 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1) para dar el compuesto 3c (810 mg, 92 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,81 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,69-3,65 (m, 18H), 3,47 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,39 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 3d

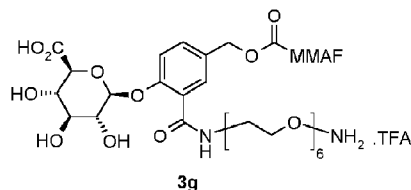
Se añadió NaH (60 % en aceite, 564 mg, 12,9 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 3c (3,42 g, 9,24 mmol) y *N,N*-diBoc-hidroxiilamina (2,80 g, 12,0 mmol, sintetizado por los procedimientos en la publicación PCT n.º WO2004/018466A2) en DMF (20 ml) a 0 °C. Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se mantuvo durante 2 horas a esta temperatura. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (EtOAc/Hex 1/20 a 1/5), que produjo el compuesto 3d (3,51 g, 73 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,08 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 3,73 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 3,69-3,62 (m, 18H), 3,39 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 1,53 (s, 18H).

Preparación del compuesto 3e

A una mezcla con agitación del compuesto 3d (123 mg, 0,23 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 25 mg) en MeOH (5 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,05 ml, 0,21 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (100 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 3e (118 mg, 95 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,98 (t, *J* = 4,4 Hz, 2H), 3,61-3,51 (m, 22H), 2,95 (a, 3H), 1,46 (s, 18H). EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 497,6.

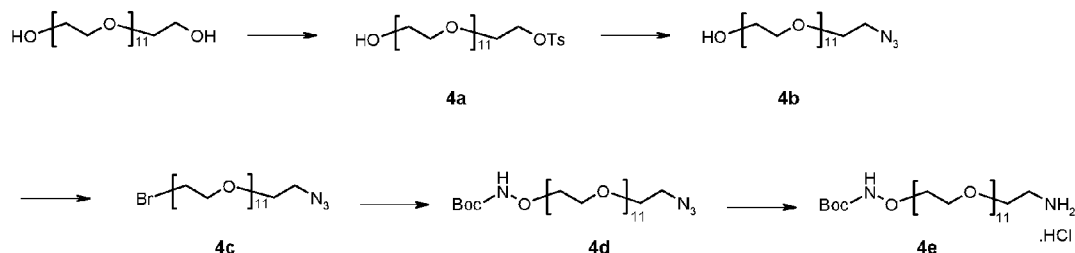
Preparación del compuesto 3f

Se preparó el compuesto 3f a partir del compuesto 1i y compuesto 3e mediante un método similar de preparación del compuesto 2g en el ejemplo 3. EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 1366,6, [M+Na]⁺ 1389,6.

Ejemplo 6. Preparación del compuesto 3g

Se preparó el compuesto 3g a partir del compuesto 1j y compuesto 3e mediante un método similar de preparación del compuesto 2g en el ejemplo 3. EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 1380,6, [M+Na]⁺ 1403,6.

Ejemplo 7. Preparación del compuesto 4f



5 Preparación del compuesto 4a

A una disolución con agitación de dodecaetilenglicol (1,8 g, 3,2 mmol) en DCM (18 ml) se le añadió cloruro de *p*-toluenosulfonilo (656 mg, 3,4 mmol), Ag_2O (1,13 g, 4,9 mmol) y KI (108 mg, 0,65 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con DCM (50 ml). Se concentró el filtrado. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 4a (490 mg, 21 %) como un aceite de color amarillento claro. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,81 (d, 2H), 7,35 (d, 2H), 4,16 (t, 2H), 3,72-3,58 (m, 46H), 2,82 (s, 1H), 2,45 (s, 3H).

Preparación del compuesto 4b

Se disolvieron el compuesto 4a (490 mg, 0,69 mmol) y NaN_3 (68 mg, 1,04 mmol) en DMF (16 ml) y se calentó la mezcla de reacción a 100 °C durante 3 horas. Se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 4b (267 mg, 67 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,72-3,60 (m, 46H), 3,39 (t, 2H), 2,84 (t, 1H), 3,40 (m, 2H).

Preparación del compuesto 4c

A una disolución con agitación del compuesto 4b (265 mg, 0,46 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C se le añadieron 4-metilmorfolina (0,066 ml, 0,60 mmol) y anhídrido metanosulfónico (121 mg, 0,69 mmol). Después de 2 horas, se añadió LiBr (120 mg, 1,38 mmol) a una disolución con agitación y se sometió a reflujo la mezcla de reacción resultante durante 6 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1) para dar el compuesto 4c (178 mg, 60 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,81 (t, 2H), 3,65 (m, 42H), 3,47 (t, 2H), 3,39 (t, 2H).

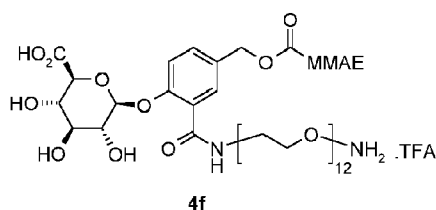
Preparación del compuesto 4d

Se añadió NaH (60 % en aceite, 14 mg, 0,33 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 4c (175 mg, 0,27 mmol) y *N*-Boc-hidroxilamina (47 mg, 0,35 mmol) en DMF (5 ml) a 0 °C. Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se mantuvo durante 12 horas a esta temperatura. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (MeOH/ CHCl_3 1/20 a 1,5/20), que produjo el compuesto 4d (148 mg, 78 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,00 (t, 2H), 3,66 (m, 44H), 3,39 (t, 2H), 1,47 (d, 9H).

Preparación del compuesto 4e

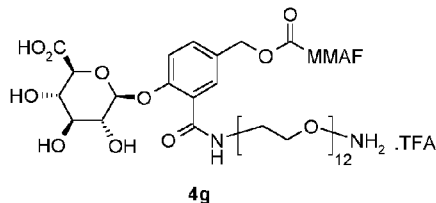
A una mezcla con agitación del compuesto 4d (148 mg, 0,21 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 28 mg) en MeOH (5 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,053 ml, 0,21 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 4e (142 mg, 96 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4,00 (t, 2H), 3,92 (t, 2H), 3,76-3,64 (m, 42H), 3,18 (t, 2H), 1,47 (s, 9H).

Preparación del compuesto 4f



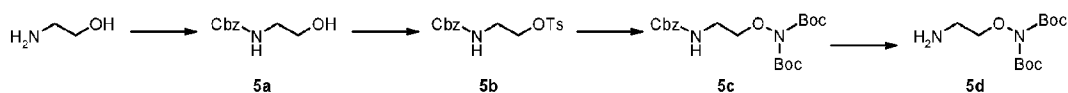
Se preparó el compuesto 4f a partir del compuesto 1i y compuesto 4e mediante un método similar de preparación del compuesto 2g en el ejemplo 3. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1631,9.

Ejemplo 8. Preparación del compuesto 4g



Se preparó el compuesto 4g a partir del compuesto 1j y compuesto 4e mediante un método similar de preparación del compuesto 2g en el ejemplo 3. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1645,3.

Ejemplo 9. Preparación del compuesto 5e



Preparación del compuesto 5a

A una disolución de 2-aminoetanol (10 g, 164 mmol) en DCM (70 ml) se le añadieron trietilamina (3,9 ml, 28,1 mmol) y cloroformiato de bencilo (30 ml, 213 mmol) en DCM (30 ml) a 0 °C bajo N_2 . Después de 24 horas, se concentró la mezcla de reacción. Se diluyó el residuo resultante con H_2O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 5a (17 g, 53 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,40-7,27 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 3,72 (s, 2H), 3,56 (s, 2H), 2,13 (s a, 1H).

Preparación del compuesto 5b

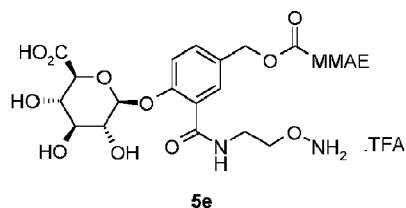
A una disolución del compuesto 5a (5,0 g, 25,6 mmol) en DCM (70 ml) se le añadieron trietilamina (3,9 ml, 28,1 mmol), DMAP (100 mg, 5,12 mmol) y cloruro de *p*-toluenosulfonilo (5,4 g, 28,1 mmol) en DCM (30 ml) a 0 °C bajo N_2 . Después de 15 horas a 0 °C, se diluyó la mezcla de reacción con NH_4Cl ac. saturado (100 ml) y se extrajo con DCM (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 5b (8,29 g, 92 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,77 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,40-7,28 (m, 7H), 5,07 (s, 3H), 4,09 (s, 2H), 3,45 (s, 2H), 2,43 (s, 3H).

Preparación del compuesto 5c

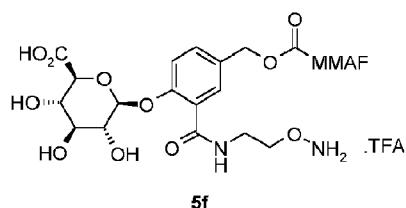
A una disolución del compuesto 5b (2,0 g, 7,23 mmol) en THF (20 ml) se le añadió *N,N*-diBoc-hidroxilamina (1,7 g, 7,44 mmol) y NaH (300 mg, 6,86 mmol) a 0 °C bajo N_2 . Después de agitar a temperatura ambiente durante 17 horas, se diluyó la mezcla de reacción con NH_4Cl acuoso saturado (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 5c (375 mg, 16 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,45-7,27 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,01 (s a, 2H), 3,44 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 1,52 (s, 18H). EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 410,7.

Preparación del compuesto 5d

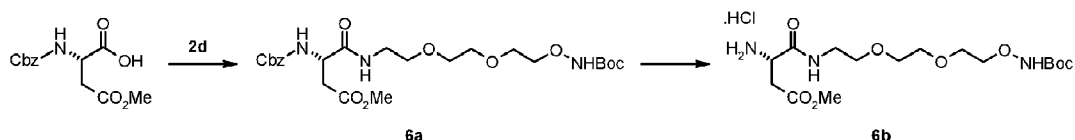
A una disolución del compuesto 5c (187 mg, 0,45 mmol) en MeOH (20 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 20 mg) y luego se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas bajo hidrógeno. Se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (20 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 5d (120 mg) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional.

Preparación del compuesto 5e

- 5 Se preparó el compuesto 5e a partir del compuesto 1i y compuesto 5d mediante un método similar de preparación del compuesto 2g en el ejemplo 3. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1146,4.

Ejemplo 10. Preparación del compuesto 5f

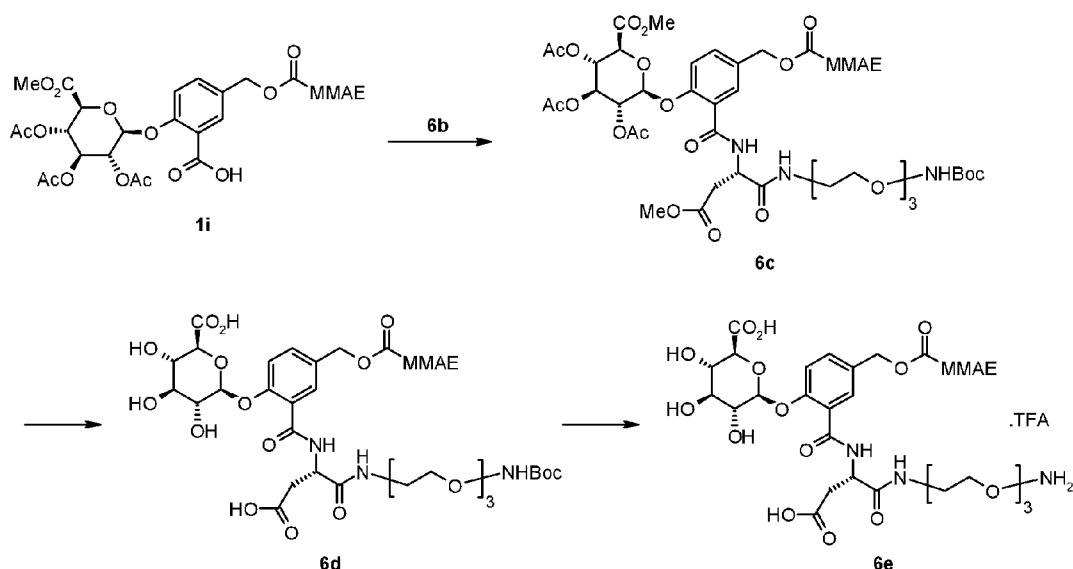
- 10 Se preparó el compuesto 5f a partir del compuesto 1j y compuesto 5d mediante un método similar de preparación del compuesto 2g en el ejemplo 3. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1160,3.

15 *Ejemplo 11. Preparación del compuesto 6e*Preparación del compuesto 6a

- 20 Se añadieron DIPEA (1,2 ml, 9,96 mmol) y HBTU (1,69 g, 6,22 mmol) a una mezcla con agitación de Z-Asp(OMe)-OH (500 mg, 1,78 mmol) y compuesto 2d (642 mg, 2,98 mmol) en DMF (5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 22 horas bajo N_2 . Se diluyó la mezcla de reacción con H_2O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 6a (368 mg, 40 %). ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85-7,70 (m, 1 H), 7,45-7,28 (m, 5H), 7,04 (s, 1H), 6,02 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,65-4,50 (m, 1H), 4,00 (d, J = 3,6 Hz, 2H), 3,72-3,30 (m, 10H), 2,80 (dd, J = 5,6 Hz, 2H), 1,46 (s, 9H).

30 Preparación del compuesto 6b

- 35 A una mezcla con agitación del compuesto 6a (150 mg, 0,28 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 20 mg) en MeOH (5 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,07 ml, 0,28 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (20 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 6b (169 mg) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+1]^+$ 393,7.



Preparación del compuesto 6c

Se añadieron DIPEA (0,022 ml, 0,12 mmol) y HBTU (20 mg, 0,05 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 1i (50 mg, 0,04 mmol) y compuesto 6b (22 mg, 0,05 mmol) en DMF (1 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 . Luego, se diluyó la mezcla de reacción con H_2O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 20 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 6c (38 mg, 60 %). EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1604,5.

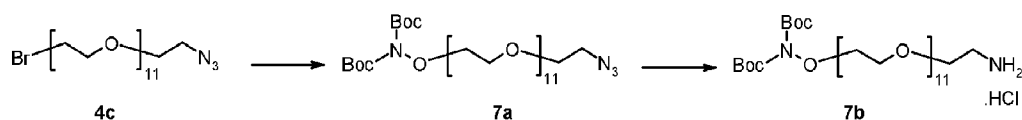
Preparación del compuesto 6d

A una disolución del compuesto 6c (38 mg, 0,023 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió LiOH monohidratado (5 mg, 0,118 mmol) en H_2O (1 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se ajustó el pH de la disolución con AcOH a 4-5 y se concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo en DMSO (1,5 ml) y se purificó mediante HPLC para producir el compuesto 6d (26 mg, 78 %). EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1450,5.

Preparación del compuesto 6e

Se añadió TFA (0,3 ml) a una disolución con agitación del compuesto 6d (26 mg, 0,018 mmol) en DCM (1,5 ml). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N_2 . Luego se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 6e (19,5 mg, 80 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1350,6.

Ejemplo 12. Preparación del compuesto 7e



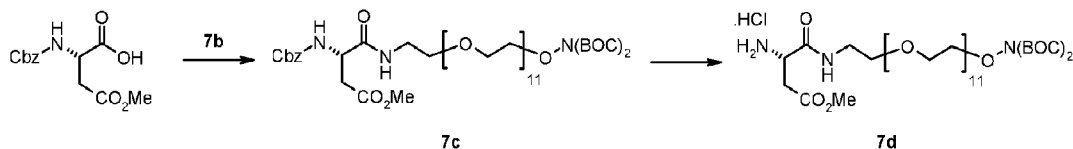
Preparación del compuesto 7a

Se añadió NaH (60 % en peso, 500 mg, 12,49 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 4c (6,10 g, 9,61 mmol) y *N,N*-diBoc-hidroxilamina (2,69 g, 11,53 mmol) en DMF (90 ml) a 0 °C. Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se mantuvo durante 12 horas a esta temperatura. Se evaporó la mezcla de reacción a presión reducida y se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna. Se evaporaron las fracciones puras a vacío para dar el compuesto 7a (5,70 g, 75 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,05 (t, 2H), 3,71 (t, 2H), 3,64 (m, 42H), 3,37 (t, 2H), 1,51 (d, 18H).

Preparación del compuesto 7b

A una mezcla con agitación del compuesto 7a (5,70 g, 7,21 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 570 mg) en MeOH (100 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 1,9 ml, 7,2 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente

durante 30 minutos bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 7b (5,10 g, 87 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 4,21 (t, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,95-3,78 (m, 42H), 3,32 (s, 2H) 1,63 (s, 18H).



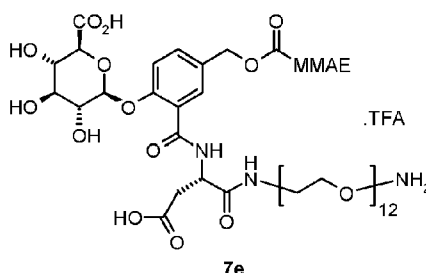
Preparación del compuesto 7c

Se añadieron DIPEA (0,25 ml, 1,42 mmol) y HBTU (337 g, 0,89 mmol) a una mezcla con agitación de Z-Asp(OMe)-OH (100 mg, 0,36 mmol) y compuesto 7b (340 mg, 0,43 mmol) en DMF (10 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 horas bajo N_2 . Luego, se diluyó la mezcla de reacción con H_2O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 7c (123 mg, 58 %). EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1024,2.

Preparación del compuesto 7d

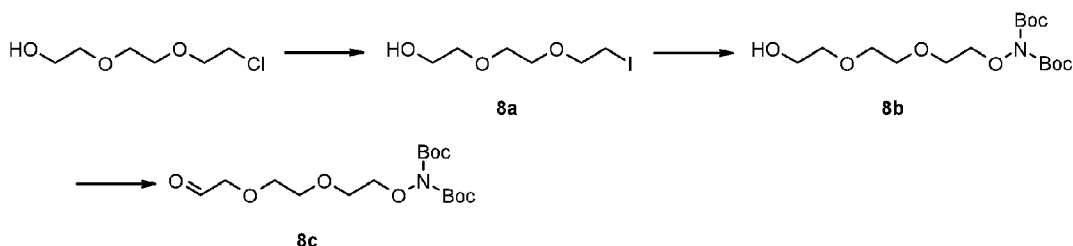
A una mezcla con agitación del compuesto 7c (120 mg, 0,12 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 20 mg) en MeOH (5 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,03 ml, 0,12 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (20 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 7d (120 mg) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional.

Preparación del compuesto 7e



Se preparó el compuesto 7e a partir del compuesto 1i y compuesto 7d mediante un método similar de preparación del compuesto 6e en el ejemplo 11. EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1747,1.

Ejemplo 13. Preparación del compuesto 8f



Preparación del compuesto 8a

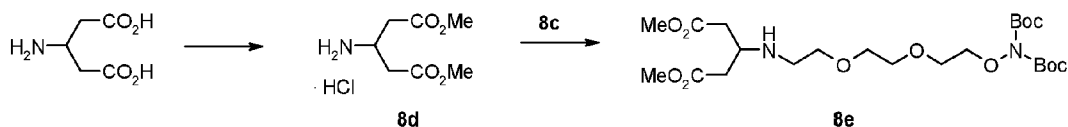
A una disolución de 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etanol (5,0 g, 29,6 mmol) en acetona (30 ml) se le añadió NaI (13,3 g, 88,9 mmol). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 8a (7,0 g, 91 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3,80-3,73 (m, 4H), 3,72-3,65 (m, 4H), 3,63-3,61 (m, 2H), 3,27 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 8b

Se añadió NaH (500 mg, 12,49 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 8a (2,0 g, 7,69 mmol) y *N,N*-diBoc-hidroxilamina (2,33 g, 10,00 mmol) en DMF (20 ml) a 0 °C bajo N₂. Después de agitar a temperatura ambiente durante 17 horas, se diluyó la mezcla de reacción con NH₄Cl ac. saturado (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 8b (1,54 g, 54 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,27 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,01 (s a, 2H), 3,44 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H), 1,52 (s, 18H). EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 410,7.

Preparación del compuesto 8c

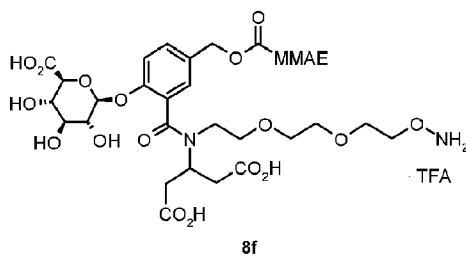
A una disolución con agitación del compuesto 8b (123 mg, 0,242 mmol) en DMSO (2 ml) y DCM (2 ml) se le añadieron complejo de SO₃.piridina (116 mg, 0,726 mmol) y trietilamina (0,17 ml, 1,21 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 1 hora, se diluyó la mezcla de reacción con NH₄Cl ac. saturado (10 ml) y se extrajo con DCM (2 x 10 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se filtraron. La concentración a presión reducida proporcionó el compuesto 8c (88 mg), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,74 (s, 1H), 4,19 (s, 2H), 3,77-3,69 (m, 6H), 3,42 (m, 2H).

Preparación del compuesto 8d

A una disolución de ácido β-glutámico (500 mg, 0,339 mmol) en MeOH (10 ml) se le añadió cloruro de tionilo (0,148 ml, 2,04 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 24 horas, se concentró la mezcla de reacción para producir el compuesto 8d (697 mg), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,40-7,27 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 3,72 (s, 2H), 3,56 (s, 2H), 2,13 (s a, 1H).

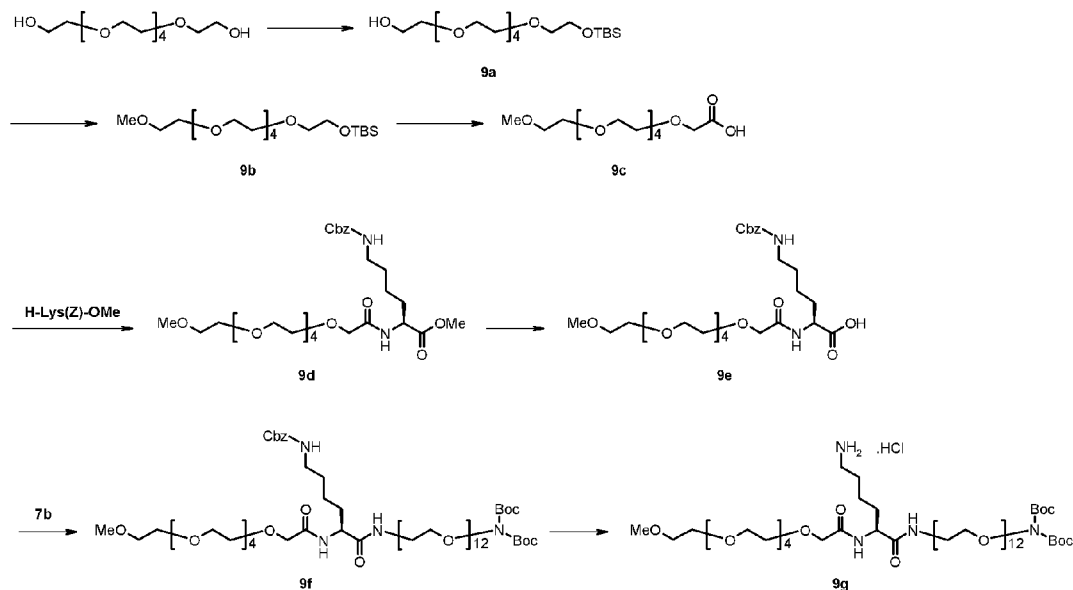
Preparación del compuesto 8e

A una disolución del compuesto 8d (34 mg, 0,16 mmol) y compuesto 8c (88 mg, 0,24 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió NaCNBH₃ (10 mg, 0,16 mmol) a temperatura ambiente bajo N₂. Después de 3 horas, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 8e (53 mg, 63 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,25 (m, 10H), 5,60 (s a, 2H), 5,03 (s, 4H), 3,80-3,25 (m, 20H), 2,81 (s, 4H).

Preparación del compuesto 8f

Se preparó el compuesto 8f a partir del compuesto 1i y compuesto 8e mediante un método similar de preparación del compuesto 6e en el ejemplo 11. EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 1365,0.

Ejemplo 14. Preparación del compuesto 9j



5 Preparación del compuesto 9a

A una disolución de hexaetilenglicol (10,48 g, 37,12 mmol) en DCM (400 ml) se le añadió imidazol (3,20 g, 44,54 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 5 minutos, se añadió gota a gota la mezcla de reacción a la disolución de TBSCl (5,60 g, 37,12 mmol) en DCM (50 ml) a la misma temperatura bajo una atmósfera de N₂. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C y se calentó hasta temperatura ambiente durante 21 horas bajo N₂. Después de completarse la reacción, se diluyó la mezcla de reacción con agua (200 ml) y se extrajo con DCM (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna. Se evaporaron las fracciones puras a vacío para dar el compuesto 9a (6,70 g, 46 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,77-3,71 (m, 4H), 3,66-3,60 (m, 18H), 3,56-3,54 (t, 2H), 0,89 (s, 9H), 0,06 (s, 6H).

15 Preparación del compuesto 9b

A una disolución del compuesto 9a (3,32 g, 8,37 mmol) en THF seco (40 ml) se le añadió NaH (55 % en aceite, 438 mg, 10,05 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 30 minutos, se añadió MeI (0,78 ml, 12,56 mmol) a la mezcla de reacción a la misma temperatura bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción y se calentó hasta temperatura ambiente durante 18 horas bajo N₂. Después de completarse la reacción, se extinguió con H₂O (10 ml) y se extrajo con EA (3 x 10 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con NH₄Cl ac. saturado (5 ml) y salmuera (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna. Se evaporaron las fracciones puras a vacío para dar el compuesto 9b (3,16 g, 92 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,78-3,75 (t, 2H), 3,65 (s, 20H), 3,57-3,54 (t, 4H), 3,38 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 0,06 (s, 6H).

25 Preparación del compuesto 9c

A una disolución del compuesto 9b (3,16 g, 7,69 mmol) en acetona (100 ml) se le añadió reactivo de Jones (10 ml) a 0 °C bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción y se calentó hasta temperatura ambiente durante 17 horas bajo N₂. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla de reacción y se evaporó a presión reducida. Se diluyó el residuo con H₂O (100 ml) y se extrajo con CHCl₃ (3 x 50 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a presión reducida. Se usó el compuesto resultante en bruto 9c (2,28 g, 95 %) sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,16 (s, 2H), 3,76-3,75 (t, 2H), 3,69-3,67 (m, 16H), 3,57-3,55 (t, 2H), 3,38 (s, 3H).

35 Preparación del compuesto 9d

Se añadieron DIPEA (3,8 ml, 22,03 mmol), HOBT (1,29 g, 9,55 mmol) y EDC·HCl (1,83 g, 9,55 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 9c (2,28 g, 7,34 mmol) y clorhidrato de H-Lys(Z)-OMe (2,91 g, 8,81 mmol) en DMF (30 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía en columna dio el compuesto 9d (1,23 g, 72 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,38-7,31 (m, 5H), 5,10 (s, 2H), 5,00 (s, 1H), 4,68-4,62 (m, 1H), 4,03 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,68-3,64 (m, 16H), 3,56 (t, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,20 (m, 2H), 1,89 (m, 1H), 1,74 (m, 1H), 1,55 (m, 1H), 1,40 (m, 1H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 586,8, [M+Na]⁺ 608,9.

Preparación del compuesto 9e

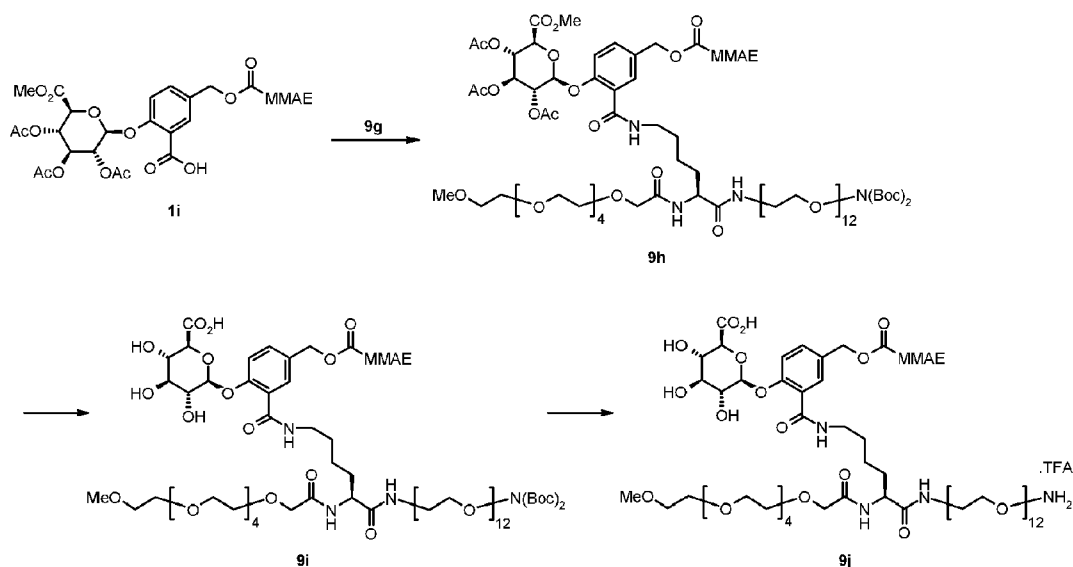
A una disolución del compuesto 9d (2,16 g, 3,68 mmol) en THF/MeOH/H₂O (18 ml/6 ml/6 ml) se le añadió LiOH monohidratado (307 mg, 7,31 mmol) a 0 °C bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se ajustó el pH de la disolución a 2-3 con HCl ac. 1 N. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O (20 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄. La filtración y concentración produjeron el compuesto 9e (2,28 g, 99 %), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,34-7,30 (m, 5H), 5,08 (s, 2H), 4,66-4,60 (q, 1H), 4,01 (s, 2H), 3,67-3,55 (m, 18H), 3,37 (s, 3H), 3,20 (m, 2H), 1,87 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,53 (m, 1H), 1,38 (m, 1H).

Preparación del compuesto 9f

Se añadieron DIPEA (0,45 ml, 2,63 mmol), HOBt (154 mg, 0,11 mmol) y EDC·HCl (218 mg, 0,11 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 9e (502 mg, 0,88 mmol) y compuesto 7b (700 mg, 0,88 mmol) en DMF (8 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con NaHCO₃ ac. (20 ml) y salmuera (20 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 9f (499 mg, 43 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,35-7,30 (m, 5H), 6,83 (s, 1H), 5,15 (s, 1H), 5,08 (s, 2H), 4,43 (q, 1H), 4,07 (t, 1H), 3,65-3,60 (m, 54H), 3,55-3,53 (m, 4H), 3,37 (s, 3H), 3,16 (m, 2H), 1,85 (m, 1H), 1,53-1,52 (d, 19H), 1,38 (m, 2H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1337,5.

Preparación del compuesto 9g

A una mezcla con agitación del compuesto 9f (499 mg, 0,37 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 50 mg) en MeOH (20 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,1 ml, 0,37 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 90 minutos bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (10 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 9g (458 mg, 98 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1218,6.

Preparación del compuesto 9h

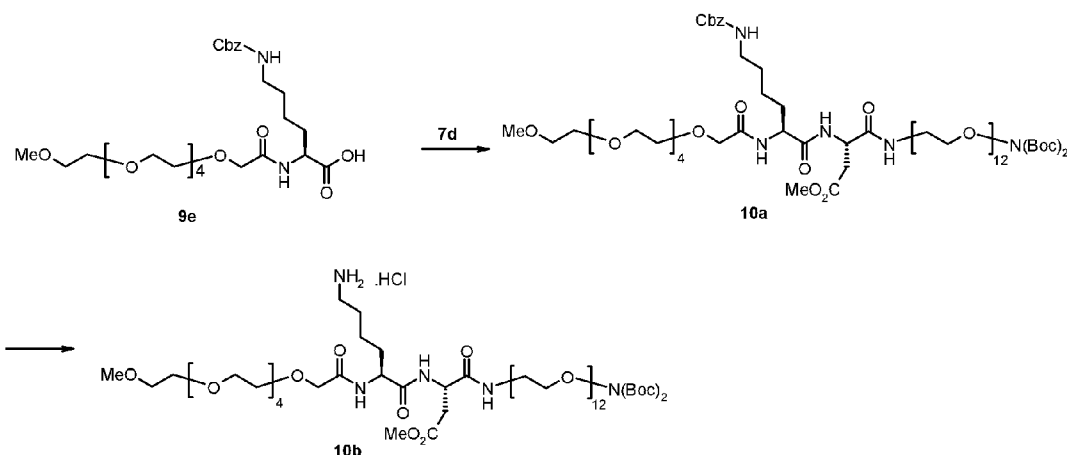
Se añadieron DIPEA (0,019 ml, 0,11 mmol) y HBTU (18 mg, 0,05 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 1i (45 mg, 0,04 mmol) y compuesto 9g (57 mg, 0,05 mmol) en DMF (0,5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 9h (65 mg, 57 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1181,7.

Preparación del compuesto 9i

A una disolución del compuesto 9h (65 mg, 0,03 mmol) en MeOH (1,5 ml) se le añadió LiOH monohidratado (10 mg, 0,24 mmol) en H₂O (1,5 ml) a 0 °C. Después de 1 hora a 0 °C, se ajustó el pH de la disolución con AcOH a 4-5 y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió la mezcla de reacción en H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 9i (45 mg, 55 %). EI-EM m/z: 1/2[M+Na]⁺ 1098,7.

Preparación del compuesto 9j

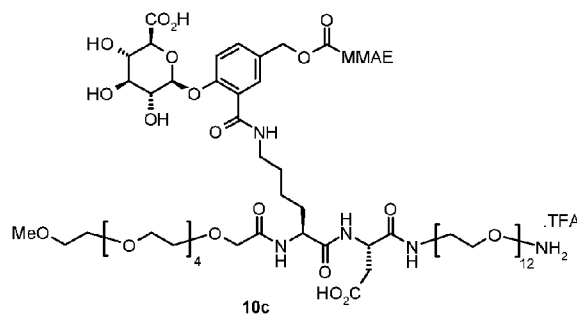
Se añadió TFA (0,2 ml) a una disolución con agitación del compuesto 9i (45 mg, 0,02 mmol) en DCM (1 ml). Después de agitar a 0 °C durante 30 minutos, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en H₂O/DMSO (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 9j (14 mg, 32 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1026,3.

Ejemplo 15. Preparación del compuesto 10cPreparación del compuesto 10a

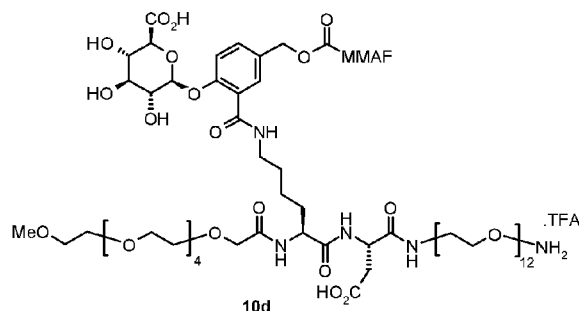
Se añadieron DIPEA (0,03 ml, 0,17 mmol), HOBT (10 mg, 0,075 mmol) y EDC·HCl (14 mg, 0,075 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 9e (33 mg, 0,058 mmol) y compuesto 7d (54 mg, 0,058 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (8 ml), NaHCO₃ ac. saturado (8 ml) y salmuera (8 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 10a (61 mg, 73 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1445,0, [M+H-Boc]⁺ 1344,9.

Preparación del compuesto 10b

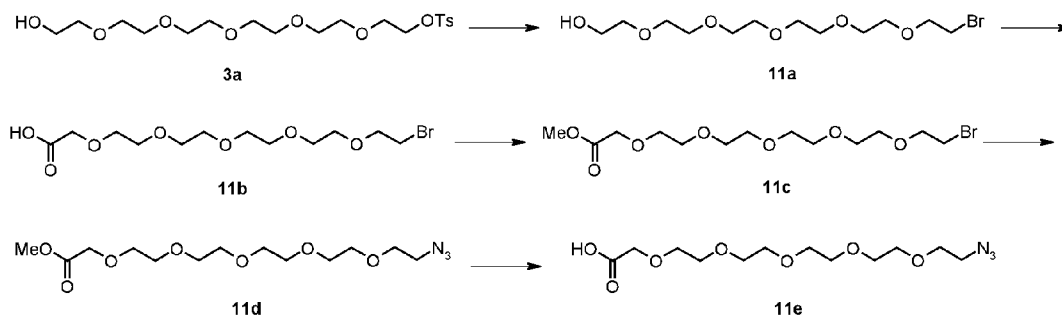
A una mezcla con agitación del compuesto 10a (60 mg, 0,04 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 30 mg) en MeOH (10 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,01 ml, 0,01 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 10b (56 mg, 100 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1311,0, [M+Na]⁺ 1332,9.

Preparación del compuesto 10c

Se preparó el compuesto 10c a partir del compuesto 1i y compuesto 10b mediante un método similar de preparación del compuesto 9j en el ejemplo 14. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1083,8.

Ejemplo 16. Preparación del compuesto 10d

Se preparó el compuesto 10d a partir del compuesto 1j y compuesto 10b mediante un método similar de preparación del compuesto 9j en el ejemplo 14. EI-EM m/z : $[M+H]^+$ 2181,3, $1/2[M+H]^+$ 1091,3.

Ejemplo 17. Preparación del compuesto 11jPreparación del compuesto 11a

A una disolución del compuesto 3a (8,0 g, 18,3 mmol) en THF (50 ml) se le añadió LiBr (7,9 g, 91,6 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 17 horas a reflujo, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 11a (3,2 g, 50 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,95-3,50 (m, 24H).

Preparación del compuesto 11b

A una disolución del compuesto 11a (3,2 g, 12,3 mmol) en acetona (20 ml) a 0 °C se le añadió reactivo de Jones (20 ml). Después de 15 horas a 0 °C, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se diluyó el residuo con H_2O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 11b (3,2 g, 72 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,16 (s, 2H), 3,95-3,30 (m, 20H).

Preparación del compuesto 11c

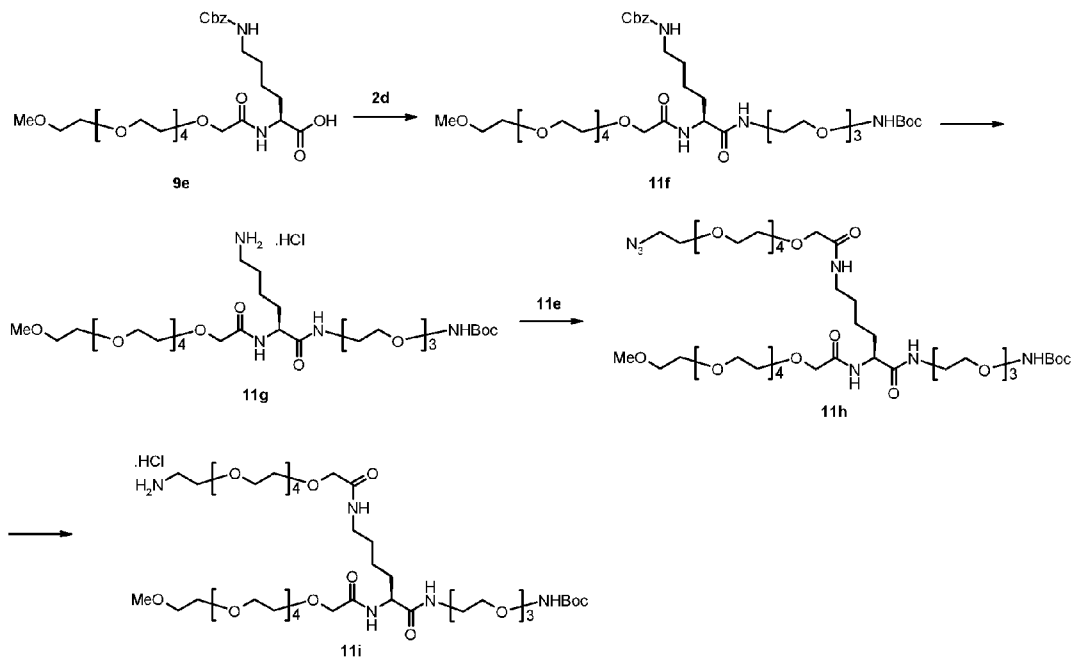
A una disolución del compuesto 11b (3,2 g, 8,90 mmol) en MeOH (30 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (1,15 ml, 13,3 mmol) a 0 °C bajo N_2 . Después de 16 horas, se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 11c (2,7 g, 81 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,17 (s, 2H), 3,80-3,60 (m, 21H), 3,47 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 11d

Se disolvieron el compuesto 11c (1,0 g, 2,67 mmol) y NaN_3 (261 mg, 4,01 mmol) en DMF (3 ml). Se calentó la mezcla de reacción a 100 °C durante 5 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1), que produjo el compuesto 11d (854 mg, 95 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,17 (s, 2H), 3,76-3,64 (m, 21H), 3,39 (t, J = 5,2 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 11e

A una disolución con agitación del compuesto 11d (854 mg, 2,54 mmol) en MeOH (25 ml) a 0 °C se le añadió NaOH ac. 2 M (6,3 ml, 12,64 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego se concentró la disolución a presión reducida. Se acidificó la suspensión resultante con HCl acuoso 2 N mientras se enfriaba a 0 °C. Se extrajo el residuo mediante CHCl₃ (8 x 50 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron para producir el compuesto 11e (783 mg, 96 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,16 (s, 2H), 3,76-3,65 (m, 18H), 3,40 (t, J = 5,2 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 11f

Se añadieron DIPEA (0,47 ml, 2,72 mmol), HOBT (160 mg, 1,18 mmol) y EDC·HCl (226 mg, 1,18 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 9e (520 mg, 0,91 mmol) y compuesto 2d (270 mg, 0,91 mmol) en DMF (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (15 ml), NaHCO₃ ac. saturado (15 ml) y salmuera (15 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 11f (631 mg, 85 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 819,1, [M+H-Boc]⁺ 719,1 [M+Na]⁺ 841,1.

Preparación del compuesto 11g

A una mezcla con agitación del compuesto 11f (300 mg, 0,36 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 70 mg) en MeOH (20 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,08 ml, 0,08 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 11g (200 mg, 99 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 685,1, [M+Na]⁺ 707,1.

Preparación del compuesto 11h

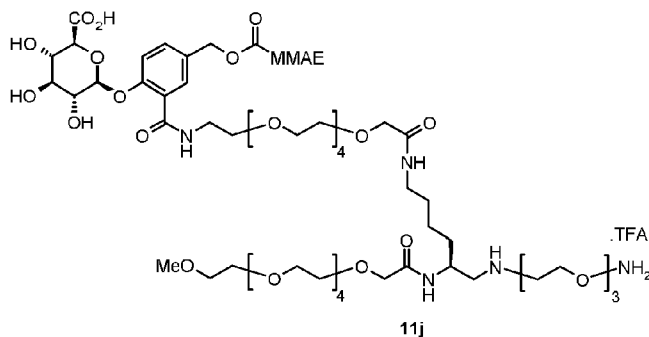
Se añadieron DIPEA (0,024 ml, 0,41 mmol), HOBT (24 mg, 0,18 mmol) y EDC·HCl (34 mg, 0,18 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 11g (100 mg, 0,14 mmol) y compuesto 11e (44 mg, 0,14 mmol) en DMF (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (10 ml) y se extrajo con DCM (3 x 10 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 11h (73 mg, 53 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 988,4, [M+Na-Boc]⁺ 888,2, [M+Na]⁺ 1010,4.

Preparación del compuesto 11i

A una mezcla con agitación del compuesto 11h (73 mg, 0,07 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 10 mg) en MeOH (7 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,018 ml, 0,018 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con

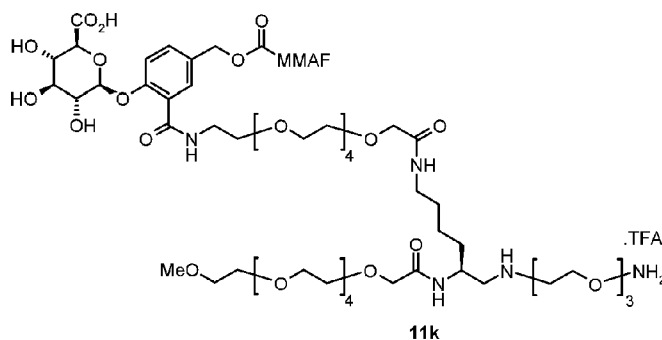
MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 11i (72 mg, 99 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 962,4, $[M+Na]^+$ 984,4.

Preparación del compuesto 11j



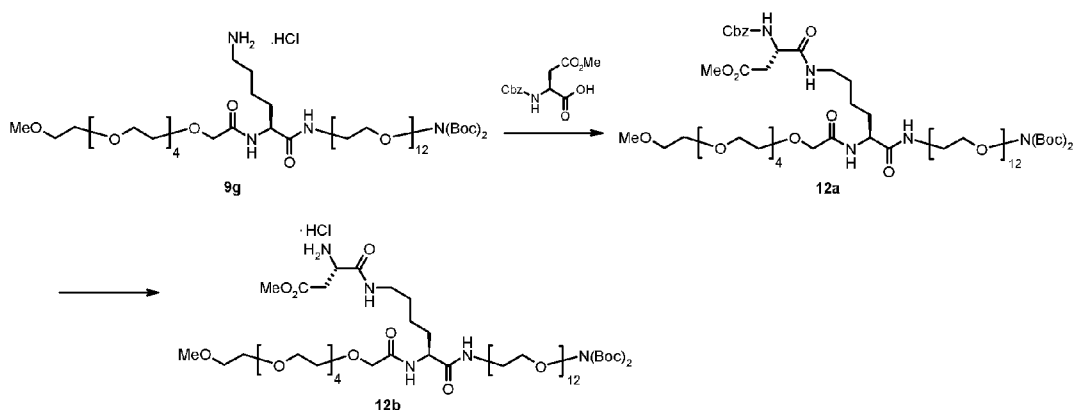
Se preparó el compuesto 11j a partir del compuesto 1i y compuesto 11i mediante un método similar de preparación del compuesto 9j en el ejemplo 14. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1932,5.

Ejemplo 18. Preparación del compuesto 11k



Se preparó el compuesto 11k a partir del compuesto 1j y compuesto 11i mediante un método similar de preparación del compuesto 9j en el ejemplo 14. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1947,1.

Ejemplo 19. Preparación del compuesto 12c



Preparación del compuesto 12a

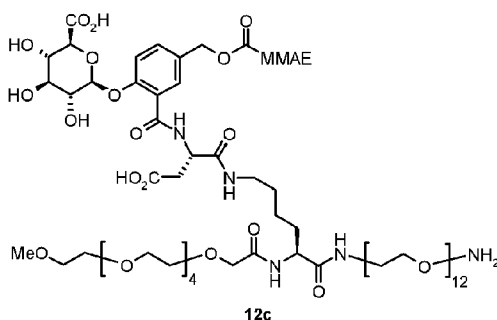
Se añadieron DIPEA (0,13 ml, 0,77 mmol) y HBTU (110 mg, 0,35 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 9g (235 mg, 0,1929 mmol) y Z-Asp(OMe)-OH (54 mg, 0,212 mmol) en DMF (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 , se vertió la mezcla de reacción en H_2O (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (7 ml), $NaHCO_3$ ac. saturado (7 ml) y salmuera (7 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 12a (260 mg, 93 %). ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,07 (t, 1H), 7,62 (t, 1H), 7,54-7,52 (m, 1H), 5,73 (s, 2H), 4,27-4,25 (q, 1H), 3,96 (t, 2H), 3,88 (s, 2H), 3,82 (s, 2H), 3,58-3,48 (m,

52H), 3,19-3,18 (m, 3H), 3,04-3,03 (m, 3H), 1,44 (s, 18H), 1,39-1,37 (m, 3H), 1,21-1,19 (m, 3H). EI-EM m/z: [M+H-2Boc]⁺ 1031,6.

Preparación del compuesto 12b

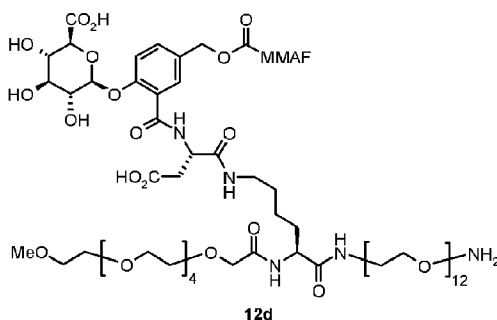
A una mezcla con agitación del compuesto 12a (260 mg, 0,179 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 72 mg) en MeOH (20 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,040 ml, 0,179 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 12b (242 mg, 100 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 625,0, [M+H-Boc]⁺ 525,0, [M+H-2Boc]⁺ 424,9.

Preparación del compuesto 12c



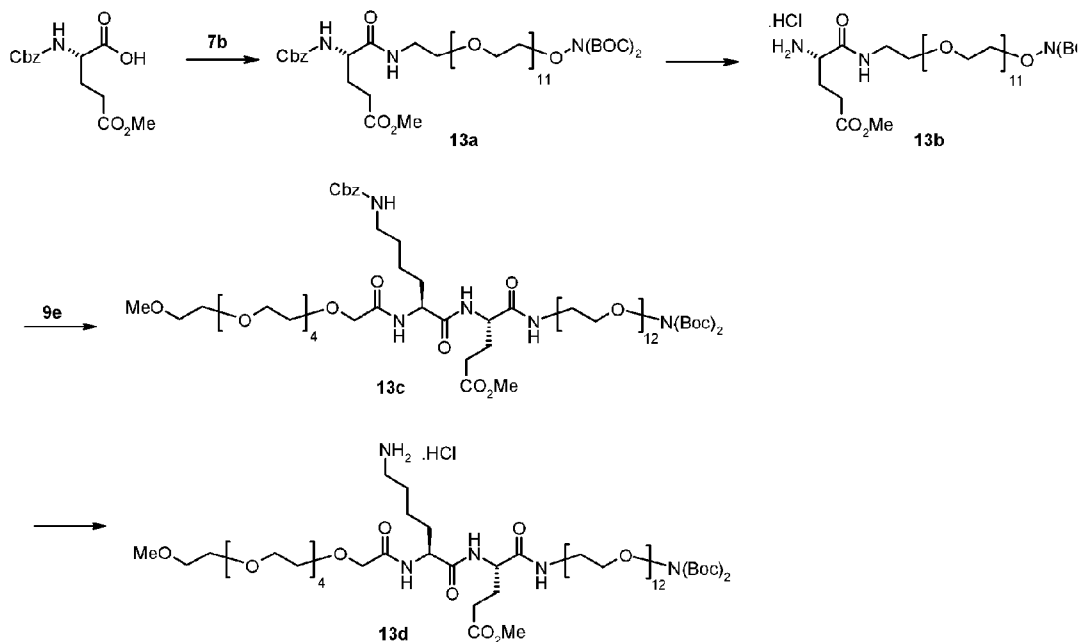
Se preparó el compuesto 12c a partir del compuesto 1i y compuesto 12b mediante un método similar de preparación del compuesto 9j en el ejemplo 14. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1083,5.

Ejemplo 20. Preparación del compuesto 12d



Se preparó el compuesto 12d a partir del compuesto 1j y compuesto 12b mediante un método similar de preparación del compuesto 9j en el ejemplo 14. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1090,5.

Ejemplo 21. Preparación del compuesto 13e



5 Preparación del compuesto 13a

Se añadieron DIPEA (0,22 ml, 1,25 mmol) y HBTU (356 mg, 0,94 mmol) a una mezcla con agitación de Z-Glu(OMe)-OH (222 mg, 0,75 mmol) y compuesto 7b (500 mg, 0,62 mmol) en DMF (5,0 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂. Se diluyó la mezcla de reacción con agua (200 ml) y se extrajo con EA (3 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 13a (370 mg, 57 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,34 (a, 5H), 6,73 (a, 1H), 5,72 (d, J = 7,6Hz, 1H), 5,06 (a, 2H), 4,28-4,18 (m, 1H), 4,07 (t, J = 4,4Hz, 2H), 3,76-3,71 (m, 2H), 3,70-3,50 (m, 45H), 3,48-3,42 (m, 2H), 2,53-2,36 (m, 2H), 2,20-2,08 (m, 1H), 2,00-1,88 (m, 1H), 1,53 (s, 18H). EI-EM m/z: [M+Na]⁺ 1061,2.

Preparación del compuesto 13b

Se añadió HCl 4 N en 1,4-dioxano (0,08 ml, 0,32 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 13a (370 mg, 0,35 mmol) y Pd/C (38 mg) en MeOH (8 ml) a 0 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (400 ml). Se concentró el filtrado, produciendo el compuesto 13b (301 mg, 90 %) como un líquido de color amarillo, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,41 (a, 1H), 8,09 (a, 3H), 4,13 (a, 1H), 3,85-3,56 (m, 51H), 2,55 (a, 2H), 2,38-2,18 (m, 2H), 1,53 (s, 18H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 905,0.

Preparación del compuesto 13c

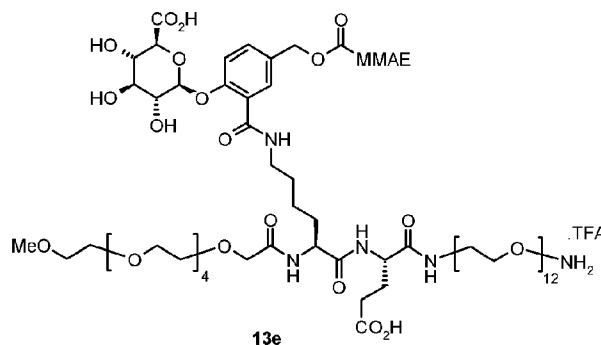
Se añadieron DIPEA (0,165 ml, 0,96 mmol) y HBTU (279 mg, 0,74 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 13b (300 mg, 0,32 mmol) y compuesto 9e (366 mg, 0,64 mmol) en DMF (5,0 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂. Se diluyó la mezcla de reacción con agua (200 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 13c (290 mg, 62 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,40-7,32 (m, 7H), 7,00 (a, 1H), 6,73 (a, 1H), 5,07 (a, 2H), 4,44-4,36 (m, 2H), 4,07 (t, J = 4,8Hz, 2H), 4,02 (a, 2H), 3,73 (t, J = 5,2Hz, 2H), 3,71-3,52 (m, 68H), 3,24-3,14 (m, 2H), 2,52-2,34 (m, 3H), 2,18-2,06 (m, 2H), 1,98-1,82 (m, 4H), 1,76-1,64 (m, 3H), 1,53 (s, 18H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1459,7.

Preparación del compuesto 13d

Se añadió Pd/C (21 mg) a una mezcla con agitación del compuesto 13c (290 mg, 0,19 mmol) en MeOH (5 ml) a 0 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (400 ml). Se concentró el filtrado, produciendo el compuesto 13c (247 mg, 94 %) como un líquido de color amarillo, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,20 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,74 (a, 1H), 7,30 (a, 1H), 4,66-4,48 (m, 2H), 4,07 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,01 (a, 2H), 3,74-3,62 (m, 70H), 3,57-3,53 (m, 2H), 3,04-2,98 (m, 2H), 2,24-2,15 (m, 2H), 2,14-2,06 (m, 2H), 1,99-1,86 (m, 4H),

1,84-1,74 (m, 2H), 1,53 (s, 18H). EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1325,5.

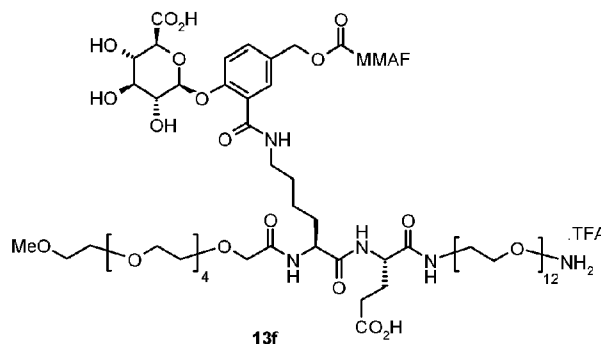
Preparación del compuesto 13e



5

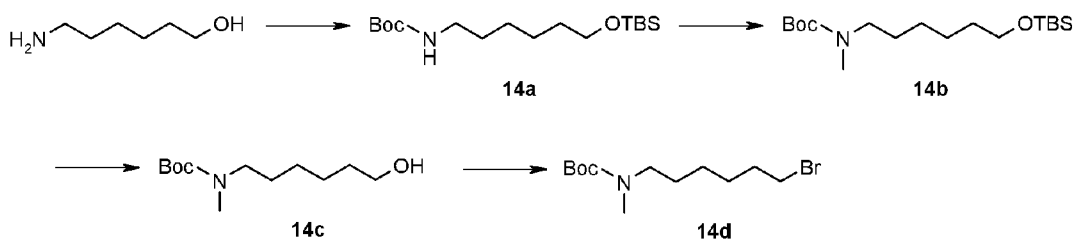
Se preparó el compuesto 13e a partir del compuesto 1i y compuesto 13d mediante un método similar de preparación del compuesto 9j en el ejemplo 14. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 2181,5.

10 Ejemplo 22. Preparación del compuesto 13f



15 Se preparó el compuesto 13f a partir del compuesto 1j y compuesto 13d mediante un método similar de preparación del compuesto 9j en el ejemplo 14. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 2195,5.

Ejemplo 23. Preparación del compuesto 14m



20

Preparación del compuesto 14a

A una disolución de 6-amino-1-hexanol (5,0 g, 42,6 mmol) en DCM (30 ml) se le añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (9,3 g, 42,6 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas, se añadieron trietilamina (8,7 ml, 63,9 mmol) y cloruro de *t*-butildimetilsililo (7,7 g, 51,2 mmol) a la mezcla de reacción a 0 °C. Después de 24 horas a temperatura ambiente, se diluyó la mezcla de reacción con NH_4Cl ac. saturado (200 ml). Se extrajo la mezcla resultante con EtOAc (100 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (100 ml) y se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 14a (12 g, 84 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,50 (s a, 1H), 3,58 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,10 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H), 1,72-1,20 (m, 17H), 0,88 (s, 9H), 0,04 (s, 6H).

30

Preparación del compuesto 14b

A una disolución del compuesto 14a (6,0 g, 18,1 mmol) en THF (30 ml) se le añadieron NaH (60 % en aceite, 2,4 g, 54,2 mmol) y yoduro de metilo (3,4 ml, 54,2 mmol) a 0 °C bajo N_2 . Después de 14 horas, se diluyó la mezcla de reacción con H_2O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre

35

MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 14b (4,3 g, 69 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,59 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,17 (s a, 2H), 2,82 (s, 3H), 1,62-1,21 (m, 17H), 0,88 (s, 9H), 0,04 (s, 6H).

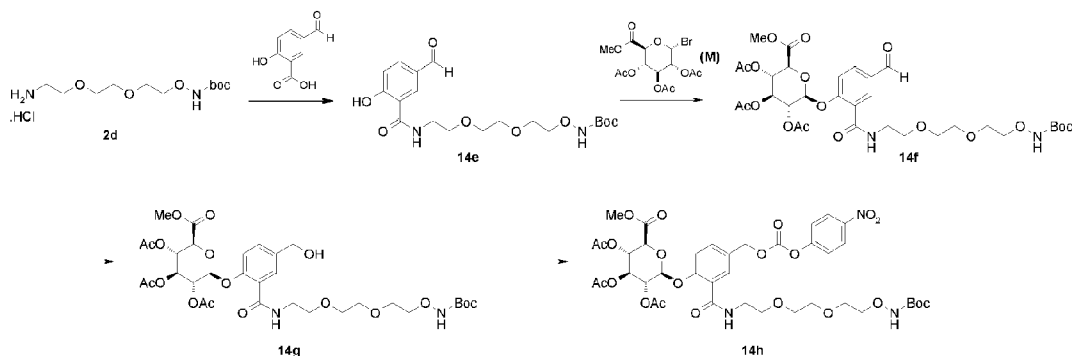
5 Preparación del compuesto 14c

A una disolución del compuesto 14b (4,3 g, 12,4 mmol) en THF (15 ml) se le añadió TBAF (1 M en THF, 15 ml, 14,9 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 5 horas, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (50 ml) y se extrajo con dietil éter (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 14c (3,0 g, 98 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,63 (s a, 2H), 3,20 (s a, 2H), 2,82 (s, 3H), 1,65-1,23 (m, 17H).

Preparación del compuesto 14d

15 A una disolución del compuesto 14c (3,0 g, 12,9 mmol) en THF (30 ml) se le añadió tetrabromuro de carbono (6,4 g, 19,4 mmol) y trifetilfosfina (5,1 g, 19,4 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 2 horas, se filtró la mezcla de reacción a través de gel de sílice y se lavó con dietil éter (100 ml). Se concentró el filtrado y se purificó mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 14d (3,3 g, 86 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,40 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,19 (s a, 2H), 2,83 (s, 3H), 1,90-1,70 (m, 2H), 1,65-1,40 (m, 13H), 1,38-1,25 (m, 2H).

20



Preparación del compuesto 14e

25 Se añadieron DIPEA (53,0 ml, 302,5 mmol) y EDC.HCl (35,7 g, 186,2 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 2d (35,0 g, 116,4 mmol) y ácido 5-formilsalicílico (21,3 g, 128,0 mmol) en DCM (1,6 l) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 horas bajo N₂. Se diluyó la mezcla de reacción con disolución de NH₄Cl ac. saturada (1,5 l) y se extrajo con DCM (2 x 1,5 l). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (1,5 l) y se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 14e (28,2 g, 59 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 13,37 (s a, 1H), 9,86 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,07 (s a, 2H), 7,90 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,07 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,06-4,01 (m, 2H), 3,79-3,66 (m, 10H), 1,47 (s, 9H).

30

Preparación del compuesto 14f

35 A una disolución del compuesto 14e (28,0 g, 67,9 mmol) en MeCN (500 ml) se le añadieron el compuesto M (29,7 g, 74,7 mmol), tamiz molecular de 4 Å (30 g) y Ag₂O (62,9 g, 272 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 horas bajo N₂, se concentró la mezcla de reacción, se diluyó con H₂O (800 ml) y se extrajo con EtOAc (1 l). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 14f (30,1 g, 61 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,99 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 7,99 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,44 (s a, 1H), 7,18 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 5,45-5,30 (m, 4H), 4,26 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 4,02-3,97 (m, 2H), 3,80-3,55 (m, 13H), 2,06 (s, 9H), 1,46 (s, 9H).

40

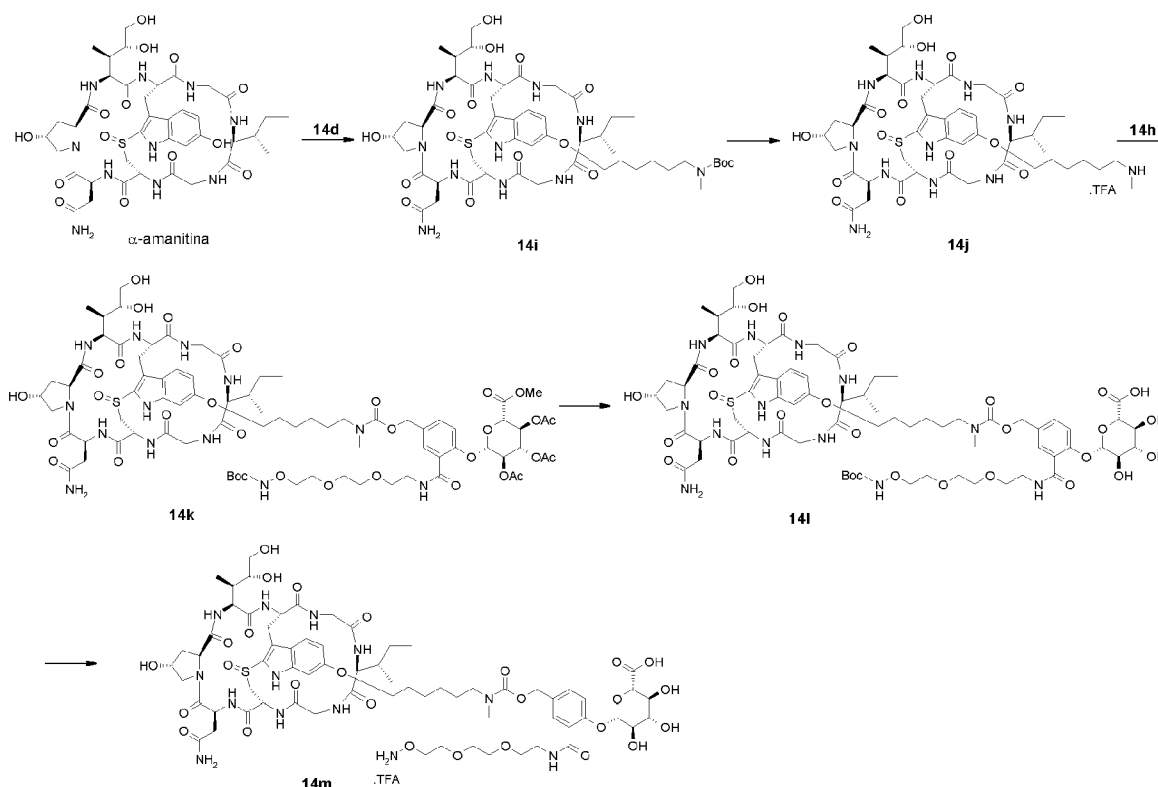
Preparación del compuesto 14g

45 A una disolución del compuesto 14f (29,0 g, 39,8 mmol) en *i*-PrOH/CHCl₃ (90 ml/450 ml) se añadió gel de sílice (16,7 g) y NaBH₄ (3,70 g, 99,5 mmol) a 0 °C. Después de agitar a 0 °C durante 2 horas bajo N₂, se extinguió la mezcla de reacción con H₂O (500 ml) y se extrajo con EtOAc (1 l). Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 14g (24,1 g, 83 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,98 (s, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,46 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,41 (a, 1H), 7,04 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 5,41-5,24 (m, 4H), 4,67 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,19 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 3,99-3,93 (m, 2H), 3,79-3,65 (m, 12H), 3,59-3,50 (m, 1H), 2,08-2,00 (m, 10H), 1,46 (s, 9H).

50

Preparación del compuesto 14h

A una disolución del compuesto 14g (23,7 g, 31,5 mmol) en DMF (50 ml) se le añadieron carbonato de bis(4-nitrofenilo) (8,9 g, 29,3 mmol) y DIPEA (5,65 ml, 31,5 mmol) a 0 °C bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 minutos y se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (500 ml) y se extrajo con EtOAc (500 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (2 x 200 ml), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 14h (22,4 g, 77 %) como una espuma de color blanco. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,28 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 8,13 (s, 1H), 7,68 (s a, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,47 (a, 1H), 7,38 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,08 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 5,44-5,24 (m, 6H), 4,21 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 4,00 (s a, 2H), 3,80-3,64 (m, 12 H), 3,64-3,54 (m, 1H), 2,06 (s, 9H), 1,47 (s, 9H).

Preparación del compuesto 14i

Se disolvió α -amanitina (60,0 mg, 0,065 mmol) en DMSO (2 ml) y se añadieron el compuesto 14d (114 mg, 0,39 mmol) y terc-butoxido de potasio (0,065 ml, 0,065 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 4 horas a 0 °C, se ajustó el pH de la disolución a 4-5 con ácido acético. Se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 14i (29 mg, 39 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M-Boc]⁺ 1032,4.

Preparación del compuesto 14j

A una disolución del compuesto 14i (29 mg, 0,026 mmol) en DCM (3 ml) se le añadió TFA (0,5 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂ y se purificó el residuo resultante mediante HPLC, que produjo el compuesto 14j (26 mg, 99 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1032,3, [M+Na]⁺ 1054,3.

Preparación del compuesto 14k

Se disolvieron el compuesto 14j (13 mg, 0,011 mmol), el compuesto 14h (10 mg, 0,011 mmol) y HOBt anhidro (0,3 mg, 0,002 mmol) en DMF (0,5 ml) a 0 °C. Luego se añadieron piridina (0,2 ml) y DIPEA (0,004 ml, 0,023 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas bajo N₂, se disolvió la mezcla de reacción en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 14k (11 mg, 54 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1788,1.

Preparación del compuesto 14l

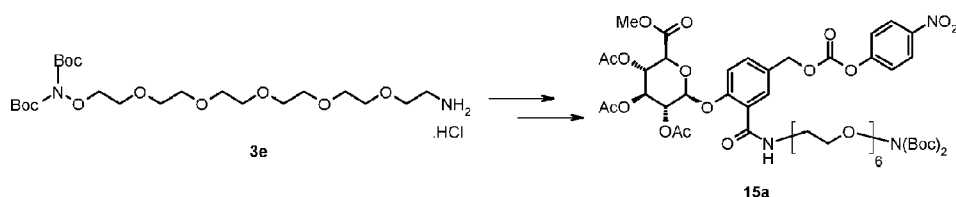
A una disolución del compuesto 14k (11 mg, 0,006 mmol) en MeOH (0,2 ml) se le añadió LiOH monohidratado

(1,3 mg, 0,03 mmol) en H₂O (0,2 ml) a -20 °C. Después de 1 hora a 0 °C, se ajustó el pH de la disolución a 4-5 con ácido acético. Se disolvió la disolución resultante en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 14i (7,5 mg, 75 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1648,6.

5 Preparación del compuesto 14m

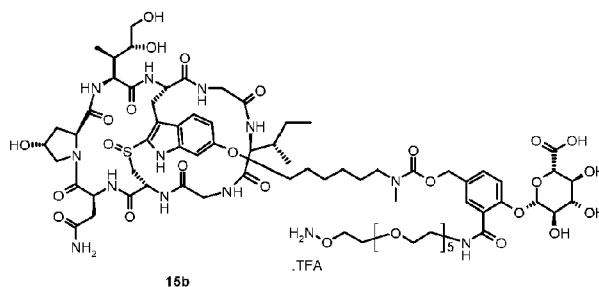
A una disolución del compuesto 14i (7,5 mg, 0,0045 mmol) en DCM (3 ml) se le añadió TFA (0,5 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se purificó el residuo mediante HPLC, que produjo el compuesto 14m (6,2 mg, 85 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺: 1548,5.

Ejemplo 24. Preparación del compuesto 15b



15 Preparación del compuesto 15a

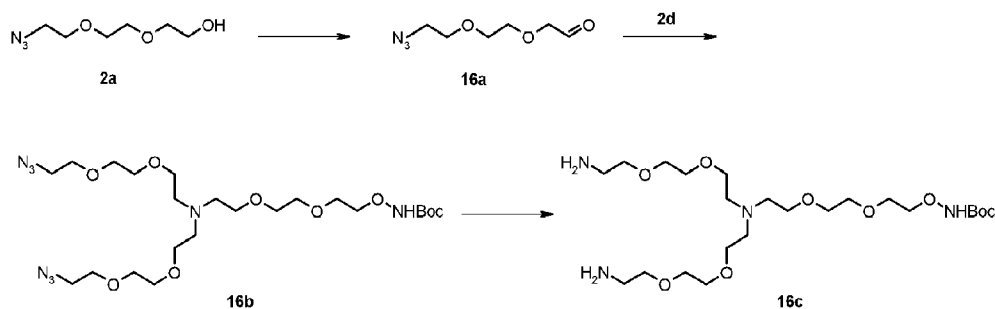
Se preparó el compuesto 15a a partir del compuesto 3e mediante un método similar al método de preparación del compuesto 14h del ejemplo 23. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1128,3, [M+H-Boc]⁺ 1028,3, [M+H-2Boc]⁺ 928,2.



Preparación del compuesto 15b

Se preparó el compuesto 15b a partir del compuesto 14j y compuesto 15a mediante un método similar al método de preparación del compuesto 14m del ejemplo 23. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1681,6.

Ejemplo 25. Preparación del compuesto 16f



Preparación del compuesto 16a

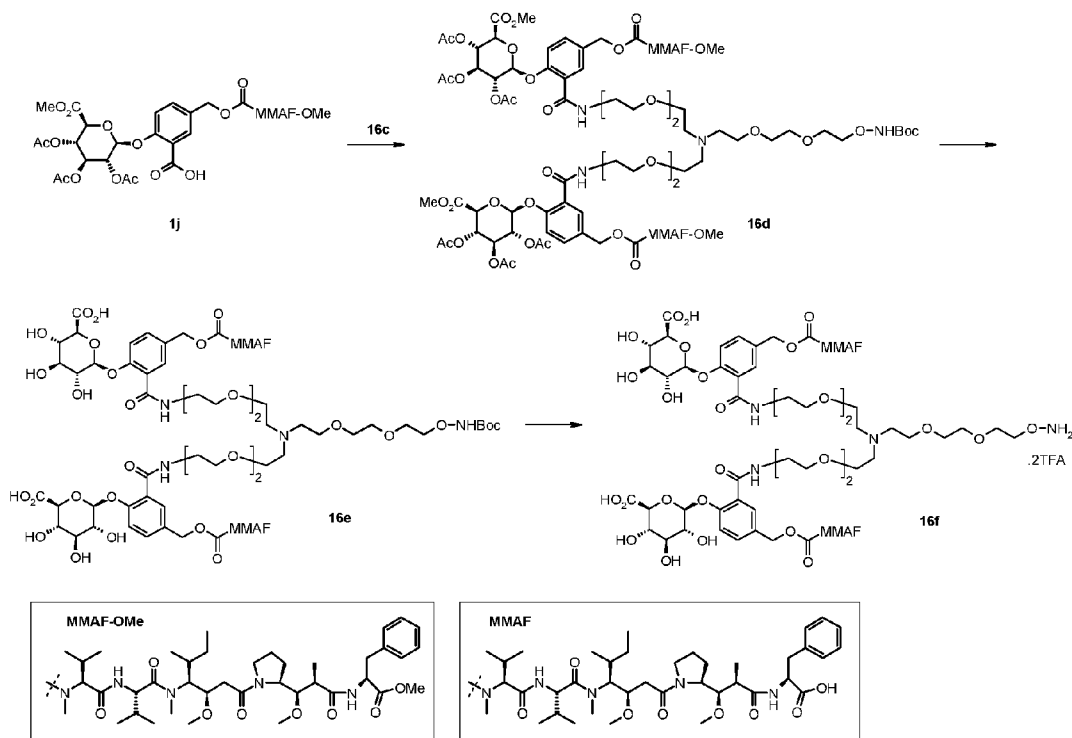
A una disolución con agitación de cloruro de oxalilo (2,8 ml, 32,5 mmol) en DCM (5 ml) se le añadió DMSO (3,08 ml, 43,4 mmol) en DCM (15 ml) y luego se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 30 minutos. A esta disolución se le añadió compuesto 2a (3,8 g, 21,7 mmol) a -78 °C y se agitó durante 1 hora. Se añadió trietilamina (15,1 ml, 108 mmol) en DCM (20 ml) y luego se dejó calentar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se diluyó con H₂O (100 ml) y se extrajo con DCM (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 16a (1,8 g, 48 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,74 (s, 1H), 4,19 (s, 2H), 3,77-3,69 (m, 6H), 3,42 (m, 2H).

Preparación del compuesto 16b

A una disolución del compuesto 16a (1,0 g, 3,32 mmol) y compuesto 2d (1,72 g, 9,96 mmol) en MeOH (15 ml) se le añadió AcOH (0,19 ml, 3,32 mmol) a 0 °C. Después de agitar durante 30 minutos a 0 °C, se añadió NaCNBH₃ (658 mg, 9,96 mmol) y se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (50 ml) y luego se extrajo con DCM (3 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 16b (800 mg, 41 %) como un aceite de color amarillento claro. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,78 (s, 1H), 4,01 (m, 2H), 3,69-3,65 (m, 24H), 3,39 (m, 4H), 3,04 (m, 6H), 1,47 (s, 9H).

Preparación del compuesto 16c

A una disolución del compuesto 16b (350 mg, 0,60 mmol) en MeOH (10 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 300 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (100 ml). La concentración proporcionó el compuesto 16c como un aceite incoloro (300 mg, 94 %), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,02 (m, 2H), 3,71 (m, 2H), 3,65-3,55 (m, 22H), 2,92 (m, 4H), 2,76 (t, *J* = 5,2 Hz, 6H), 1,47 (s, 9H). EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 527,6.

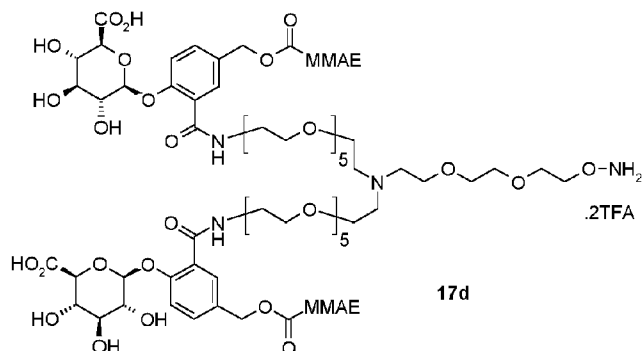


Preparación del compuesto 16d

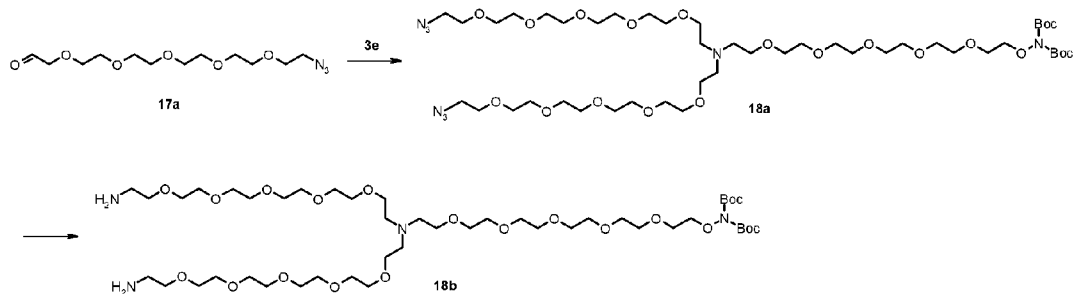
Se añadieron DIPEA (0,40 ml, 2,24 mmol) y PyBOP (711 mg, 1,34 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 1j (1,57 g, 1,23 mmol) y compuesto 16c (300 mg, 0,56 mmol) en DMF (15 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (200 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se disolvió el residuo en H₂O/DMSO (5 ml/5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 16d (1,57 g, 91,8 %). EI-EM *m/z*: 1/2[M+H]⁺ 1502,7.

Preparación del compuesto 16f

A una disolución del compuesto 16d (1,10 g, 0,36 mmol) en MeOH/THF (5 ml/10 ml) se le añadió gota a gota NaOH (175 mg, 4,32 mmol) en H₂O (3 ml) a 0 °C. Después de 3 horas a 0 °C, se ajustó el pH de la disolución a pH 4 usando HCl ac. 2 N y se concentró. Se diluyó el residuo con DCM (12 ml) y TFA (3 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Se disolvió el residuo en H₂O/MeCN (7,5 ml/7,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 16f (432 mg, 46 %) como un sólido de color blanco. EI-EM *m/z*: 1/2[M+H]⁺ 1298,5.

Preparación del compuesto 17d

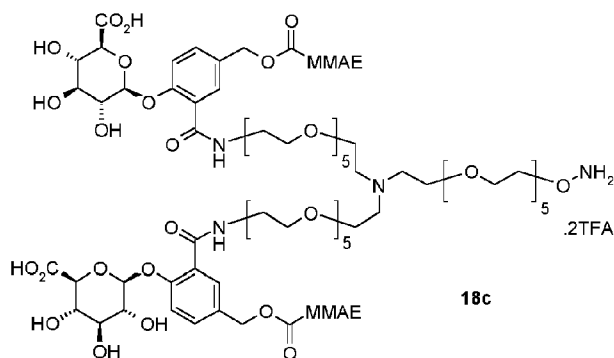
- 5 Se preparó el compuesto 17d a partir del compuesto 1i y compuesto 17c mediante un método similar de preparación del compuesto 16f en el ejemplo 25. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1415,6.

Ejemplo 28. Preparación del compuesto 18cPreparación del compuesto 18a

15 Se añadió NaCNBH_3 (197 mg, 3,14 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 17a (998 mg, 3,26 mmol) y compuesto 3e (670 mg, 1,25 mmol) en MeOH (4 ml) a 0 °C. Luego se calentó gradualmente la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1), que produjo el compuesto 18a (668 mg, 49 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 3,97 (m, 2H), 3,63-3,57 (m, 6H), 3,56-3,44 (m, 46H), 3,44-3,36 (m, 12H), 2,66-2,61 (m, 6H), 1,45 (s, 18H).

Preparación del compuesto 18b

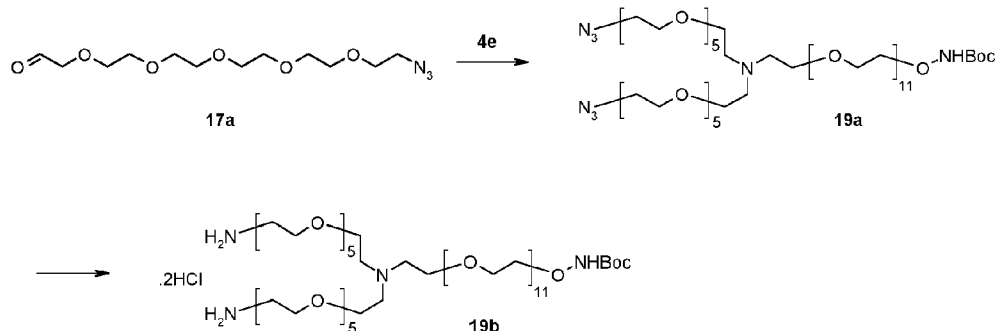
25 A una disolución del compuesto 18a (60 mg, 0,055 mmol) en MeOH (1,2 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 6 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (400 ml). La concentración proporcionó el compuesto 18b (55 mg, 96 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 3,97 (m, 2H), 3,62-3,57 (m, 4H), 3,54-3,45 (m, 50H), 3,45-3,39 (m, 10H), 2,66-2,61 (m, 10H), 1,46 (s, 18H). EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1023,3.



Se preparó el compuesto 18c a partir del compuesto 1i y compuesto 18b mediante un método similar de preparación del compuesto 16f en el ejemplo 25. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1481,7.

Ejemplo 29. Preparación del compuesto 19c

5



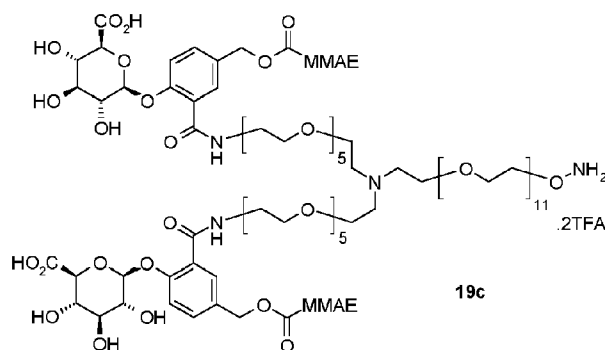
Preparación del compuesto 19a

- 10 Se añadió NaCNBH_3 (197 mg, 3,14 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 17a (118 mg, 0,16 mmol) y compuesto 4e (232 mg, 0,76 mmol) en MeOH (1 ml) a 0 °C. Luego se calentó gradualmente la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se evaporó la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1), que produjo el compuesto 19a (135 mg, 68 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,72 (s a, 1H), 4,02 (t, 2H), 3,72-3,53 (m, 86H), 3,39 (t, 4H), 2,77 (s a, 4H), 1,47 (s, 9H). EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1239,6.
- 15

Preparación del compuesto 19b

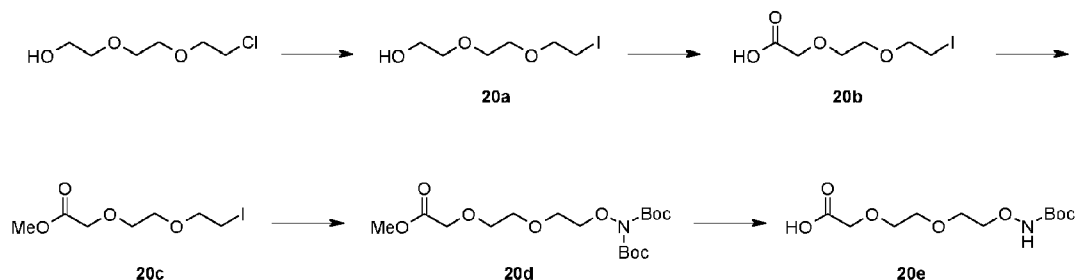
- 20 A una disolución del compuesto 19a (133 mg, 0,107 mmol) en MeOH (2 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 26 mg) y HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,054 ml, 0,21 mmol) a 0 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 40 minutos bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). La concentración proporcionó el compuesto 19b (132 mg, 97 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,79 (s, 1H), 4,06-4,02 (m, 8H), 3,88 (m, 2H), 3,73-3,64 (m, 80H), 3,22 (s, 4H), 1,47 (s, 9H). EI-EM m/z: $[M+H]^+$: 1187,5.
- 25

Preparación del compuesto 19c



- 30 Se preparó el compuesto 19c a partir del compuesto 1i y compuesto 19b mediante un método similar de preparación del compuesto 16f en el ejemplo 25. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1614,5.

Ejemplo 30. Preparación del compuesto 20q



5 Preparación del compuesto 20a

A una disolución de 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etanol (5,0 g, 29,6 mmol) en acetona (30 ml) se le añadió NaI (13,3 g, 88,9 mmol). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 20a (7,0 g, 91 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,80-3,73 (m, 4H), 3,72-3,65 (m, 4H), 3,63-3,61 (m, 2H), 3,27 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 20b

A una disolución del compuesto 20a (7,0 g, 26,9 mmol) en acetona (200 ml) a 0 °C se le añadió reactivo de Jones (20 ml). Después de 15 horas a 0 °C, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se diluyó el residuo con H₂O (150 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 20b (7,0 g, 94 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,22 (s, 2H), 3,85-3,70 (m, 6H), 3,35-3,25 (m, 2H).

Preparación del compuesto 20c

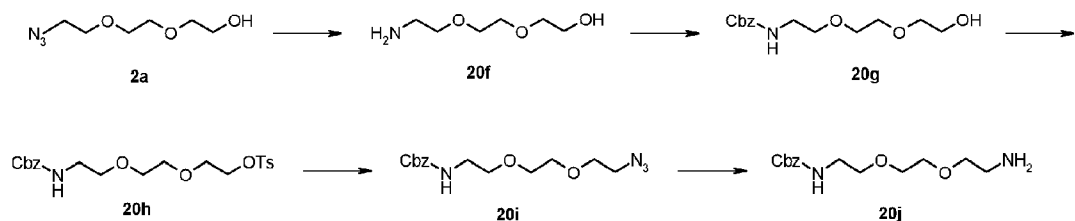
A una disolución del compuesto 20b (7,0 g, 25,5 mmol) en MeOH (70 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (3,2 ml, 38,3 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 16 horas, se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 20c (5,7 g, 77 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,19 (s, 2H), 3,80-3,67 (m, 9H), 3,27 (t, J = 6,8 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 20d

A una disolución del compuesto 20c (2,5 g, 8,67 mmol) y N,N-diBoc-hidroxiilamina (2,6 g, 11,2 mmol) en DMF (30 ml) se le añadió NaH (60 % en aceite, 454 mg, 10,4 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 15 horas, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 20d (1,87 g, 73 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,17 (s, 2H), 4,08 (m, 2H), 3,78-3,65 (m, 9H), 1,53 (s, 18H).

Preparación del compuesto 20e

A una disolución del compuesto 20d (1,87 g, 6,38 mmol) en THF/MeOH/H₂O (45 ml/15 ml/15 ml) se le añadió NaOH (600 mg, 15,9 mmol) a 0 °C bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego se ajustó el pH de la disolución a 4-5 con HCl acuoso 1 N. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. Se produjo el compuesto 20e (1,6 g, 90 %) como un aceite incoloro y se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,17 (s, 2H), 4,08-4,02 (m, 2H), 3,80-3,67 (m, 6H), 1,48 (s, 9H).



Preparación del compuesto 20f

Se añadió Pd/C (10 % en peso, 1,0 g) a una disolución del compuesto 2a (6,7 g, 38,2 mmol) en MeOH (38 ml).

Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (100 ml). La concentración proporcionó el compuesto 20f (5,6 g, 99 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,95-3,25 (m, 12H), 2,90 (s, 2H).

Preparación del compuesto 20g

Se añadió lentamente cloroformiato de bencilo (6 ml, 42,2 mmol) a una disolución del compuesto 20f (5,6 g, 38,2 mmol) y trietilamina (8 ml, 57,6 mmol) en THF (200 ml) a 0 °C durante 30 minutos bajo N₂. Después de agitar durante 1 hora a 0 °C, se concentró la mezcla de reacción y se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 20g (5,7 g, 53 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,20 (m, 5H), 5,61 (s a, 1H), 5,07 (s, 2H), 3,85-3,20 (m, 12H).

Preparación del compuesto 20h

A una disolución del compuesto 20g (2,7 g, 9,53 mM) en DCM (30 ml) se le añadieron trietilamina (1,9 ml, 12,3 mmol) y cloruro de *p*-toluenosulfonilo (2,3 g, 10,4 mmol) a temperatura ambiente bajo N₂. Después de 8 horas, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (50 ml) y se extrajo con DCM (3 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 20h (3,51 g, 84 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,78 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,45-7,25 (m, 7H), 5,20 (s a, 1H), 5,09 (s, 2H), 4,20-4,05 (m, 2H), 3,75-3,25 (m, 10H), 2,43 (s, 3H).

Preparación del compuesto 20i

Se calentó una disolución del compuesto 20h (3,51 g, 8,02 mmol) y NaN₃ (3,8 g, 57,6 mmol) en DMF (27 ml) a 100 °C durante 15 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se diluyó el residuo con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 20i (2,05 g, 83 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,25 (m, 5H), 5,20 (s a, 1H), 5,10 (s, 2H), 3,80-3,25 (m, 12H).

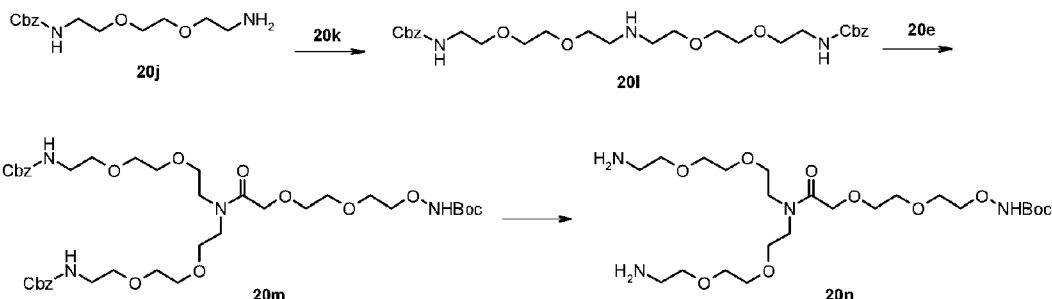
Preparación del compuesto 20j

Se añadió trifenilfosfina (2,09 g, 7,97 mmol) a una disolución del compuesto 20i (2,05 g, 6,64 mmol) en THF (27 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas bajo N₂, se añadió H₂O (0,6 ml, 33,2 mmol) y se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 3 horas. Luego se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 20j (1,78 g, 95 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,25 (m, 5H), 5,63 (s a, 1H), 5,10 (s, 2H), 3,80-3,25 (m, 10H), 2,88 (s, 2H).

1)



2)



Preparación del compuesto 20k

A una disolución con agitación de cloruro de oxalilo (1,4 ml, 15,9 mmol) en DCM (14 ml) se le añadió DMSO (2,3 ml, 31,9 mmol) en DCM (28 ml) y luego se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 30 minutos. A esta disolución se le añadió el compuesto 20g (3,01 g, 10,6 mmol) a -78 °C. Después de agitar durante 1 hora a -78 a 0°C, se añadió trietilamina (7,4 ml, 53,1 mmol) y se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄. La filtración y concentración produjeron el compuesto 20k (2,6 g), que se usó sin purificación adicional. ¹H-

RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 9,70 (s, 1H), 7,45-7,25 (m, 5 H), 5,25 (s a, 1 H), 5,10 (s, 2 H), 3,80-3,25 (m, 10 H).

Preparación del compuesto 20l

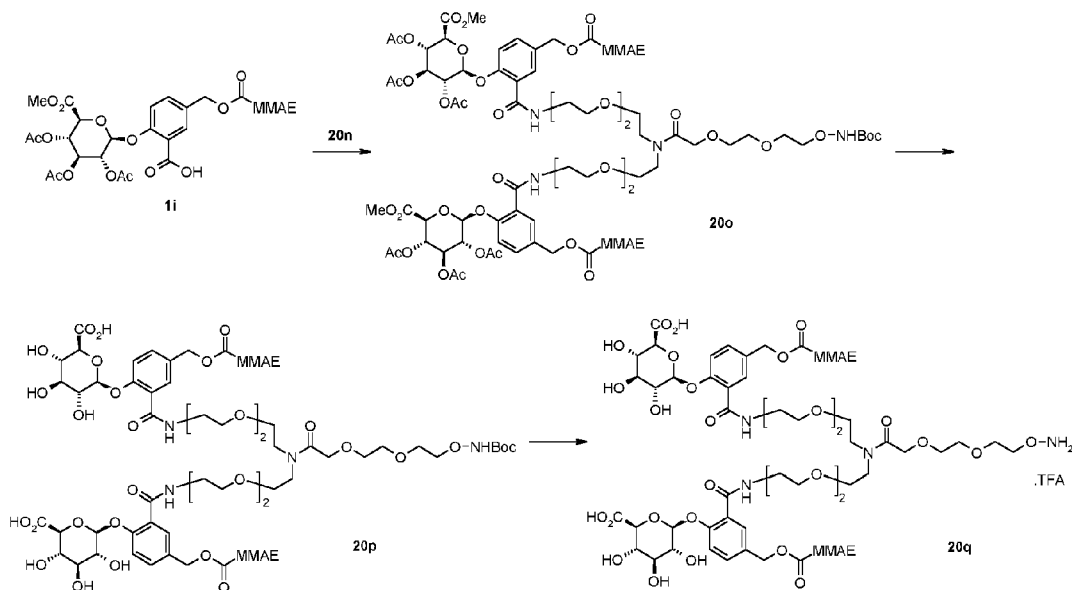
A una disolución del compuesto 20j (1,78 g, 6,30 mmol) y compuesto 20k (2,13 g, 7,56 mmol) en MeOH (63 ml) se le añadió NaCNBH_3 (674 mg, 10,7 mmol) a temperatura ambiente bajo N_2 . Después de 3 horas, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 20l (2,01 g, 58 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,45-7,25 (m, 10H), 5,60 (s a, 2H), 5,03 (s, 4H), 3,80-3,25 (m, 20H), 2,81 (s, 4H).

Preparación del compuesto 20m

Se añadieron DIPEA (0,4 ml, 2,28 mmol) y PyBOP (713 mg, 1,36 mmol) a una disolución con agitación del compuesto 20l (500 mg, 0,91 mmol) y compuesto 20e (306 mg, 1,09 mmol) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas bajo N_2 , se diluyó la mezcla de reacción con agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 20m (318 mg, 43 %). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,45-7,25 (m, 10H), 5,47 (s a, 1H), 5,37 (s a, 1H), 5,09 (s, 4H), 3,80-3,25 (m, 34H), 1,46 (s, 9H). EI-EM m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 808,9.

Preparación del compuesto 20n

A una disolución del compuesto 20m (318 mg, 0,39 mmol) en MeOH (30 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 1,0 g). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (100 ml). La concentración proporcionó el compuesto 20n (180 mg) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 541,2.



Preparación del compuesto 20o

Se añadieron DIPEA (0,034 ml, 0,19 mmol) y PyBOP (63 mg, 0,12 mmol) a una disolución con agitación del compuesto 1i (130 mg, 0,10 mmol) y compuesto 20n (26 mg, 0,04 mmol) en DMF (3 ml) a 0 °C. Después de agitar a 0 °C durante 30 minutos, se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente durante 20 horas bajo N_2 . Se vertió la mezcla de reacción en H_2O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 20o (28 mg, 10 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: $1/2[\text{M}+\text{H}]^+$ 1481,5, $1/2[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1503,8.

Preparación del compuesto 20p

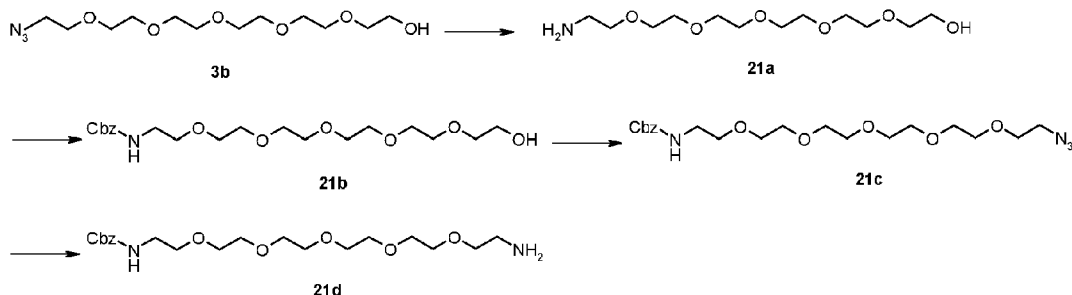
A una disolución del compuesto 20o (28 mg, 0,009 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió LiOH monohidratado (2 mg, 0,047 mmol) en H_2O (1 ml) a -5 °C. Se agitó la mezcla de reacción a -5 °C durante 1 hora. Después de completarse la reacción, se ajustó el pH de la disolución a 4-5 con ácido acético. Se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 20p (16 mg, 67 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z:

$1/2[M+H]^+$: 1341,4.

Preparación del compuesto 20q

- 5 A una disolución del compuesto 20p (16 mg, 0,0059 mmol) en DCM (2 ml) se le añadió TFA (0,2 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 20q (8,5 mg, 56 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z : $1/2[M+H]^+$: 1291,3.

10 Ejemplo 31. Preparación del compuesto 21i



Preparación del compuesto 21a

- 15 A una disolución del compuesto 3b (9,0 g, 29,2 mmol) en MeOH (146 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 3,0 g) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 horas bajo hidrógeno. Luego se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (100 ml). La concentración proporcionó el compuesto 21a (8,2 g, 100 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,80-3,60 (m, 24H), 3,01 (t, J = 4,8 Hz, 2H).
- 20

Preparación del compuesto 21b

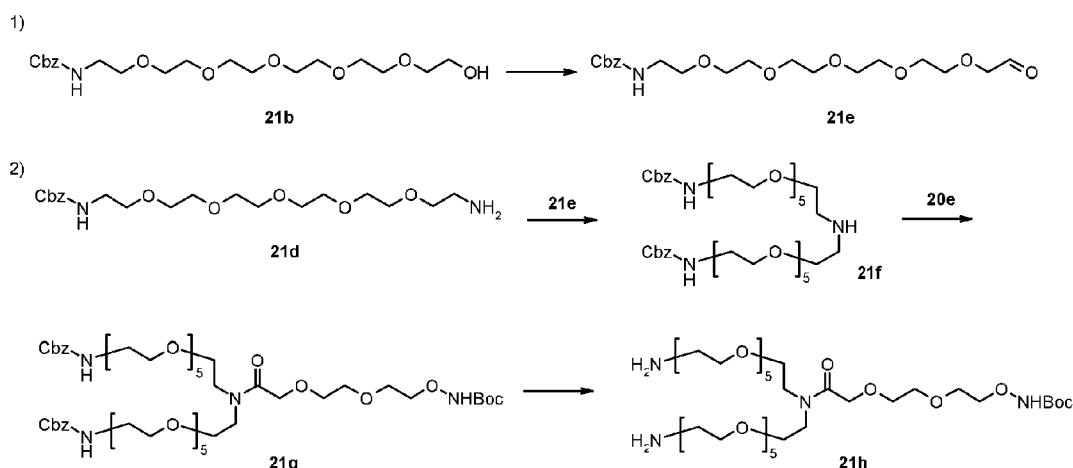
- 25 A una disolución del compuesto 21a (8,24 g, 29,2 mmol) en THF (190 ml) se le añadió trietilamina (6,1 ml, 43,9 mmol) y clorocarbonato de bencilo (4,6 ml, 32,2 mmol) a 0 °C bajo N₂. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 21b (5,59 g, 46 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,20 (m, 5H), 5,61 (s a, 1H), 5,09 (s, 2H), 3,85-3,50 (m, 22H), 3,39 (m, 2H).

Preparación del compuesto 21c

- 30 A una disolución del compuesto 21b (3,09 g, 7,43 mmol) en THF (75 ml) se le añadieron 4-metilmorfolina (1,1 ml, 9,66 mmol) y anhídrido metanosulfónico (1,43 g, 8,18 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 5 horas a 0 °C, se añadieron NaN₃ (969 mg, 14,9 mmol) y DMF (20 ml). Después de 16 horas a reflujo, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se diluyó el residuo con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 21c (2,62 g, 80 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,20 (m, 5 H), 5,45 (s a, 1 H), 5,09 (s, 2 H), 3,85-3,25 (m, 24 H).
- 35

Preparación del compuesto 21d

- 40 Se añadió trifetilfosfina (1,87 g, 7,13 mmol) a una disolución del compuesto 21c (2,62 g, 5,94 mmol) en THF (30 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas bajo N₂, se añadió H₂O (0,54 ml, 29,7 mmol) y se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 3 horas. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 21d (2,47 g, 95 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,25 (m, 5 H), 5,63 (s a, 1 H), 5,09 (s, 2 H), 3,80-3,25 (m, 22 H), 3,00-2,80 (m, 2 H).
- 45



Preparación del compuesto 21e

5 A una disolución con agitación de cloruro de oxalilo (0,78 ml, 9,02 mmol) en DCM (14 ml) se le añadió DMSO (1,3 ml, 18,1 mmol) en DCM (6 ml) y luego se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 30 minutos. A esta disolución se le añadió el compuesto 21b (2,5 g, 6,01 mmol) a -78 °C. Después de agitar durante 1 hora a -78 °C, se añadió trietilamina (4,2 ml, 30,1 mmol) y se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄. La filtración y concentración produjeron el compuesto 21e (2,29 g), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,70 (s, 1H), 7,45-7,25 (m, 5H), 5,25 (s a, 1H), 5,10 (s, 2H), 3,80-3,25 (m, 24H).

Preparación del compuesto 21f

15 A una disolución del compuesto 21d (2,47 g, 5,95 mmol) y compuesto 21e (2,29 g, 5,52 mmol) en MeOH (50 ml) se le añadió NaCNBH₃ (530 mg, 8,44 mmol) a temperatura ambiente bajo N₂. Después de 3 horas, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 21f (2,05 g, 51 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,25 (m, 10H), 5,47 (s a, 1H), 5,37 (s a, 1H), 5,09 (s, 4H), 3,80-3,25 (m, 48H).

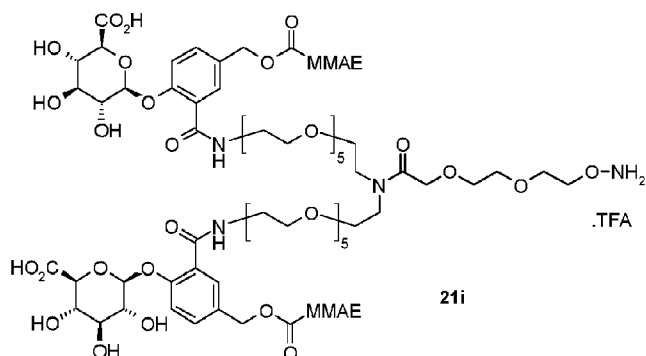
Preparación del compuesto 21g

25 Se añadieron DIPEA (0,27 ml, 1,53 mmol) y HBTU (350 mg, 0,92 mmol) a una disolución con agitación del compuesto 21f (380 mg, 0,61 mmol) y compuesto 20e (206 mg, 0,73 mmol) en DMF (6 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 21g (210 mg, 42 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,25 (m, 10 H), 5,47 (s a, 1 H), 5,37 (s a, 1 H), 5,09 (s, 4 H), 3,80-3,25 (m, 34 H), 1,46 (s, 9 H).

Preparación del compuesto 21h

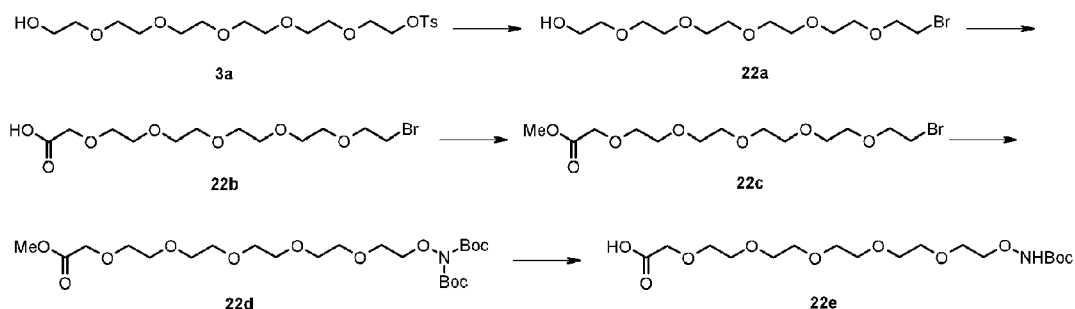
35 A una disolución del compuesto 21g (210 mg, 0,19 mmol) en MeOH (30 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 1,0 g) y luego se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas bajo hidrógeno. Se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (50 ml). La concentración proporcionó el compuesto 21h (30 mg) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 805,2, [M+Na]⁺ 827,2.

Preparación del compuesto 21i



- 5 Se preparó el compuesto 21i a partir del compuesto 1i y compuesto 21h mediante un método similar de preparación del compuesto 20g en el ejemplo 30. El-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1423.7, 1/2[M+Na]⁺ 1445.2.

Ejemplo 32. Preparación del compuesto 22h



Preparación del compuesto 22a

- 15 A una disolución del compuesto 3a (8,0 g, 18,3 mmol) en THF (50 ml) se le añadió LiBr (7,9 g, 91,6 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 17 horas a reflujo, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 22a (3,2 g, 50 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3.95-3.50 (m, 24H).

Preparación del compuesto 22b

- A una disolución del compuesto 22a (3,2 g, 12,3 mmol) en acetona (20 ml) a 0 °C se le añadió reactivo de Jones (20 ml). Después de 15 horas a 0 °C, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se diluyó el residuo con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 22b (3,2 g, 72 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,16 (s, 2H), 3,95-3,30 (m, 20H).

Preparación del compuesto 22c

- 30 A una disolución del compuesto 22b (3,2 g, 8,90 mmol) en MeOH (30 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (1,15 ml, 13,3 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 16 horas, se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 22c (2,7 g, 81 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,17 (s, 2H), 3,80-3,60 (m, 21H), 3,47 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

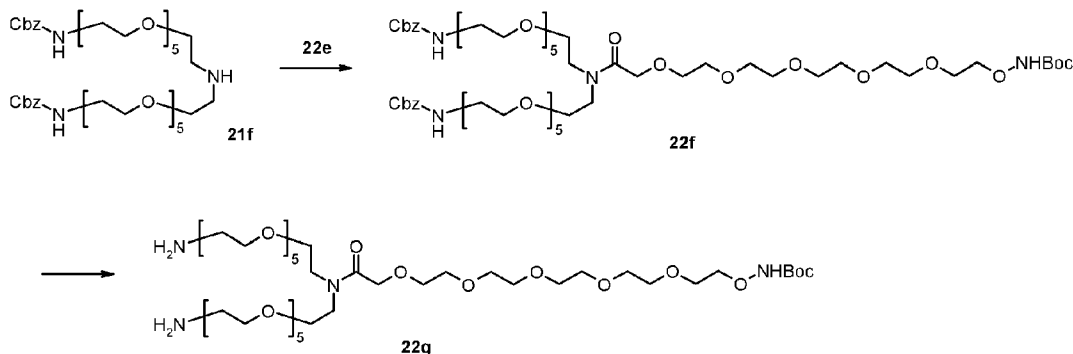
Preparación del compuesto 22d

- Se añadió NaH (60 % en aceite, 378 mg, 8,63 mmol) a una disolución del compuesto 22c (2,7 g, 7,23 mmol) y *N,N*-diBoc-hidroxilamina (2,2 g, 9,4 mmol) en DMF (30 ml) a 0 °C bajo N₂. Después de 17 horas, se concentró la mezcla de reacción. Se diluyó el residuo con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 22d (2,1 g, 55 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,17 (s, 2H), 4,08 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,78-3,60 (m, 21H), 1,53 (s, 18H).

Preparación del compuesto 22e

A una disolución del compuesto 22d (2,1 g, 3,99 mmol) en THF/MeOH/H₂O (30 ml/10 ml/10 ml) se le añadió NaOH (400 mg, 9,98 mmol) a 0 °C bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego se ajustó el pH de la disolución a 4-5 con HCl acuoso 1 N. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄. La filtración y concentración produjeron el compuesto 22e (1,6 g) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 4.15 (s, 2H), 4.03 (s a, 2H), 3.80-3.60 (m, 18H), 1.47 (s, 9H).



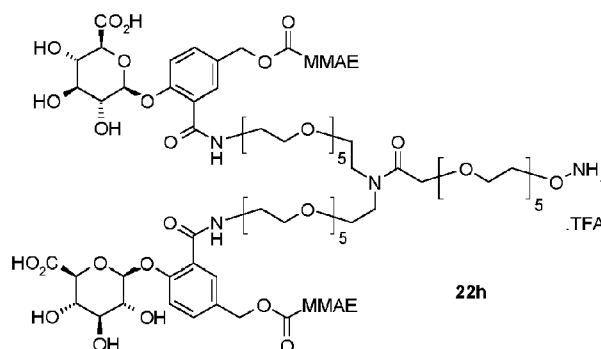
Preparación del compuesto 22f

Se añadieron DIPEA (0,13 ml, 0,73 mmol) y HBTU (187 mg, 0,49 mmol) a una disolución con agitación del compuesto 21f (200 mg, 0,24 mmol) y compuesto 22e (152 mg, 0,36 mmol) en DMF (5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 6 horas bajo N₂. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 22f (100 mg, 34 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1205,6.

Preparación del compuesto 22g

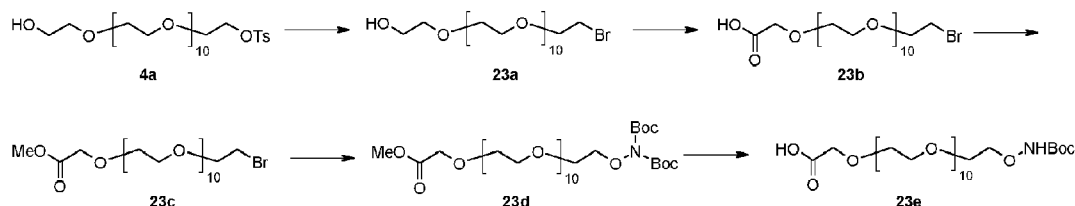
A una disolución del compuesto 22f (100 mg, 0,08 mmol) en MeOH (20 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 20 mg) y luego se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas bajo hidrógeno. Se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (20 ml). La concentración proporcionó el compuesto 22g como un aceite incoloro (70 mg), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 937,4, [M+Na]⁺ 959,3.

Preparación del compuesto 22h



Se preparó el compuesto 22h a partir del compuesto 1i y compuesto 22g mediante un método similar de preparación del compuesto 20g en el ejemplo 30. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1489.4.

Ejemplo 33. Preparación del compuesto 23h



5 Preparación del compuesto 23a

A una disolución del compuesto 4a (483 mg, 0,69 mmol) en THF (10 ml) se le añadió LiBr (180 mg, 2,06 mmol). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 12 horas bajo N₂. Luego se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 23a (330 mg, 78 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,81 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,72-3,59 (m, 44H), 3,47 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 23b

A una disolución del compuesto 23a (330 mg, 0,54 mmol) en acetona (2 ml) a 0 °C se le añadió reactivo de Jones (2 ml). Después de 15 horas a 0 °C, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se diluyó el residuo con H₂O (15 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 20 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se usó el compuesto resultante en bruto 23b sin purificación adicional.

Preparación del compuesto 23c

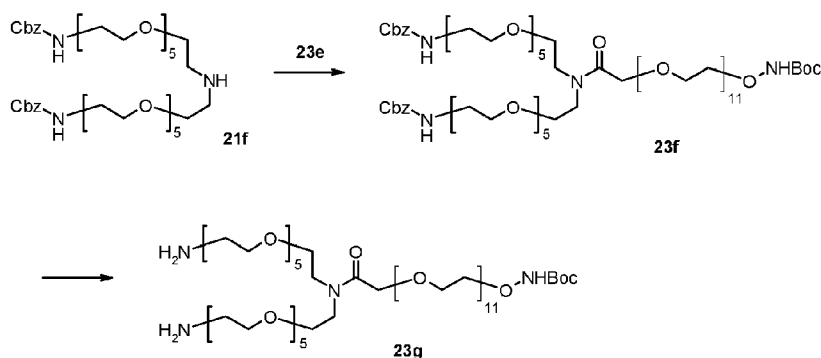
A una disolución del compuesto en bruto 23b (266 mg, 0,43 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (0,054 ml, 0,64 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 16 horas, se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 23c (200 mg, 58 % para 2 etapas). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,17 (s, 2H), 3,81 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,79-3,64 (m, 43H), 3,48 (t, J = 6,4 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 23d

A una disolución del compuesto 23c (200 mg, 0,31 mmol) en DMF (3 ml) se le añadieron *N,N*-diBoc-hidroxilamina (95 mg, 0,40 mmol) y NaH (60 % en aceite, 16 mg, 0,37 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 17 horas, se concentró la mezcla de reacción. Se diluyó el residuo con H₂O (5 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 23d (120 mg, 49 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,17 (s, 2H), 4,13 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,75-3,64 (m, 45H), 1,53 (s, 18H).

Preparación del compuesto 23e

A una disolución del compuesto 23d (120 mg, 0,15 mmol) en THF/MeOH/H₂O (3 ml/1 ml/1 ml) se le añadió NaOH (15 mg, 0,38 mmol) a 0 °C bajo N₂. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se ajustó el pH de la disolución a 4-5 con HCl acuoso 1 N. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O (10 ml) y se extrajo con CHCl₃ (2 x 20 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. La filtración y concentración produjeron el compuesto 23e (100 mg), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,23 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 4,15 (s, 2H), 4,08 (t, J = 4,0 Hz, 1H), 4,01 (t, J = 4,0 Hz, 1H), 3,74-3,64 (m, 40H), 1,53 (s, 9H).

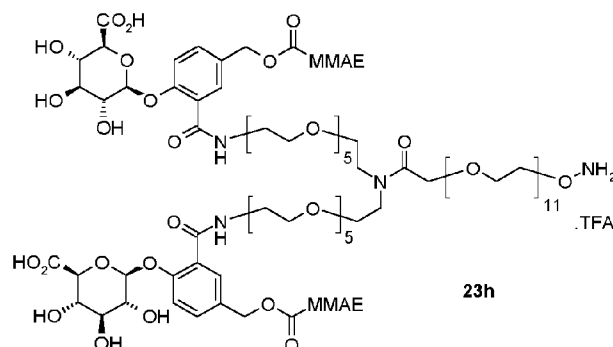


Preparación del compuesto 23f

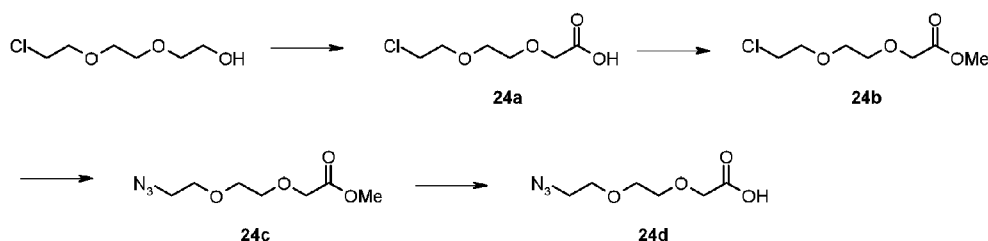
Se añadieron DIPEA (0,052 ml, 0,29 mmol) y HBTU (75 mg, 0,20 mmol) a una disolución con agitación del compuesto 21f (80 mg, 0,09 mmol) y compuesto 23e (100 mg, 0,15 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 23f (140 mg, 97 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,38-7,31 (m, 10 H), 5,44 (a, 2 H), 5,09 (s, 4 H), 4,34 (s, 2 H), 4,26-4,17 (m, 4 H), 4,09-4,08 (m, 1 H), 4,07 (a, 1 H), 3,73-3,47 (m, 76 H), 3,39-3,38 (m, 4 H), 1,53 (s, 9 H). EI-EM m/z: [M+Na]⁺ 1491,6, [M+H-Boc]⁺: 1369,6.

Preparación del compuesto 23g

A una disolución del compuesto 23f (140 mg, 0,09 mmol) en MeOH (20 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 20 mg) y luego se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas bajo hidrógeno. Se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (20 ml). La concentración proporcionó el compuesto 23g como un aceite incoloro (120 mg), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1201,7, [M+Na]⁺ 1223,7.

Preparación del compuesto 23h

Se preparó el compuesto 23h a partir del compuesto 1i y compuesto 23g mediante un método similar de preparación del compuesto 20q en el ejemplo 30. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1620,3, 1/2[M+Na]⁺ 1632,1.

Ejemplo 34. Preparación del compuesto 24iPreparación del compuesto 24a

Se añadió lentamente reactivo de Jones (90 ml) a una disolución del compuesto 2-[2-(2-cloroetoxi)etoxi]etanol (15,0 g, 88,9 mmol) en acetona (600 ml) a 0 °C. Después de 15 horas a 0 °C, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se diluyó el residuo con H₂O (200 ml) y se extrajo con CHCl₃ (5 x 300 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro. La concentración proporcionó el compuesto 24a (20,0 g), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,18 (s, 2H), 3,81-3,64 (m, 8H).

Preparación del compuesto 24b

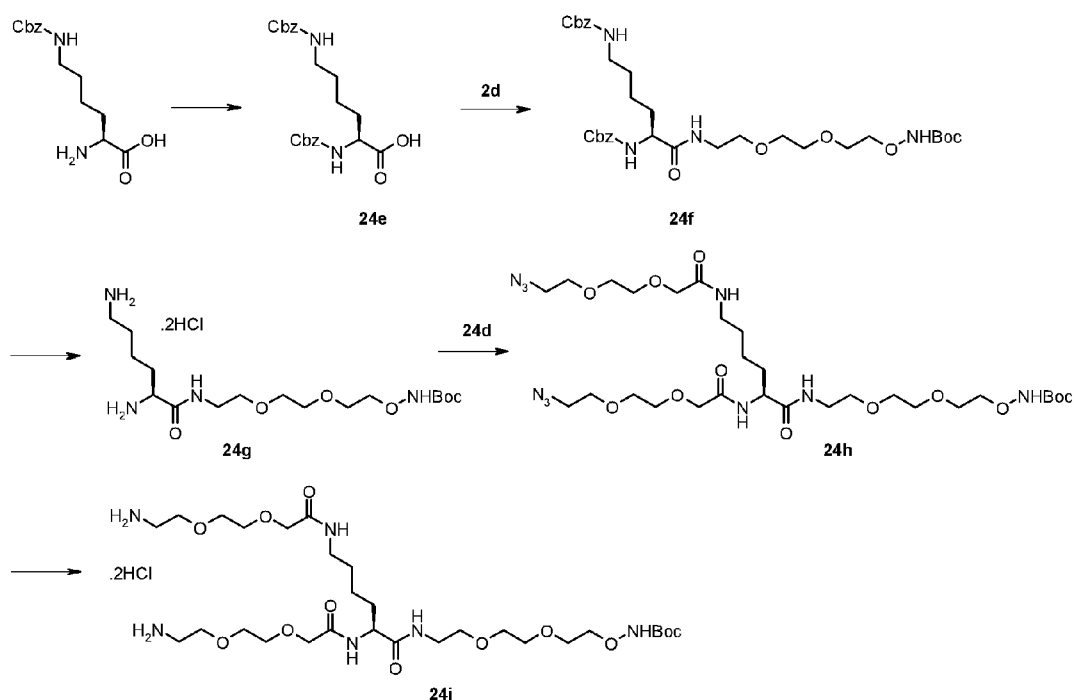
A una disolución del compuesto 24a (20,0 g, 88,9 mmol) en MeOH (500 ml) se le añadió cloruro de oxalilo (11,5 ml, 133,4 mmol) a 0 °C durante 30 minutos bajo N₂. Después de 16 horas, se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 24b (13,0 g, 75 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,18 (s, 2H), 3,78-3,67 (m, 9H), 3,65 (t, J = 5,6 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 24c

Se disolvieron el compuesto 24b (13,0 g, 66,1 mmol) y NaN₃ (6,4 g, 99,2 mmol) en DMF (130 ml). Después de agitar a 100 °C durante 2 horas, se diluyó la mezcla de reacción con salmuera (200 ml) y se extrajo con CHCl₃ (2 x 100 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ anhidro. La concentración proporcionó el compuesto 24c (11,7 g, 87 %), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,18 (s, 2H), 3,76-3,67 (m, 9H), 3,41 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 24d

A una disolución del compuesto 24c (11,5 g, 56,6 mmol) en THF/MeOH/H₂O (300 ml/100 ml/100 ml) se le añadió NaOH (4,53 g, 113,2 mmol) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C bajo N₂, se ajustó el pH de la disolución a 2 con HCl acuoso 4 M. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O (100 ml) y se extrajo con CHCl₃ (3 x 500 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄. La filtración y concentración produjeron el compuesto 24d (10,7 g, 99 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,19 (s, 2H), 3,79-3,77 (m, 2H), 3,72-3,70 (m, 4H), 3,44 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 24e

Se cargó un matraz de tres bocas consecutivamente con H₂O (40 ml), 1,4-dioxano (70 ml) y H-Lys(Z)-OH (10 g, 35,7 mmol). Se agitó la mezcla hasta disolución completa. Se ajustó el pH a aproximadamente 10,5 mediante adición de Na₂CO₃ acuoso 2 M. Se añadió cloroformato de bencilo (6,69 g, 39,2 mmol) mientras se mantenía el pH a aproximadamente 10-11 añadiendo al mismo tiempo Na₂CO₃ acuoso 2 M. Después de completar la adición, se agitó la mezcla de reacción a 20 °C durante 1 hora. Luego se añadió EtOAc (50 ml) y se ajustó el pH de la mezcla resultante a 2-3 con c-HCl. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄. La filtración y concentración a presión reducida dieron el compuesto 24e como un aceite de color amarillento (14,7 g, 99 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33-7,27 (m, 10H), 5,07-5,04 (d, 4H), 4,08 (m, 1H), 3,09 (t, 2H), 1,51 (s a, 1H), 1,49 (s a, 1H), 1,47-1,40 (m, 4H).

Preparación del compuesto 24f

Se añadieron DIPEA (0,40 ml, 2,37 mmol), HOBT (143 mg, 1,06 mmol) y EDC·HCl (240 mg, 1,25 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 24e (400 mg, 0,96 mmol) y compuesto 2d (261 mg, 0,86 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (50 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml), se lavó con NaHCO₃ ac. (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 24f (380 mg, 59 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,16 (s, 1H), 7,34-7,28 (m, 10H), 7,49 (s, 1H), 5,08-5,07 (m, 5H), 4,17 (m, 1H), 3,99 (t, 2H), 3,68-3,16 (m, 10H), 3,17 (d, 2H), 1,66 (m, 1H), 1,51-1,27 (m, 14H). EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 661,0.

Preparación del compuesto 24g

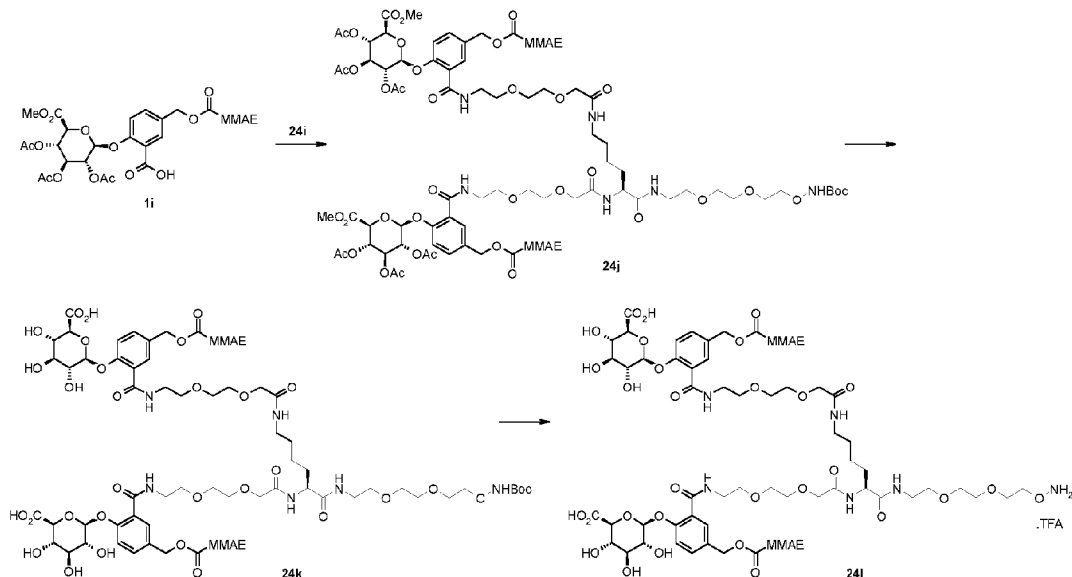
A una mezcla con agitación del compuesto 24f (370 mg, 0,55 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 74 mg) en MeOH (10 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,27 ml, 1,1 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 24g (223 mg, 87 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,02 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,22 (a, 2H), 7,90 (a, 2H), 3,81 (t, 2H), 3,56 (m, 4H), 3,46 (t, 2H), 3,39-3,27 (m, 26H), 2,75 (m, 2H), 1,73 (q, 2H), 1,55 (p, 2H), 1,40-1,33 (m, 14H).

Preparación del compuesto 24h

Se añadieron DIPEA (1,6 ml, 9,45 mmol), HOBt (746 mg, 5,52 mmol) y EDC·HCl (1,19 g, 6,42 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 24g (1,0 g, 5,29 mmol) y compuesto 24d (1,1 g, 2,35 mmol) en DMF (15 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (20 ml), se extrajo con DCM (3 x 50 ml) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 24h (1,25 g, 70 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,36 (s, 1H), 7,30 (d, 1H), 7,08 (s, 1H), 7,68 (t, 1H), 4,46 (q, 1H), 4,07-3,98-4,01 (m, 4H), 3,98 (s, 2H), 3,75-3,663 (m, H), 3,57 (t, 2H), 3,44 (m, 6H), 3,28 (m, 2H), 1,87 (m, 1H), 1,66 (m, 1H), 1,59-1,52 (p, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,41-1,33 (m, 2H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 735,0.

Preparación del compuesto 24i

A una mezcla con agitación del compuesto 24h (1,2 g, 0,163 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 250 mg) en MeOH (30 ml) a 0 °C, se le añadió HCl 4 N (1,4-dioxano, 0,81 ml, 3,26 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (100 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 24i (1,39 g, 99 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,99 (s, 1H), 8,22 (t, 1H), 7,74 (t, 1H), 7,61 (d, 1H), 4,31 (q, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,86 (s, 2H), 3,79 (t, 2H), 3,60-3,50 (m, 18H), 3,06 (q, 2H), 2,97 (p, 4H), 1,60-1,49 (m, 2H), 1,39 (m, 11H), 1,20 (m, 2H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 683.

Preparación del compuesto 24j

Se añadieron DIPEA (0,021 ml, 0,125 mmol) y HBTU (29 mg, 0,078 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 1i (85 mg, 0,069 mmol) y compuesto 24i (23 mg, 0,031 mmol) en DMF (0,7 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se disolvió la mezcla de reacción en H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 24j (67 mg, 68 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1552,5.

Preparación del compuesto 24k

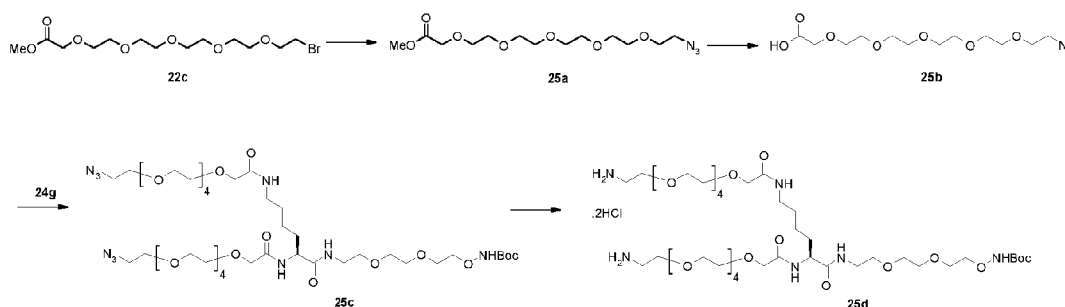
A una disolución del compuesto 24j (67 mg, 0,021 mmol) en MeOH (1,7 ml) se le añadió LiOH monohidratado (16 mg, 0,388 mmol) en H₂O (1,7 ml) a 0 °C. Después de agitar durante 2 horas a 0 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético (0,018 ml) y se concentró a presión reducida. Se disolvió la mezcla de reacción en

H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 24k (37 mg, 62 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1412,3.

Preparación del compuesto 24l

Se añadió TFA (0,4 ml) a una disolución con agitación del compuesto 24k (37 mg, 0,013 mmol) en DCM (2,0 ml). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se eliminaron por soplado el disolvente y TFA en exceso con N₂. Se disolvió el residuo en H₂O/acetonitrilo (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 24l (19,8 mg, 53 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1362,3.

Ejemplo 35. Preparación del compuesto 25e



Preparación del compuesto 25a

Se disolvieron el compuesto 22c (1,0 g, 2,67 mmol) y NaN₃ (261 mg, 4,01 mmol) en DMF (3 ml). Se calentó la mezcla de reacción a 100 °C durante 5 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla de reacción y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1), que produjo el compuesto 25a (854 mg, 95 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,17 (s, 2H), 3,76-3,64 (m, 21H), 3,39 (t, J = 5,2 Hz, 2H).

Preparación del compuesto 25b

A una disolución con agitación del compuesto 25a (854 mg, 2,54 mmol) en MeOH (25 ml) a 0 °C, se le añadió NaOH ac. 2 M (6,3 ml, 12,64 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego se concentró la disolución a presión reducida. Se acidificó la suspensión resultante con HCl acuoso 2 N mientras se enfriaba a 0 °C. Se extrajo el residuo mediante CHCl₃ (8 x 500 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron para producir el compuesto 25b (783 mg, 96 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,16 (s, 2H), 3,76-3,65 (m, 18H), 3,40 (t, J = 5,2 Hz, 2H).

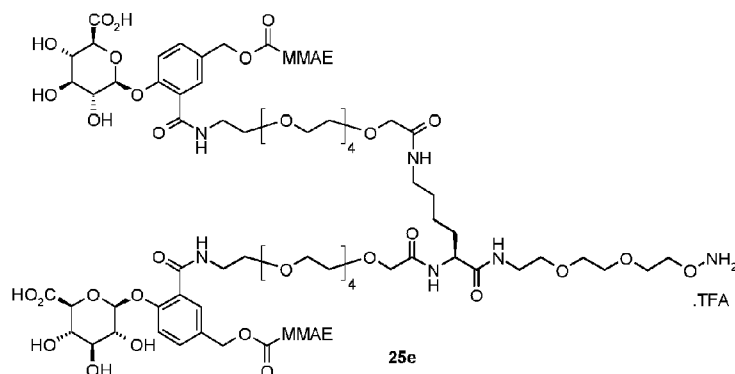
Preparación del compuesto 25c

Se añadieron DIPEA (0,30 ml, 1,70 mmol) y HBTU (483 mg, 1,27 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 25b (337 mg, 1,05 mmol) y compuesto 24g (198 mg, 0,42 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna (de EtOAc a EtOAc/MeOH 10/1), que produjo el compuesto 25c (358 mg, 84 %). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,98 (s, 1H), 8,09 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 7,63 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,31-4,25 (m, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,84 (s, 2H), 3,80 (m, 2H), 3,62-3,46 (m, 34H), 3,42-3,36 (m, 6H), 3,25-3,17 (m, 2H), 3,08-3,03 (m, 2H), 1,61-1,51 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 1,26-1,10 (m, 7H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 999,1.

Preparación del compuesto 25d

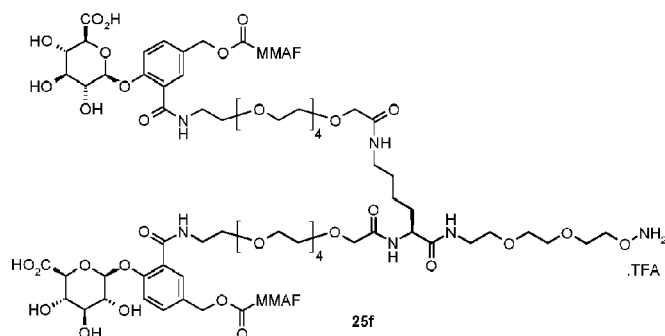
A una disolución del compuesto 25c (358 mg, 0,35 mmol) en MeOH (7 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 38 mg) y HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,18 ml, 0,72 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (400 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 25d (314 mg, 93 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,98 (s, 1H), 8,10 (m, 1H), 7,68 (m, 1H), 7,57 (m, 1H), 4,31-4,25 (m, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,84 (s, 2H), 3,80 (m, 2H), 3,62-3,46 (m, 30H), 3,42-3,36 (m, 10H), 3,45-3,16 (m, 4H), 3,08-3,03 (m, 3H), 2,72-2,66 (m, 3H), 1,61-1,51 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 1,26-1,10 (m, 6H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 947,1.

Preparación del compuesto 25e



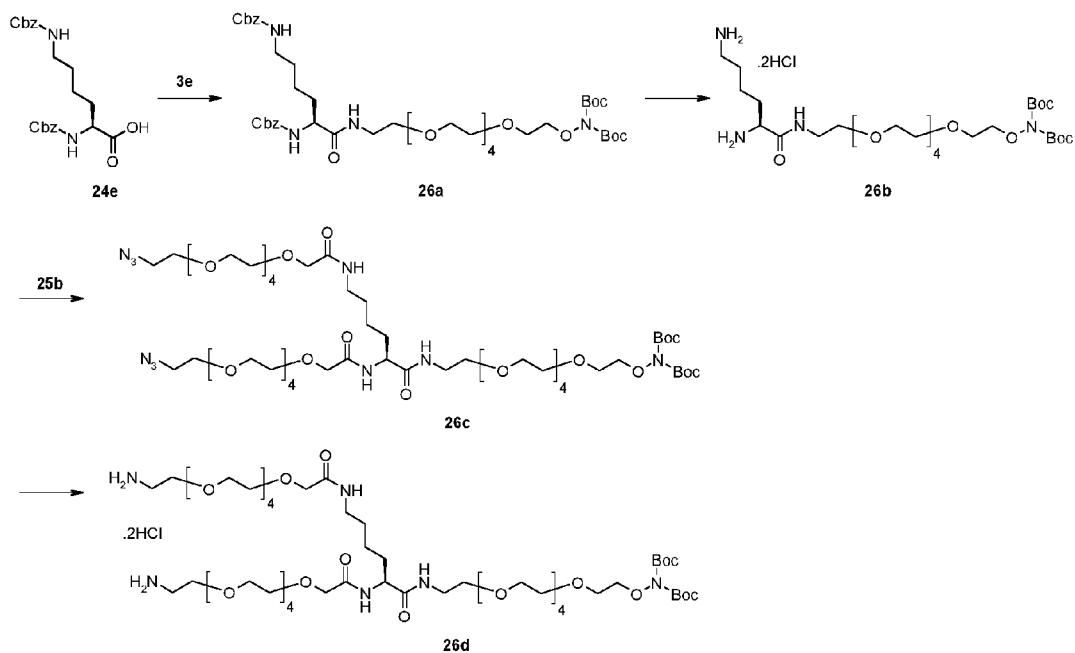
- 5 Se preparó el compuesto 25e a partir del compuesto 1i y compuesto 25d mediante un método similar de preparación del compuesto 24l en el ejemplo 34. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1493,7.

Ejemplo 36. Preparación del compuesto 25f



- 10 Se preparó el compuesto 25f a partir del compuesto 1j y compuesto 25d mediante un método similar de preparación del compuesto 24l en el ejemplo 34. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1508,2.

15 Ejemplo 37. Preparación del compuesto 26e



Preparación del compuesto 26a

Se añadieron DIPEA (0,65 ml, 0,004 mmol), HOBt (218 mg, 1,61 mmol) y EDC·HCl (364 mg, 1,9 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 24e (1,0 g, 2,43 mmol) y compuesto 3e (810 mg, 1,52 mmol) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (30 ml), NaHCO₃ ac. saturado (30 ml) y salmuera (30 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 26a (988 mg, 73 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33-7,26 (m, 8 H), 6,85 (s, 1H), 5,63 (s, 1H), 5,08-5,02 (s, 4 H), 4,16-4,11 (m, 1 H), 4,09-4,05 (m, 2 H), 3,72-3,70 (m, 2 H), 3,62-3,59 (m, 14H), 3,53 (s, 2H), 3,44-3,43 (m, 2H), 3,18-3,16 (m, 2H), 1,82 (m, 1H), 1,72 (s, 7H), 1,66 (m, 1H), 1,52 (s, 18H), 1,38-1,36 (m, 2H), 1,24-1,27 (s, 1H). EI-EM m/z: [M+H-2Boc]⁺ 693,1.

Preparación del compuesto 26b

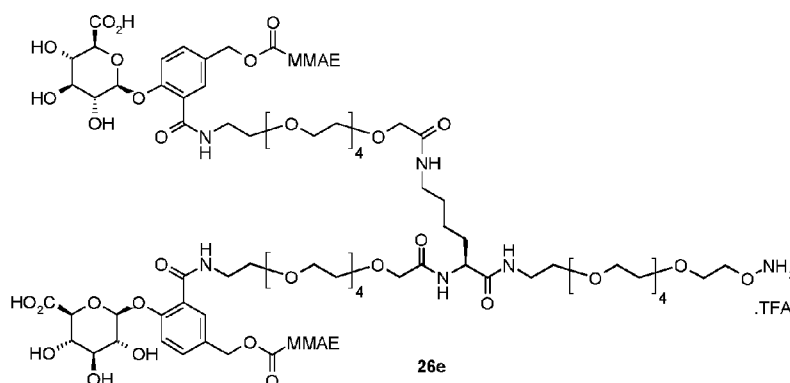
A una mezcla con agitación del compuesto 26a (988 mg, 1,1 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 196 mg) en MeOH (6 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,55 ml, 2,2 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 26b (767 mg, 99 %) como una espuma de color amarillo, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 625,0, [M+H-Boc]⁺ 525,0, [M+H-2Boc]⁺ 424,9.

Preparación del compuesto 26c

Se añadieron DIPEA (0,2 ml, 1,14 mmol), HOBt (89 mg, 0,66 mmol) y EDC·HCl (142 mg, 0,74 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 26b (200 mg, 0,29 mmol) y compuesto 25b (202 mg, 0,63 mmol) en DMF (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (10 ml) y se extrajo con DCM (3 x 10 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 26c (270 mg, 77 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,07 (t, 1H), 7,62 (t, 1H), 7,54-7,52 (m, 1H), 5,73 (s, 2H), 4,27-4,25 (q, 1H), 3,96 (t, 2H), 3,88 (s, 2H), 3,82 (s, 2H), 3,58-3,48 (m, 52H), 3,19-3,18 (m, 3H), 3,04-3,03 (m, 3H), 1,44 (s, 18H), 1,39-1,37 (m, 3H), 1,21-1,19 (m, 3H). EI-EM m/z: [M+H-2Boc]⁺ 1031,6.

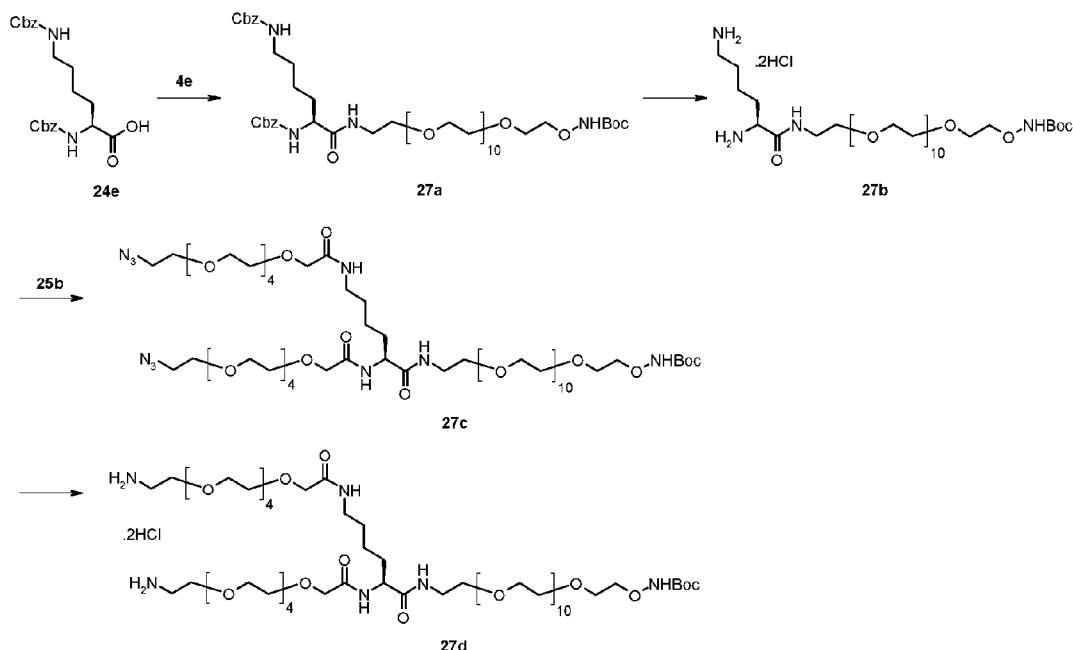
Preparación del compuesto 26d

A una mezcla con agitación del compuesto 26c (160 mg, 0,13 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 28 mg) en MeOH (20 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,07 ml, 0,28 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 26d (140 mg, 91 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1179,7.

Preparación del compuesto 26e

Se preparó el compuesto 26e a partir del compuesto 1i y compuesto 26d mediante un método similar de preparación del compuesto 24l en el ejemplo 34. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1560,6, 1/3[M+H]⁺ 1040,7.

Ejemplo 38. Preparación del compuesto 27e



5 Preparación del compuesto 27a

Se añadieron DIPEA (0,19 ml, 1,1 mmol), HOBT (64 mg, 0,47 mmol) y EDC·HCl (91 mg, 0,47 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 24e (228 mg, 0,55 mmol) y compuesto 4e (256 mg, 0,36 mmol) en DMF (4 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 15 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (20 ml), NaHCO₃ ac. saturado (10 ml) y salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 27a (327 mg, 85 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,73 (s, 1H), 7,33-7,26 (m, 11 H), 6,91 (s, 1H), 5,67 (a, 1H), 5,08-5,07 (m, 5 H), 4,15 (m, 1 H), 4,02 (t, 2 H), 3,72-3,44 (m, 46H), 3,16 (d, 2H), 1,82 (m, 1H), 1,63 (m, 1H), 1,55-1,36 (m, 13H).

15 Preparación del compuesto 27b

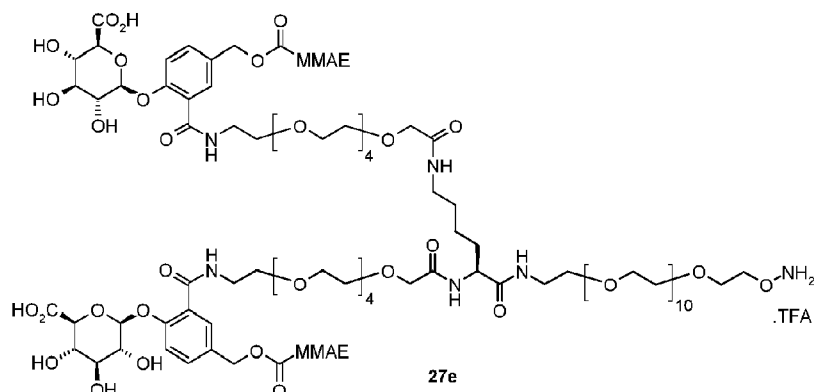
A una mezcla con agitación del compuesto 27a (327 mg, 0,309 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 65 mg) en MeOH (6 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,15 ml, 0,618 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 27b (244 mg, 91 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 789,2.

25 Preparación del compuesto 27c

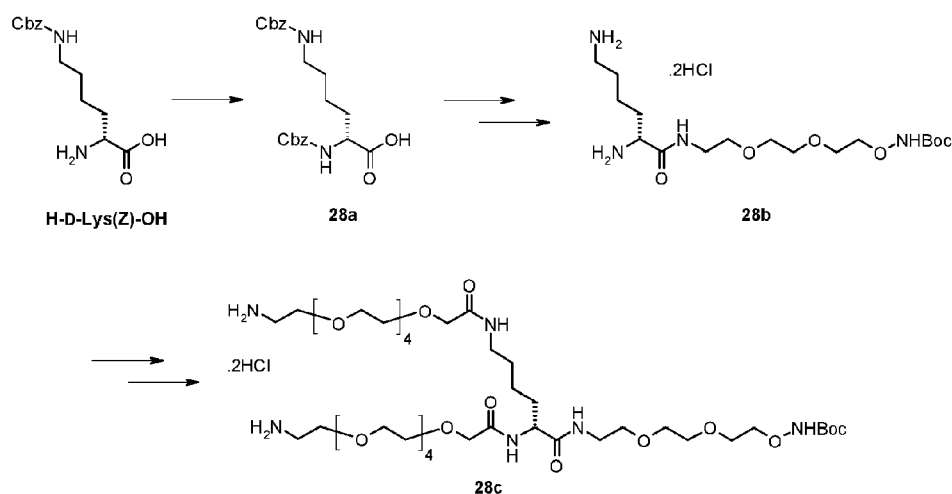
Se añadieron DIPEA (0,19 ml, 1,13 mmol), HOBT (95 mg, 0,707 mmol) y EDC·HCl (135 mg, 0,707 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 25b (227 mg, 0,707 mmol) y compuesto 27b (244 mg, 0,283 mmol) en DMF (6 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (5 ml) y se extrajo con DCM (3 x 10 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 27c (339 mg, 85 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,69 (s, 1H), 7,29 (d, 1H), 6,99 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,39 (q, 1H), 3,99-3,94 (m, 6H), 3,69-3,58 (m, 80H), 3,51 (t, 2H), 3,44-3,34 (m, 8H), 3,25 (m, 2H), 1,68-1,64 (m, 1H), 1,53-1,48 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,33 (m, 2H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1395,6.

35 Preparación del compuesto 27d

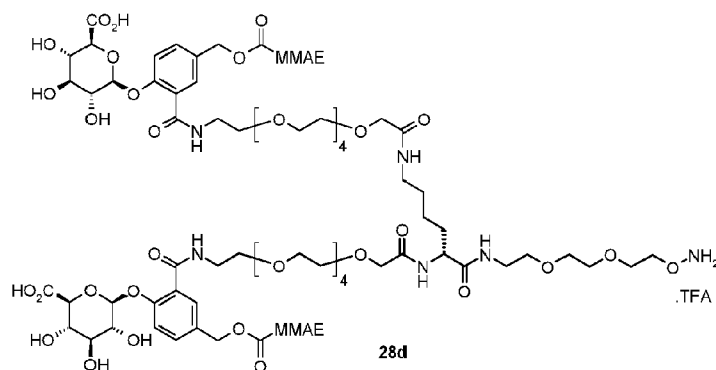
A una mezcla con agitación del compuesto 27c (339 mg, 0,242 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 67 mg) en MeOH (6 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,12 ml, 0,484 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 27d (300 mg, 87 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1343,5.

Preparación del compuesto 27e

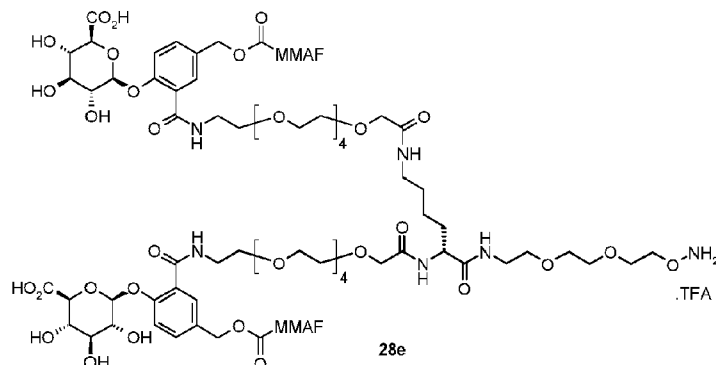
- 5 Se preparó el compuesto 27e a partir del compuesto 1i y compuesto 27d mediante un método similar de preparación del compuesto 24i en el ejemplo 34. EI-EM m/z : $1/2[M+H]^+$ 1692,5.

Ejemplo 39. Preparación del compuesto 28d10 Preparación del compuesto 28c

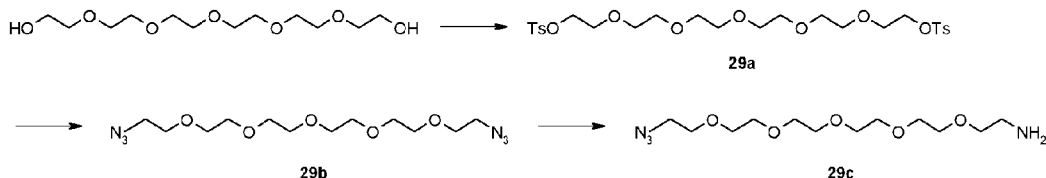
- 15 Se preparó el compuesto 28c a partir de H-D-Lys(Z)-OH mediante un método similar de preparación del compuesto 25d en el ejemplo 35.

Preparación del compuesto 28d

- 20 Se preparó el compuesto 28d a partir del compuesto 1i y compuesto 28c mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z : $1/2[M+H]^+$ 1494,9.

Ejemplo 40. Preparación del compuesto 28e

- 5 Se preparó el compuesto 28e a partir del compuesto 1j y compuesto 28c mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z : $1/2[M+H]^+$ 1509,2.

Ejemplo 41. Preparación del compuesto 29j

10

Preparación del compuesto 29a

A una disolución de hexaetilenglicol (25,0 g, 88,5 mmol) en DCM (100 ml) se le añadieron trietilamina (61,7 ml, 443 mmol) y cloruro de *p*-toluenosulfonilo (50,6 g, 266 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 5 horas a 0 °C, se vertió la mezcla de reacción en HCl ac. 1 N (200 ml) y se extrajo con DCM (2 x 200 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con NaHCO₃ ac. saturado (100 ml) y salmuera (100 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 29a (45,0 g, 87 %) como un aceite de color marrón. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (d, *J* = 7,6 Hz, 4H), 7,34 (d, *J* = 7,6 Hz, 4H), 4,16-4,14 (m, 4H), 3,69-3,67 (m, 4H), 3,64-3,56 (m, 16H), 2,44 (s, 6H).

20

Preparación del compuesto 29b

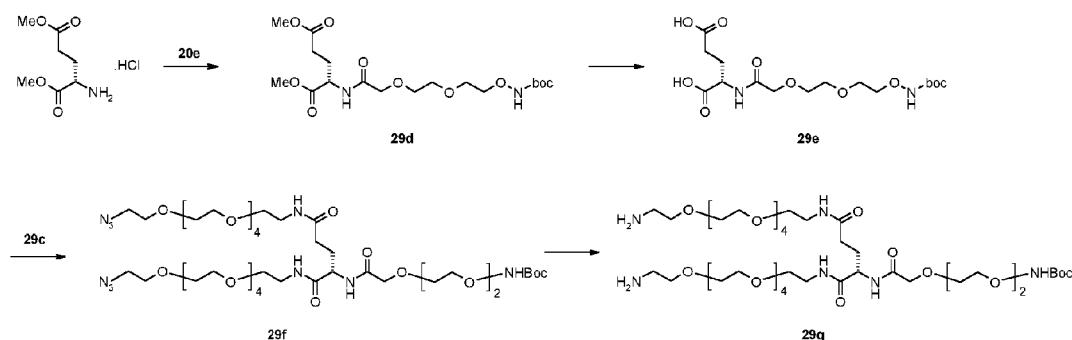
A una disolución del compuesto 29a (17,6 g, 29,7 mmol) en DMF (100 ml) se le añadieron NaN₃ (9,65 g, 148 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (550 mg, 1,49 mmol). Se calentó la mezcla de reacción hasta 80 °C. Después de agitar durante 16 horas a 80 °C, se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con DCM (100 ml). Después de la concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 29b (9,4 g, 94 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,68 (m, 20H), 3,39 (t, 4H).

25

Preparación del compuesto 29c

A una disolución de 29b (8,4 g, 24,9 mmol) en DCM (24 ml) y tolueno (24 ml) se le añadieron HCl ac. 1 N (40,3 ml) y trifenilfosfina (6,9 g, 23,6 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo N₂ durante 16 horas. Después de la eliminación del disolvente a presión reducida, se añadió H₂O (20 ml) a la mezcla de reacción y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (20 ml). Luego se ajustó el pH de la fase acuosa a 13. Se extrajo la fase acuosa resultante con DCM (3 x 30 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir el compuesto 29c (6,6 g, 84 %) como un aceite incoloro. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,67 (m, 20H), 3,52 (t, 2H), 3,39 (t, 2H), 2,86 (t, 2H). EI-EM m/z : $[M+H]^+$ 306,9.

35



Preparación del compuesto 29d

- 5 Se añadieron DIPEA (2,67 ml, 15,4 mmol) y HBTU (3,49 g, 9,21 mmol) a una mezcla con agitación de clorhidrato de éster dimetílico de ácido L-glutámico (1,3 g, 6,14 mmol) y compuesto 20e (1,72 g, 6,14 mmol) en DMF (15 ml) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 minutos y se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 16 horas bajo N₂. Se vertió la mezcla de reacción en agua (50 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl 0,5 N (50 ml), NaHCO₃ ac. saturado (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 29d (2,18 g, 81 %). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,00 (s, 1H), 8,04 (d, 1H), 4,34 (m, 1H), 3,93 (s, 1H), 3,77 (s, 1H), 3,63 (s, 3H), 3,58 (s, 9H), 3,38-3,34 (t, 2H), 2,14 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 1,39 (s, 9H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 437,35.

Preparación del compuesto 29e

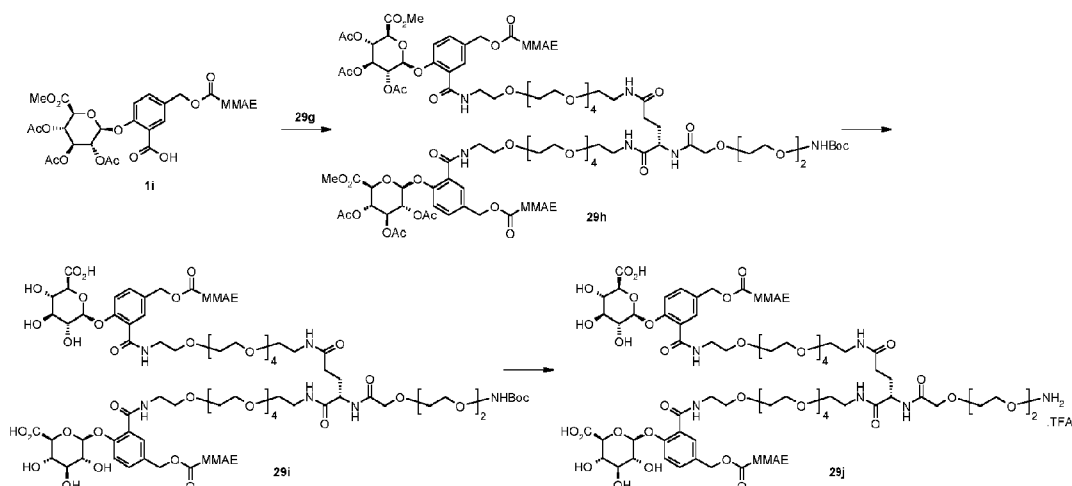
- 15 A una disolución del compuesto 29d (2,18 g, 4,99 mmol) en THF:MeOH:H₂O (12 ml:4 ml:4 ml) se le añadió NaOH (499 mg, 12,5 mmol) a temperatura ambiente bajo N₂. Después de 3 horas, se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 4 y se concentró. Luego se extrajo el residuo con DCM/MeOH (80 ml/20 ml). La concentración proporcionó el compuesto 29e (1,0 g, 49 %) como un aceite de color amarillo, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H-Boc]⁺ 309,20.

Preparación del compuesto 29f

- 25 Se añadieron DIPEA (1,7 ml, 9,79 mmol) y HBTU (2,79 g, 7,35 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 29e (1,0 g, 2,45 mmol) y compuesto 29c (2,25 g, 7,35 mmol) en DMF (10 ml) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 minutos y se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 16 horas bajo N₂. Se vertió la mezcla de reacción en agua (50 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 0,5 N (50 ml), NaHCO₃ ac. saturado (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 29f (611 mg, 25 %). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,97 (s, 1H), 8,08 (t, 1H), 7,85 (t, 1H), 7,64 (d, 1H), 4,27 (m, 1H), 3,83 (s, 2H), 3,82-3,61 (m, 2H), 3,61-3,50 (m, 42H), 3,42-3,37 (m, 8H), 3,28-3,15 (m, 4H), 2,90 (s, 1H), 2,08-2,04 (m, 2H), 1,88 (m, 1H), 1,75 (m, 1H), 1,39 (s, 9H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 986,73.

Preparación del compuesto 29g

- 40 A una mezcla con agitación del compuesto 29f (611 mg, 0,62 mmol) en MeOH (50 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 132 mg, 0,62 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 29g como un aceite incoloro (518 mg, en bruto), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 933,85.



Preparación del compuesto 29h

- 5 Se añadieron DIPEA (0,026 ml, 0,150 mmol) y HBTU (40 mg, 0,105 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 29g (35 mg, 0,037 mmol) y compuesto 1i (106 mg, 0,086 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas bajo N_2 , se diluyó la mezcla de reacción con agua (20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl 0,5 N (20 ml), $NaHCO_3$ ac. saturado (20 ml) y salmuera (20 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 29h (81,4 mg, 65 %). EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1677,94, $1/3[M+H]^+$ 1119,03.

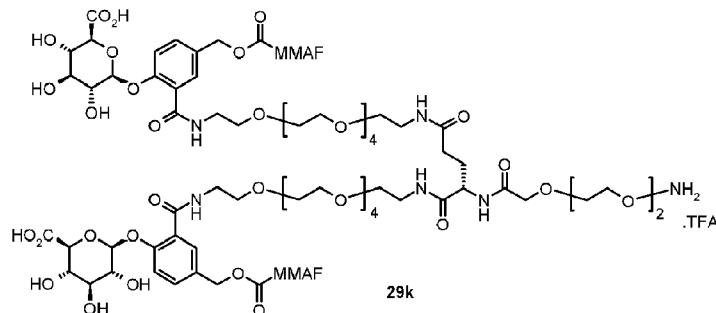
Preparación del compuesto 29i

- 15 A una disolución del compuesto 29h (81 mg, 0,024 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió LiOH monohidratado (8,1 mg, 0,19 mmol) en H_2O (1 ml) a $-10^\circ C$. Después de agitar durante 2 horas a $-10^\circ C$, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió la mezcla de reacción en $H_2O/DMSO$ (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 29i (53 mg, 72 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1537,86, $1/3[M+H]^+$ 1025,66.

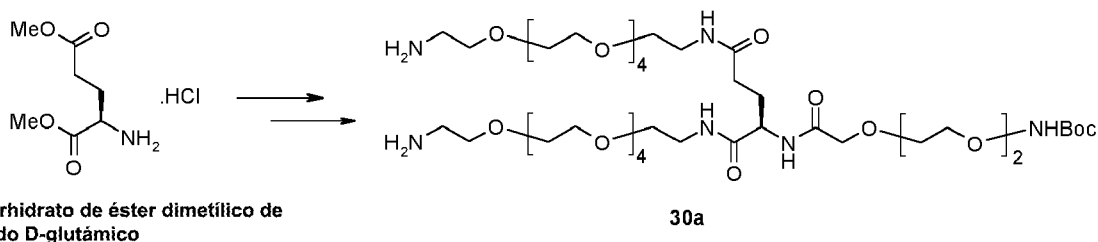
Preparación del compuesto 29j

- 25 Se añadió TFA (0,3 ml) a una disolución con agitación del compuesto 29i (53 mg, 0,017 mmol) en DCM (1,0 ml) a $0^\circ C$. Después de agitar durante 1 hora, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N_2 . Luego se disolvió el residuo en $H_2O/MeCN$ (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 29j (23,1 mg, 43 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1487,99, $1/3[M+H]^+$ 992,40.

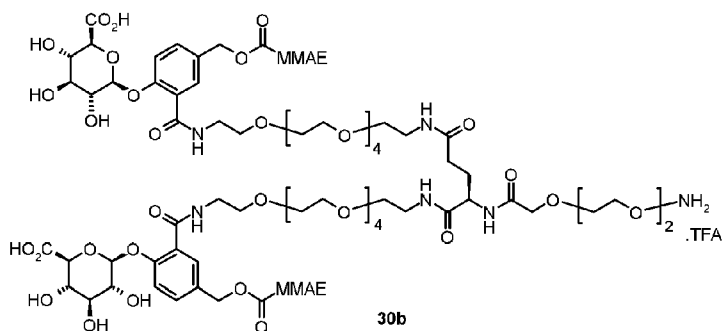
Ejemplo 42. Preparación del compuesto 29k



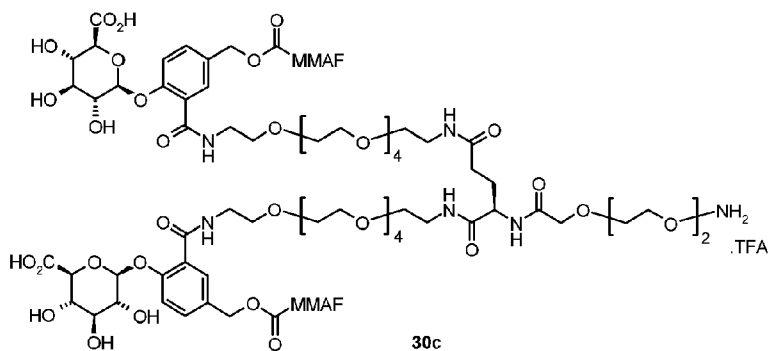
Se preparó el compuesto 29k a partir del compuesto 1j y compuesto 29g mediante un método similar de preparación del compuesto 29j en el ejemplo 41. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1501,93, $1/3[M+H]^+$ 1001,69.

*Ejemplo 43. Preparación del compuesto 30b*Preparación del compuesto 30a

Se preparó el compuesto 30a a partir de clorhidrato de éster dimetílico de ácido D-glutámico mediante un método similar de preparación del compuesto 29g en el ejemplo 41. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 933,89.

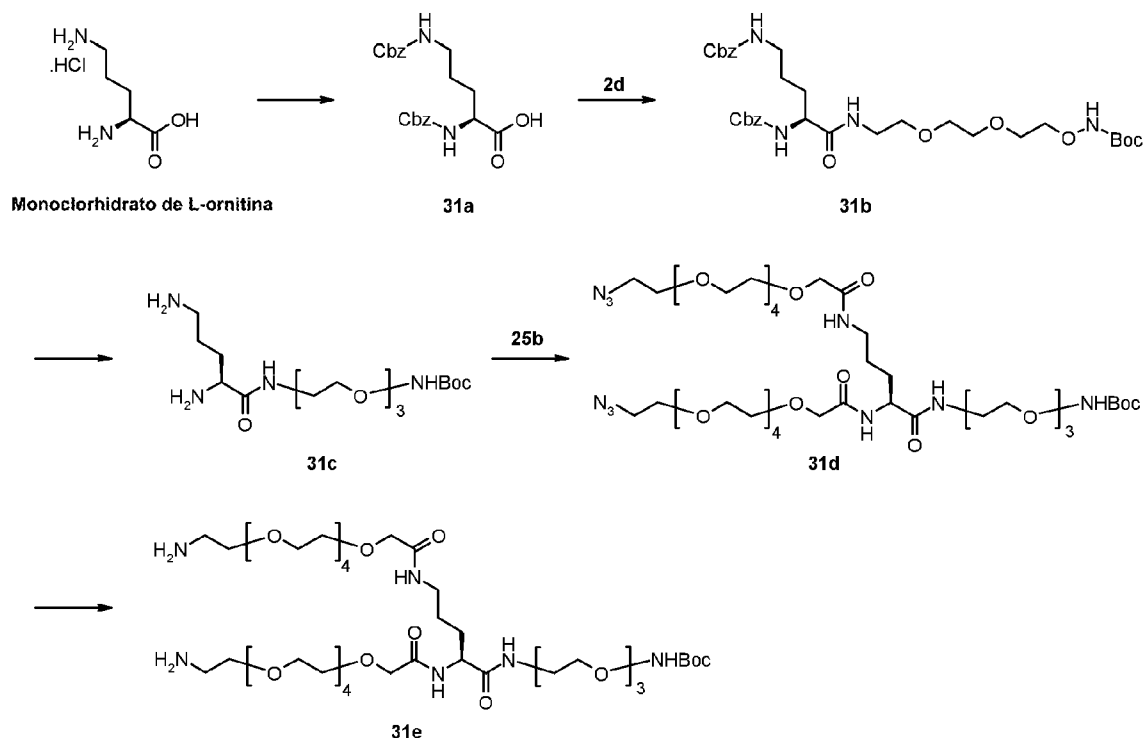
Preparación del compuesto 30b

Se preparó el compuesto 30b a partir del compuesto 1i y compuesto 30a mediante un método similar de preparación del compuesto 29j en el ejemplo 41. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1488,07, $1/3[M+H]^+$ 992,40.

Ejemplo 44. Preparación del compuesto 30c

Se preparó el compuesto 30c a partir del compuesto 1j y compuesto 30a mediante un método similar de preparación del compuesto 29j en el ejemplo 41. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1501,93, $1/3[M+H]^+$ 1001,69.

Ejemplo 45. Preparación del compuesto 31f

5 Preparación del compuesto 31a

Se cargó un matraz de tres bocas consecutivamente con H₂O (18 ml), 1,4-dioxano (30 ml) y monoclorhidrato de L-ornitina (3,0 g, 17,8 mmol). Se agitó la mezcla hasta disolución completa. Se ajustó el pH a aproximadamente 10,5 mediante adición de Na₂CO₃ ac. 2 M. Se añadió clorofornato de bencilo (6,37 g, 37,4 mmol) mientras se mantenía el pH a aproximadamente 10-11 añadiendo al mismo tiempo Na₂CO₃ ac. 2 M. Después del final de la adición, se agitó la mezcla de reacción a 20 °C durante 1 hora. Luego se añadió EtOAc (50 ml) y se ajustó el pH de la mezcla resultante a 2-3 con c-HCl. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄. La filtración y concentración a presión reducida proporcionaron el compuesto 31a (7,1 g). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,54 (s, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,44-7,29 (m, 10H), 7,24-7,22 (m, 1H), 5,16-5,00 (d, 4H), 3,95-3,89 (m, 1H), 3,00-2,96 (m, 2H), 1,98-1,57 (m, 1H), 1,56-1,46 (m, 3H).

Preparación del compuesto 31b

Se añadieron DIPEA (1,41 ml, 8,12 mmol) y HBTU (1,85 g, 4,87 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 31a (1,30 g, 3,25 mmol) y compuesto 2d (891 mg, 3,57 mmol) en DMF (10 ml) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 minutos y se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 16 horas bajo N₂. Se vertió la mezcla de reacción en agua (50 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 0,5 N (50 ml), NaHCO₃ ac. saturado (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 31b (1,2 g, 57 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 647,54, [M+H-Boc]⁺ 547,47

Preparación del compuesto 31c

A una mezcla con agitación del compuesto 31b (1,2 g, 1,86 mmol) en MeOH (50 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 59 mg, 5,57 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 31c (717 mg), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,93 (s, 1H), 3,81 (t, 2H), 3,55 (t, 2H), 3,51 (s, 5H), 3,42-3,22 (m, 13H), 1,37 (s, 9H).

Preparación del compuesto 31d

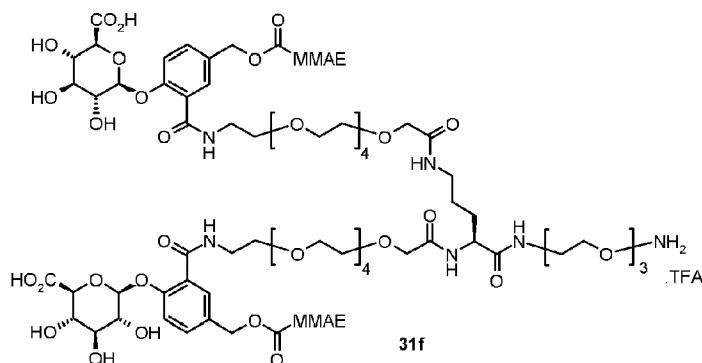
Se añadieron DIPEA (0,55 ml, 3,17 mmol) y HBTU (902 mg, 2,38 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 31c (300 mg, 0,79 mmol) y compuesto 25b (637 mg, 1,98 mmol) en DMF (5 ml) a 0 °C. Se agitó la mezcla de

reacción a 0 °C durante 30 minutos y se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 16 horas bajo N₂. Se vertió la mezcla de reacción en agua (30 ml) y se extrajo con DCM (3 x 30 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 0,5 N (30 ml), NaHCO₃ ac. saturado (30 ml) y salmuera (30 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 31d (551 mg, 71 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 985,87.

Preparación del compuesto 31e

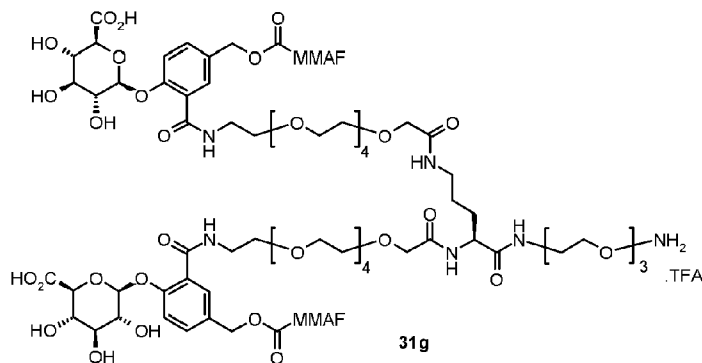
A una mezcla con agitación del compuesto 31d (491 mg, 0,50 mmol) en MeOH (30 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 106 mg, 1,00 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 31e (452 mg), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 933,94.

Preparación del compuesto 31f



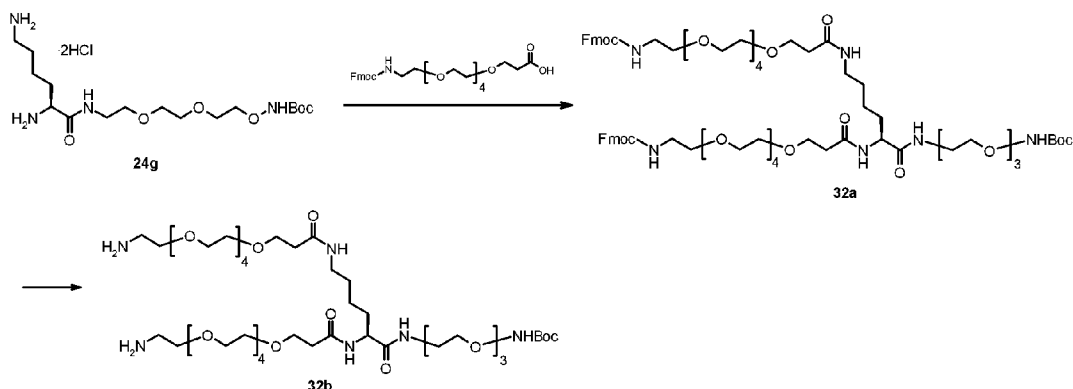
Se preparó el compuesto 31f a partir del compuesto 1i y compuesto 31e mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1488,20, 1/3[M+H]⁺ 992,54.

Ejemplo 46. Preparación del compuesto 31g



Se preparó el compuesto 31g a partir del compuesto 1j y compuesto 31e mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1502,23, 1/3[M+H]⁺ 1001,86.

Ejemplo 47. Preparación del compuesto 32c



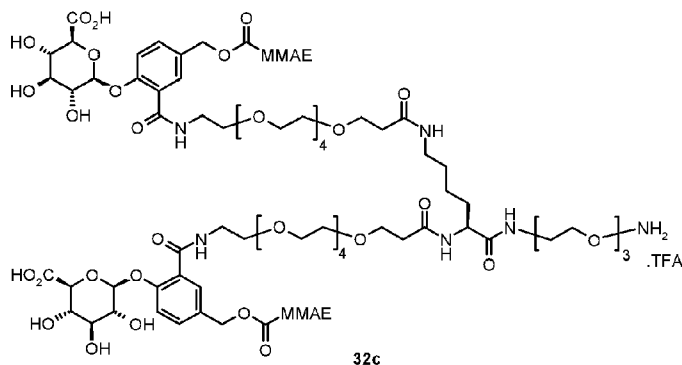
5 Preparación del compuesto 32a

Se añadieron DIPEA (0,6 ml, 7,07 mmol) y HBTU (972 mg, 5,30 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 24g (483 mg, 0,855 mmol) y Fmoc-NH-PEG5-CH₂CH₂COOH (1,0 g, 3,89 mmol) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (10 ml), NaHCO₃ ac. saturado (10 ml) y salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 32a (1,16 g, 90 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,77 (d, 4H), 7,60 (d, 4H), 7,39 (t, 4H), 7,31 (t, 4H), 4,39 (d, 4H), 4,33 (m, 1H), 4,22 (m, 2H), 4,09 (m, 2H), 3,71-3,39 (m, 52H), 3,19 (m, 2H), 2,51 (m, 4H), 1,50 (m, 1H), 1,46 (m, 1H), 1,43 (s, 9H), 1,25 (m, 2H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1520,0.

Preparación del compuesto 32b

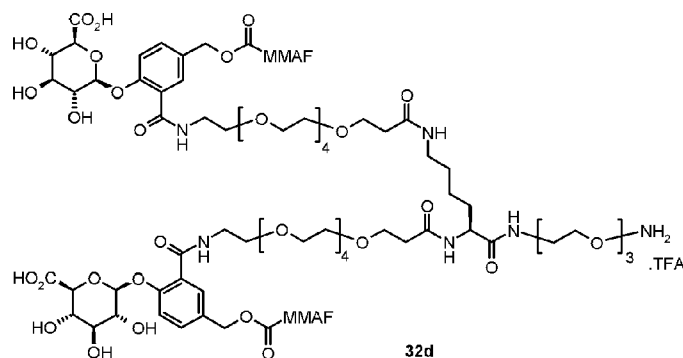
A una disolución del compuesto 32a (500 mg, 0,328 mmol) en THF (8 ml) se le añadió piperidina (2 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 20 minutos, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 32b (175 mg, 50 %). ¹H-RMN (400 MHz, δ 4,41 (m, 1H), 4,01 (m, 2H), 3,75-3,56 (m, 43H), 3,54 (m, 2H), 3,24 (m, 2H), 2,89 (m, 3H), 2,52 (m, 4H), 1,83 (m, 1H), 1,80 (m, 1H), 1,53 (s, 9H), 1,39 (m, 2H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 975,5.

25 Preparación del compuesto 32c



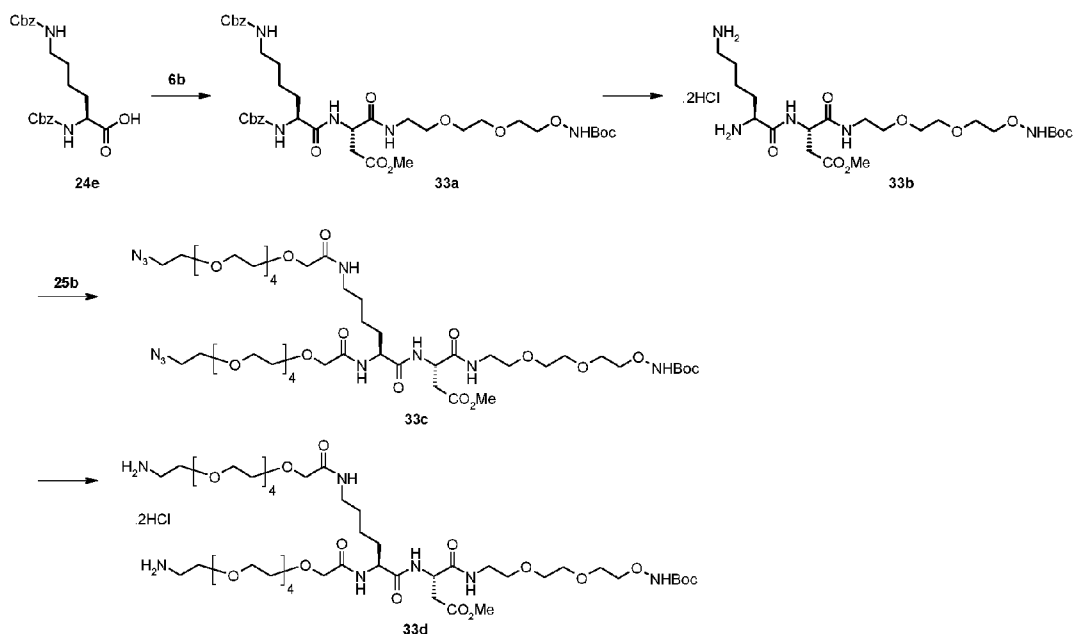
Se preparó el compuesto 32c a partir del compuesto 1i y compuesto 32b mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1508,8.

Ejemplo 48. Preparación del compuesto 32d



- 5 Se preparó el compuesto 32d a partir del compuesto 1j y compuesto 32b mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. El-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1522,8.

Ejemplo 49. Preparación del compuesto 33e



10

Preparación del compuesto 33a

- 15 Se añadieron DIPEA (1,98 ml, 11,37 mmol) y HBTU (2,15 g, 5,68 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 24e (1,57 g, 3,79 mmol) y compuesto 6b (1,30 g, 3,15 mmol) en DMF (37 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (40 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 40 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (40 ml), NaHCO₃ ac. saturado (40 ml) y salmuera (40 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 33a (2,2 g, 88 %). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,99 (s, 1H), 8,19 (d, 1H), 7,79 (t, 1H), 7,47 (d, 1H), 7,34-7,31 (m, 5H), 7,24 (t, 1H), 5,01 (d, 4H), 4,55 (q, 1H), 3,91 (q, 1H), 3,79 (t, 2H), 3,55-3,48 (m, 9H), 3,24-3,11 (m, 2H), 2,75-2,54 (m, 2H), 1,57-1,49 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,25 (m, 2H). El-EM m/z: [M+H]⁺ 790,47, [M+Na]⁺ 812,4.
- 20

Preparación del compuesto 33b

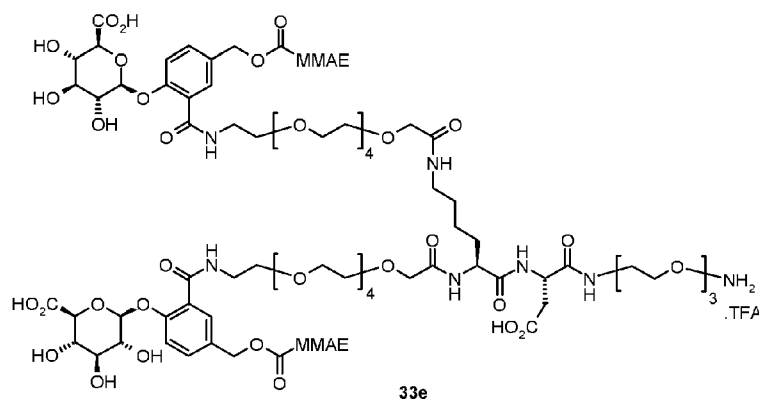
- 25 A una mezcla con agitación del compuesto 33a (2,2 g, 2,78 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 400 mg) en MeOH (60 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 1,39 ml, 5,56 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (40 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 33b (1,67 g, 99 %), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,98 (s, 1H), 8,87 (d, 1H), 8,28 (s a, 3H), 8,12 (1H), 7,96 (s a, 3H), 4,51 (q, 1H), 3,77 (t, 2H), 3,72 (s a, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,52-3,47 (m, 7H), 3,12 (s, 3H), 2,76-2,61 (m, 4H), 1,71 (q, 2H), 1,55 (q, 2H), 1,36 (s, 9H). El-EM m/z: [M+H]⁺ 522,4, [M+Na]⁺ 544,3.
- 30

Preparación del compuesto 33c

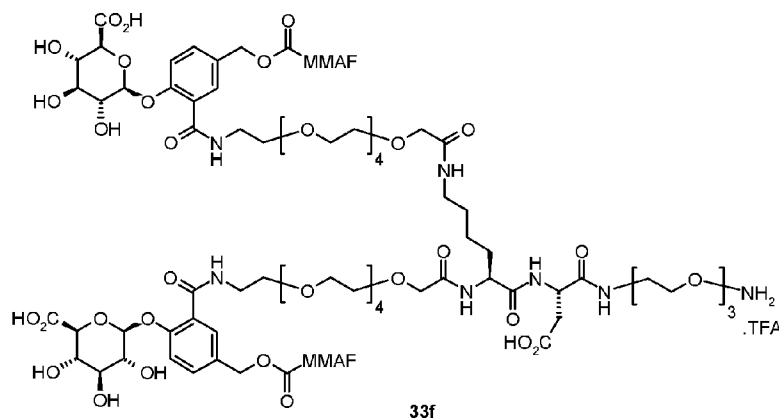
Se añadieron DIPEA (1,95 ml, 11,23 mmol) y HBTU (3,19 g, 8,42 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 25b (1,98 g, 6,17 mmol) y compuesto 33b (1,67 g, 2,80 mmol) en DMF (20 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 , se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 33c (2 g, 63 %). ^1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9,97 (s, 1H), 8,28 (d, 1H), 7,82 (t, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 4,54 (q, 1H), 4,25 (q, 1H), 3,91 (s, 2H), 3,84 (s, 2H), 3,80 (t, 2H), 3,60-3,49 (m, 48H), 3,26-3,12 (m, 3H), 3,07 (q, 2H), 2,75-2,54 (m, 2H), 1,65-1,55 (m, 2H), 1,39 (s, 10H), 1,21 (m, 3H). EI-EM m/z : $[M+H]^+$ 1128,8, $[M+Na]^+$ 1150,7.

Preparación del compuesto 33d

A una mezcla con agitación del compuesto 33c (1 g, 0,88 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 200 mg) en MeOH (20 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,44 ml, 0,88 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (20 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 33d (936 mg, 92 %), que se usó sin purificación adicional. ^1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9,98 (s 1H), 8,30 (d, 1H), 7,70 (t, 2H), 4,54 (q, 1H), 4,26 (q, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,85 (s, 2H), 3,80 (t, 2H), 3,61-3,49 (m, 46H), 3,22-3,12 (m, 4H), 3,06 (q, 2H), 2,97 (q, 4H), 2,76-2,54 (m, 2H), 1,64-1,55 (m, 2H), 1,39 (s, 10H), 1,26 (m, 3H). EI-EM m/z : $[M+H]^+$ 1076,8.

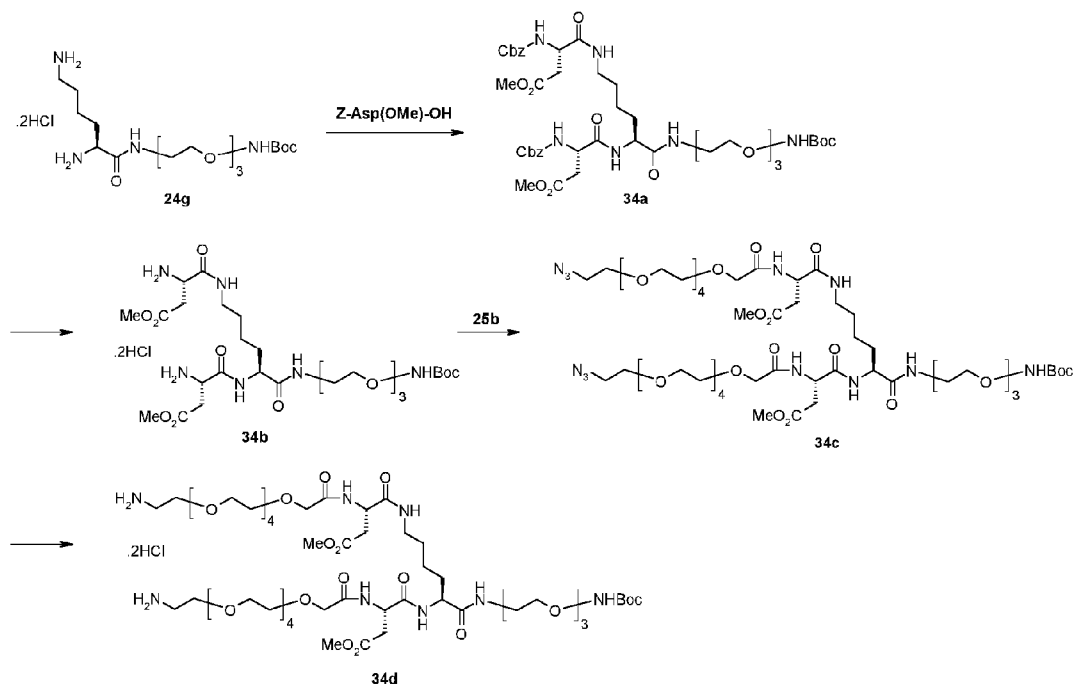
Preparación del compuesto 33e

Se preparó el compuesto 33e a partir del compuesto 1i y compuesto 33d mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z : $1/2[M+H]^+$ 1552,2.

Ejemplo 50. Preparación del compuesto 33f

Se preparó el compuesto 33f a partir del compuesto 1j y compuesto 33d mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z : $1/2[M+H]^+$ 1566,4.

Ejemplo 51. Preparación del compuesto 34e



5 Preparación del compuesto 34a

Se añadieron DIPEA (0,8 ml, 4,56 mmol) y HBTU (1,3 g, 3,42 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 24g (530 mg, 1,14 mmol) y Z-Asp(OMe)-OH (704 mg, 2,5 mmol) en DMF (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (40 ml), NaHCO₃ ac. saturado (40 ml) y salmuera (40 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 34a (713 mg, 68 %). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,97 (s, 1H), 7,88 (m, 3H), 7,64 (d, 2H), 7,51 (d, 2H), 7,35 (m, 10H), 5,02 (m, 4H), 4,43-4,31 (m, 2H), 4,17 (m, 1H), 3,80 (t, 2H), 3,58-3,50 (m, 12H), 3,41-3,16 (m, 6H), 2,98 (m, 2H), 2,79-2,67 (m, 3H), 2,57 (m, 2H), 1,60-1,34 (m, 13H).

Preparación del compuesto 34b

A una disolución del compuesto 34a (530 mg, 0,58 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió Pd/C (20 % en peso, 106 mg) y HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,29 ml, 1,16 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 34b (420 mg, 100 %), que se usó sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,97 (s, 1H), 8,62 (d, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,27 (m, 4H), 7,02 (s, 1H), 4,17 (m, 2H), 4,02 (m, 1H), 3,76 (t, 2H), 3,61 (m, 4H), 3,51-3,11 (m, 12H), 3,09-2,77 (m, 8H), 1,60-1,24 (m, 13H). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 651,5.

Preparación del compuesto 34c

Se añadieron DIPEA (0,4 ml, 2,32 mmol) y HBTU (660 mg, 1,74 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 34b (420 mg, 0,58 mmol) y compuesto 25b (299 mg, 0,93 mmol) en DMF (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (20 ml), NaHCO₃ ac. saturado (20 ml) y salmuera (20 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 34c (466 mg, 70,8 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,28 (s, 1H), 7,78 (q, 1H), 7,31 (d, 1H), 7,71 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 4,85 (m, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,07-4,03 (m, 6H), 3,75-3,41 (m, 56H), 3,23 (q, 2H), 2,92-2,84 (m, 4H), 1,91-1,32 (m, 15H). EI-EM m/z: [M+2H]⁺ 1158,1.

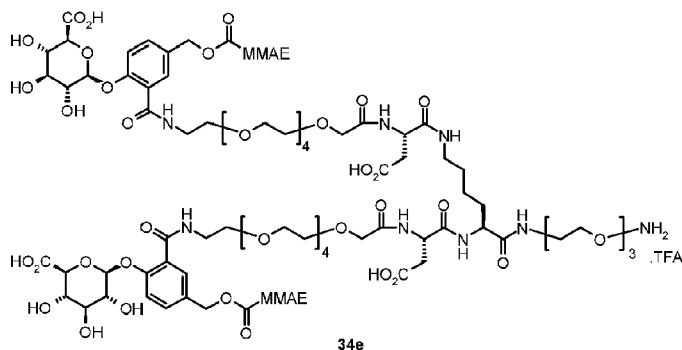
Preparación del compuesto 34d

A una mezcla con agitación del compuesto 34c (260 mg, 0,21 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 52 mg) en MeOH (20 ml) a 0 °C se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,10 ml, 0,41 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con

MeOH (50 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 34d (249 mg, 100 %), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+2H]^+$ 1206,1.

Preparación del compuesto 34e

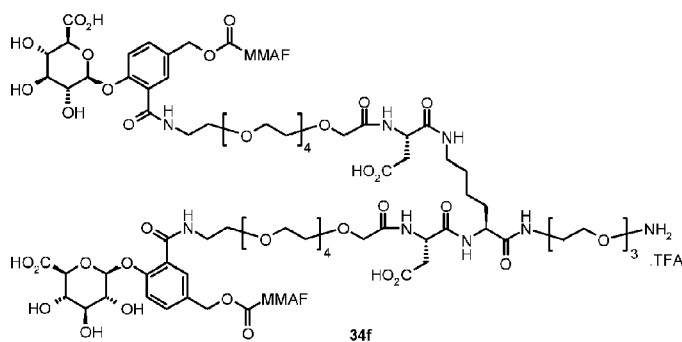
5



Se preparó el compuesto 34e a partir del compuesto 1i y compuesto 34d mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1610,4.

10

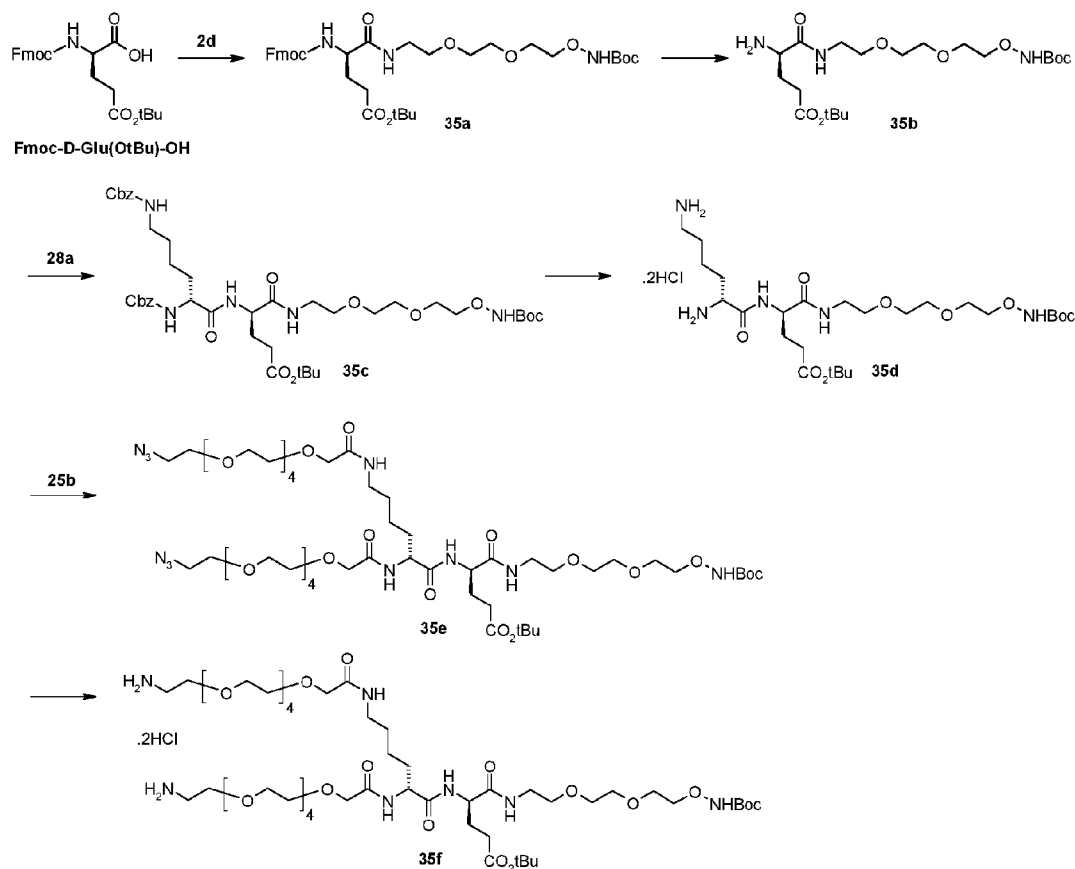
Ejemplo 52. Preparación del compuesto 34f



Se preparó el compuesto 34f a partir del compuesto 1j y compuesto 34d mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1624,3.

15

Ejemplo 53. Preparación del compuesto 35g



5 Preparación del compuesto 35a

Se añadieron DIPEA (0,61 ml, 3,52 mmol) y HBTU (665 mg, 1,175 mmol) a una mezcla con agitación de Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH (500 mg, 1,17 mmol) y compuesto 2d (424 mg, 1,404 mmol) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (20 ml), NaHCO₃ ac. saturado (20 ml) y salmuera (20 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 35a (708 mg, 89 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 672,7.

15 Preparación del compuesto 35b

A una disolución del compuesto 35a (708 mg, 1,04 mmol) en THF (8 ml) se le añadió piperidina (2 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 20 minutos, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 35b (400 mg, 85 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 450,1.

Preparación del compuesto 35c

Se añadieron DIPEA (0,19 ml, 1,1 mmol) y HBTU (253 mg, 0,66 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 28a (203 mg, 0,484 mmol) y compuesto 35b (200 mg, 0,44 mmol) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (10 ml), NaHCO₃ ac. saturado (10 ml) y salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 35c (235 mg, 63 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 847,0.

Preparación del compuesto 35d

A una disolución del compuesto 35c (235 mg, 0,277 mmol) en MeOH (15 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 30 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a

través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (50 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 35d (160 mg, 100 %), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 578,7.

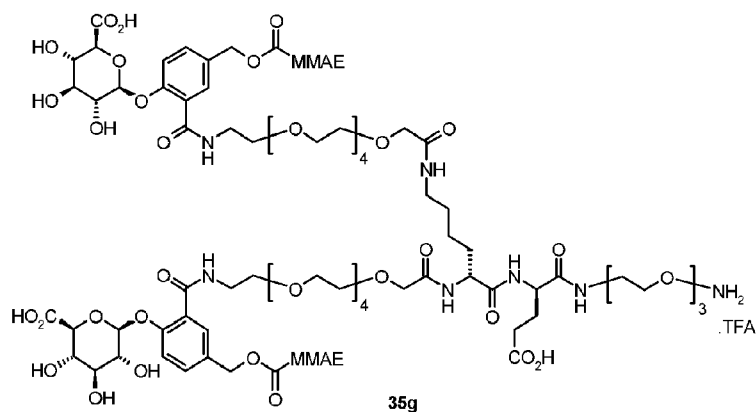
Preparación del compuesto 35e

Se añadieron DIPEA (0,145 ml, 1,758 mmol) y HBTU (262 mg, 1,465 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 35d (160 mg, 0,276 mmol) y compuesto 25b (187 mg, 0,581 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 , se vertió la mezcla de reacción en H_2O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (10 ml), $NaHCO_3$ ac. saturado (10 ml) y salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 35e (260 mg, 79 %). EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1185,4.

Preparación del compuesto 35f

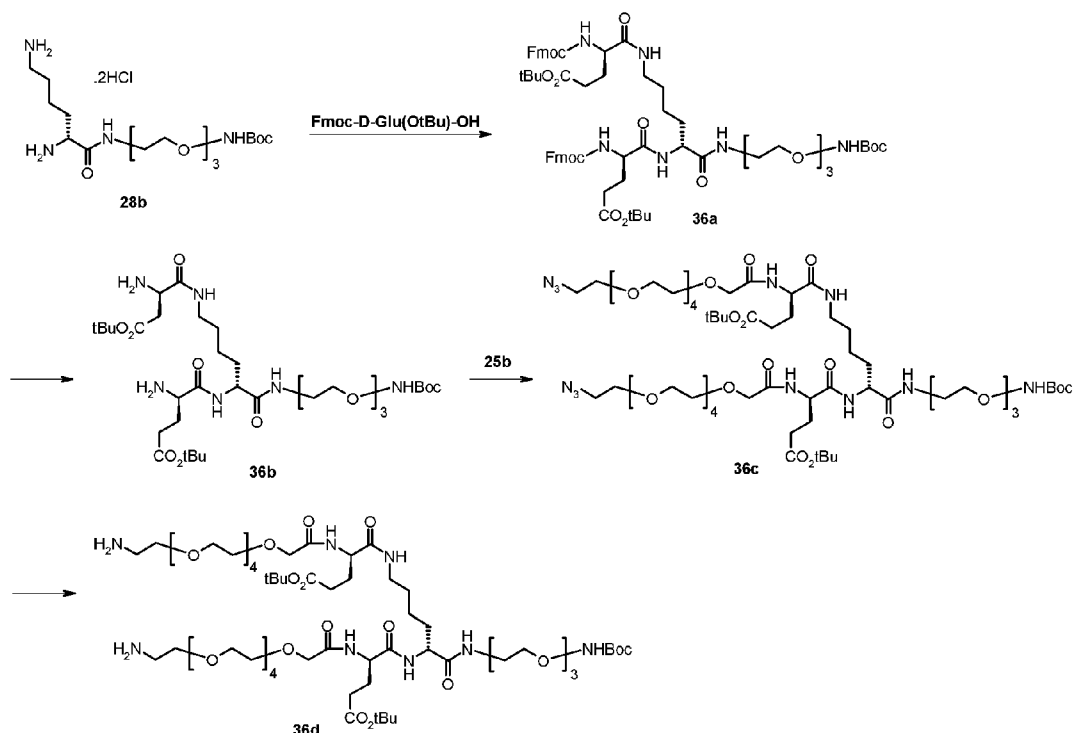
A una disolución del compuesto 35e (70 mg, 0,059 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 15 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 90 minutos bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 35f (67 mg, 100 %), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1133,3.

Preparación del compuesto 35g



Se preparó el compuesto 35g a partir del compuesto 1i y compuesto 35f mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z: $1/2[M+H]^+$ 1559,9.

Ejemplo 54. Preparación del compuesto 36e

5 Preparación del compuesto 36a

Se añadieron DIPEA (0,3 ml, 3,10 mmol) y HBTU (474 mg, 2,275 mmol) a una mezcla con agitación de Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH (484 mg, 1,138 mmol) y compuesto 28b (223 mg, 0,569 mmol) en DMF (7 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (20 ml), NaHCO₃ ac. saturado (20 ml) y salmuera (20 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 36a (593 mg, 86 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1208,3.

15 Preparación del compuesto 36b

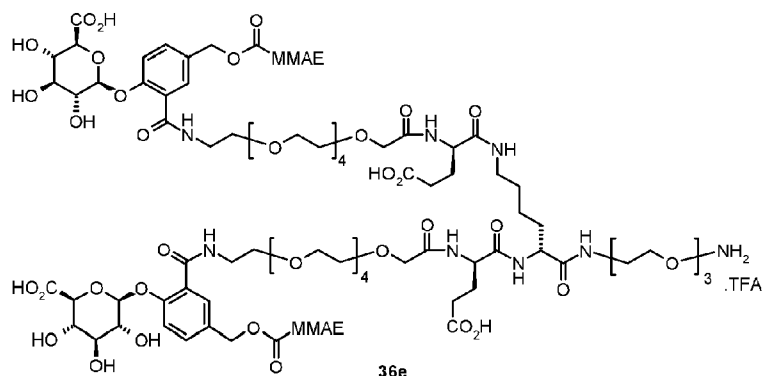
A una disolución del compuesto 36a (593 mg, 0,49 mmol) en THF (8 ml) se le añadió piperidina (1 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 20 minutos, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 36b (166 mg, 44 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 763,9.

20 Preparación del compuesto 36c

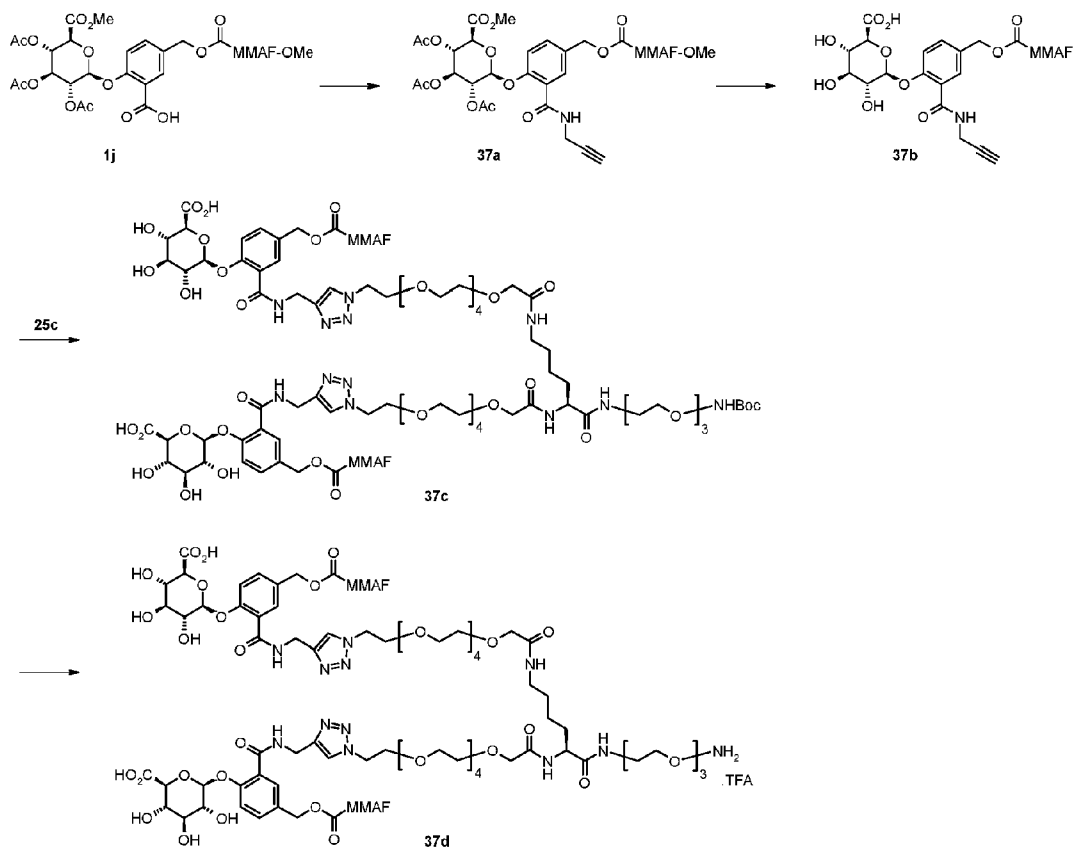
Se añadieron DIPEA (0,15 ml, 0,84 mmol) y HBTU (247 mg, 0,63 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 36b (166 mg, 0,21 mmol) y compuesto 25b (147 mg, 0,441 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (10 ml), NaHCO₃ ac. saturado (10 ml) y salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 36c (195 mg, 68 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1370,6.

30 Preparación del compuesto 36d

A una disolución del compuesto 36c (195 mg, 0,14 mmol) en MeOH (10 ml) se le añadió Pd/C (10 % en peso, 30 mg). Luego se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 90 minutos bajo hidrógeno. Se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 36d (187 mg, 100 %), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1318,6.

Preparación del compuesto 36e

- 5 Se preparó el compuesto 36e a partir del compuesto 1i y compuesto 36d mediante un método similar de preparación del compuesto 25e en el ejemplo 35. EI-EM m/z : $1/2[M+H]^+$ 1624,4.

Ejemplo 55. Preparación del compuesto 37dPreparación del compuesto 37a

- 15 Se añadieron DIPEA (0,083 ml, 0,71 mmol) y HBTU (136 mg, 0,36 mmol) a una mezcla con agitación de propargilamina (0,018 ml, 0,285 mmol) y compuesto 1j (300 mg, 0,238 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 , se vertió la mezcla de reacción en H_2O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (10 ml), $NaHCO_3$ ac. saturado (10 ml) y salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 37a (300 mg, 97 %). EI-EM m/z : $[M+H]^+$ 1294,0.
- 20

Preparación del compuesto 37b

A una disolución del compuesto 37a (300 mg, 0,24 mmol) en THF (2 ml) y MeOH (2 ml) se le añadió LiOH

monohidratado (50 mg, 1,20 mmol) en H₂O (2 ml) a 0 °C. Después de agitar durante 2 horas a 0 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió el residuo en H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 37b (165 mg, 60 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1140,8.

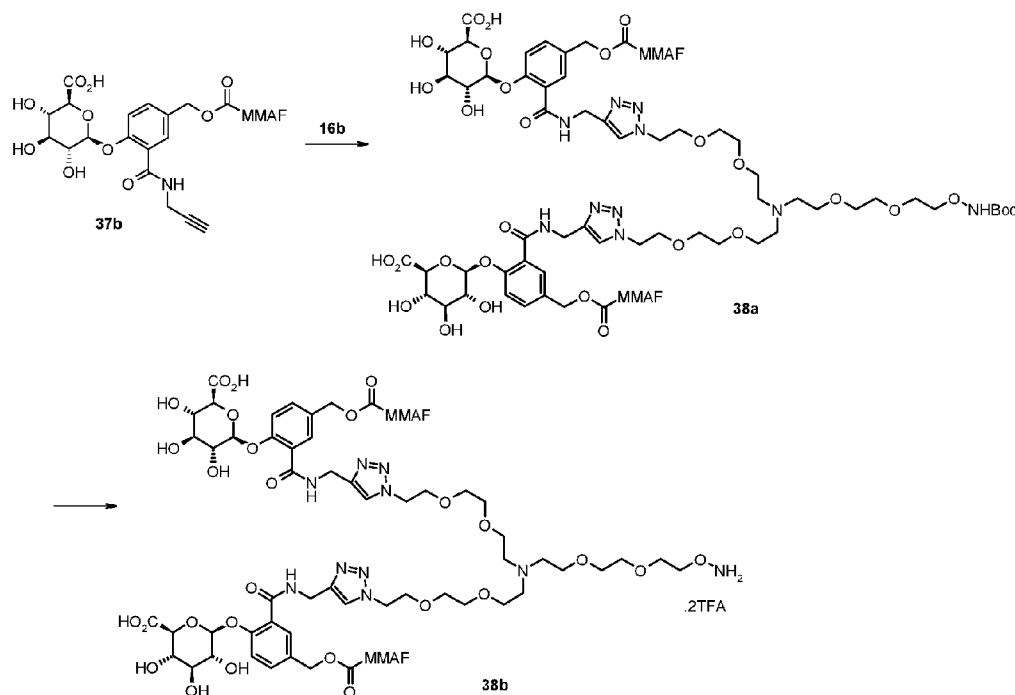
Preparación del compuesto 37c

Se añadieron CuSO₄ · 5H₂O (1 mg) y ascorbato de sodio (2 mg) a una mezcla con agitación del compuesto 37b (50 mg, 0,042 mmol) y compuesto 25c (23 mg, 0,02 mmol) en THF (2 ml) y H₂O (2 ml). Se ajustó el pH a aproximadamente 7 mediante adición de Na₂CO₃ ac. 1 M. Después de agitar a 20 °C durante 1 hora, se disolvió la mezcla de reacción en H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 37c (32,4 mg, 48 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1638,2.

Preparación del compuesto 37d

Se añadió TFA (0,4 ml) a una disolución del compuesto 37c (32,4 mg, 0,01 mmol) en DCM (2 ml). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en H₂O/MeCN (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 37d (19,6 mg, 62 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1590,2.

Ejemplo 56. Preparación del compuesto 38b

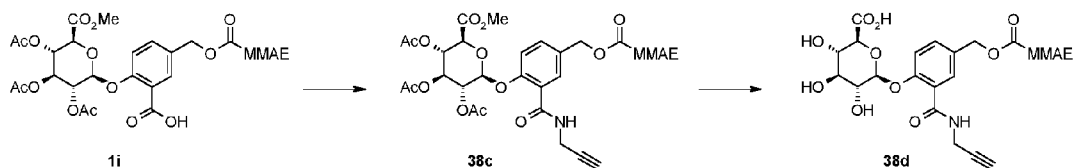


Preparación del compuesto 38a

Se añadieron CuSO₄ · 5H₂O (1 mg) y ascorbato de sodio (2 mg) a una mezcla con agitación del compuesto 37b (60 mg, 0,052 mmol) y compuesto 16b (14 mg, 0,025 mmol) en THF (2 ml) y H₂O (2 ml). Se ajustó el pH a aproximadamente 7 mediante adición de Na₂CO₃ ac. 1 M. Después de agitar a 20 °C durante 1 hora, se disolvió la mezcla de reacción en H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 38a (61 mg, 82 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1430,2.

Preparación del compuesto 38b

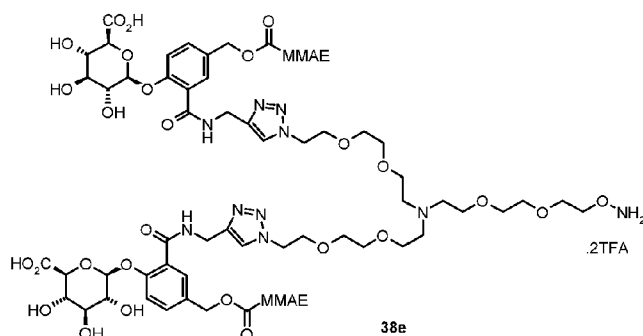
Se añadió TFA (0,4 ml) a una disolución del compuesto 38a (59,8 mg, 0,02 mmol) en DCM (2,0 ml). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en H₂O/AN (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 38b (14,6 mg, 24 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1380,1.

Ejemplo 57. Preparación del compuesto 38ePreparación del compuesto 38c

Se añadieron DIPEA (0,075 ml, 0,428 mmol) y HBTU (122 mg, 0,321 mmol) a una mezcla con agitación de propargilamina (0,016 ml, 0,256 mmol) y compuesto 1i (264 mg, 0,214 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (10 ml), NaHCO₃ ac. saturado (10 ml) y salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, que produjo el compuesto 38c (270 mg, 100 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1266,2.

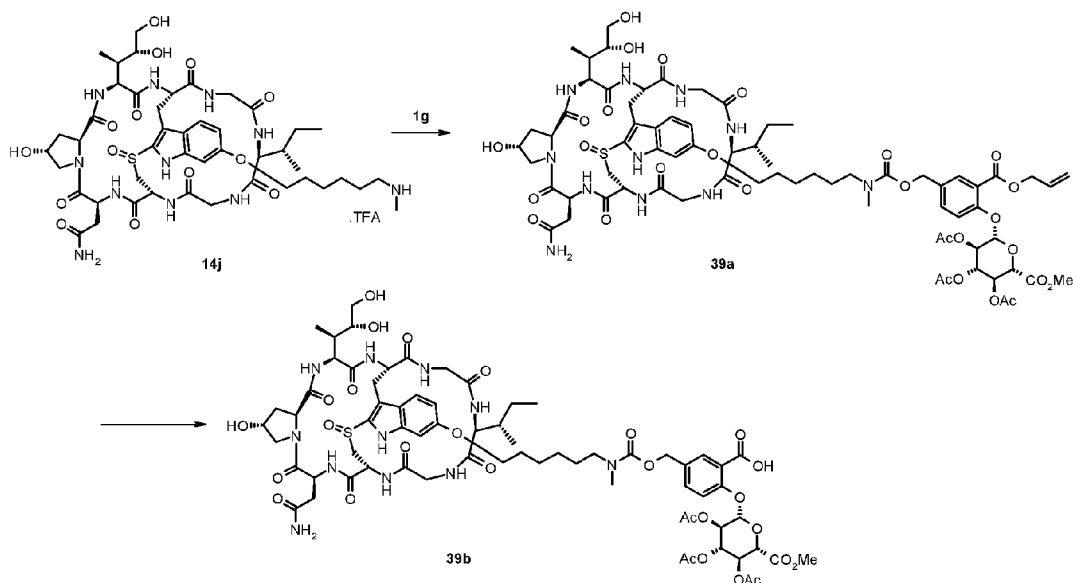
Preparación del compuesto 38d

A una disolución del compuesto 38c (270 mg, 0,213 mmol) en THF (2 ml) y MeOH (2 ml) se le añadió LiOH monohidratado (36 mg, 0,853 mmol) en H₂O (2 ml) a 0 °C. Después de agitar durante 2 horas a 0 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió el residuo en H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 38d (168 mg, 70 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1126,1.

Preparación del compuesto 38e

Se preparó el compuesto 38e a partir del compuesto 38d y compuesto 16b mediante un método similar de preparación del compuesto 38b en el ejemplo 56. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1366,2.

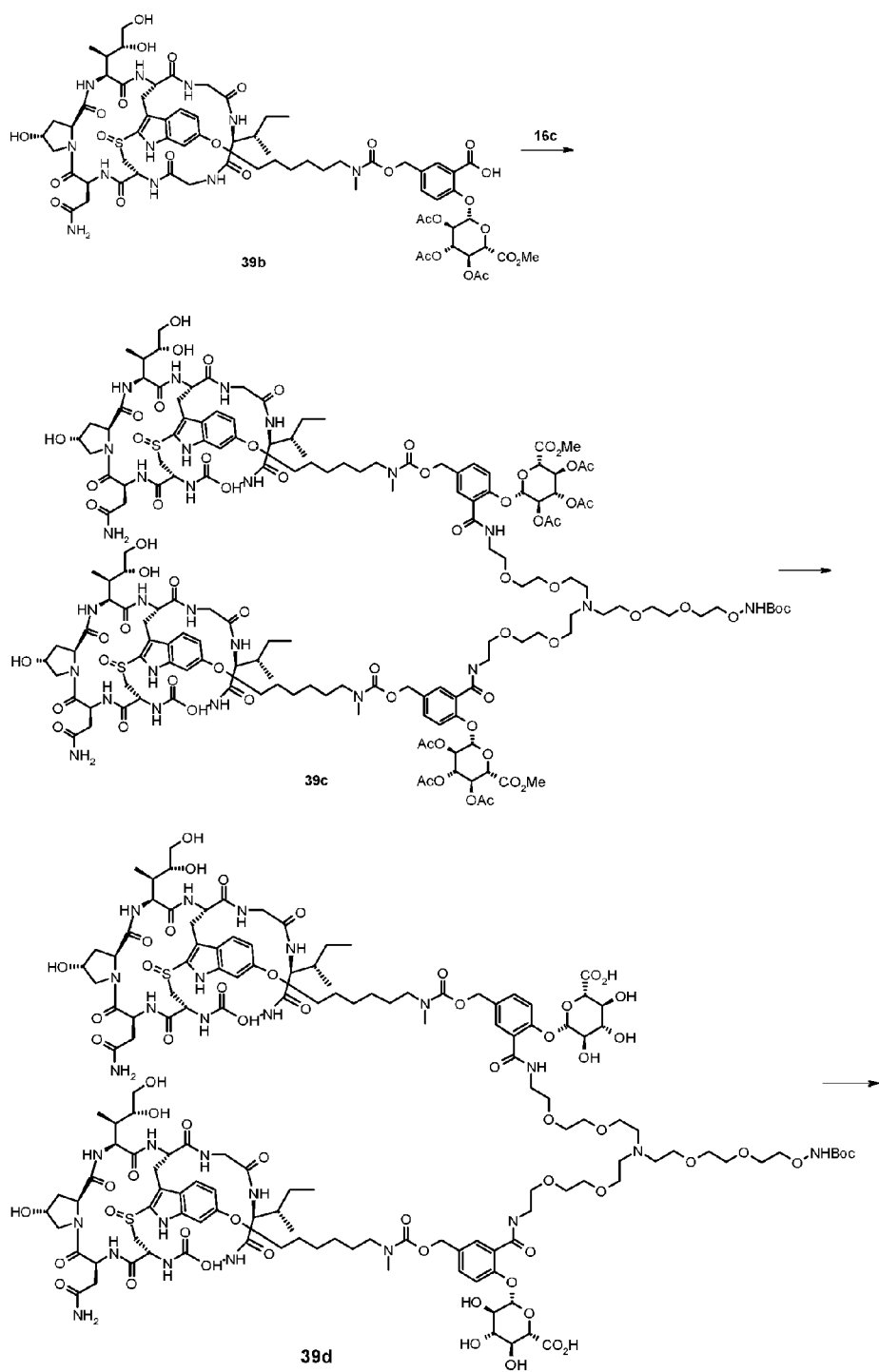
Ejemplo 58. Preparación del compuesto 39e

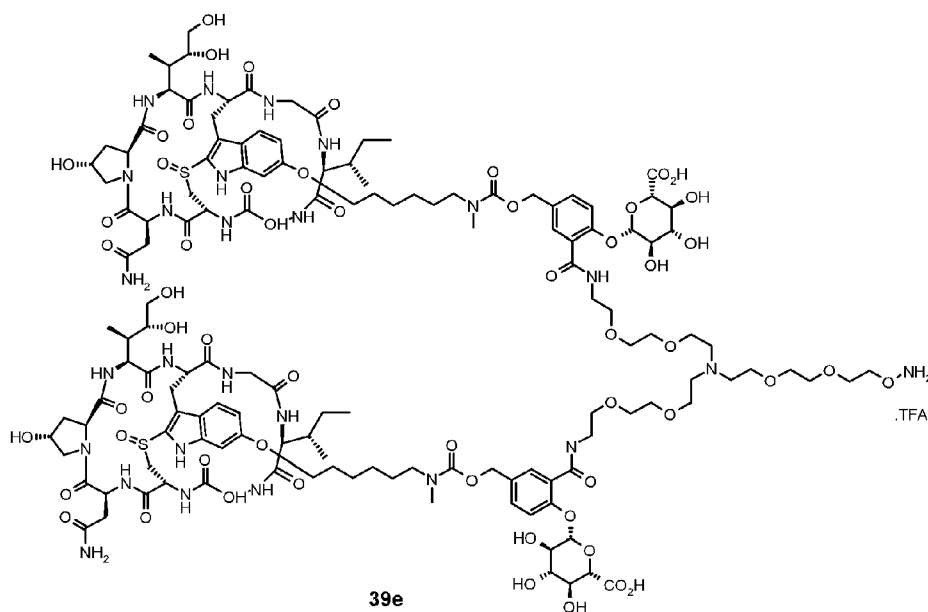
5 Preparación del compuesto 39a

Se disolvieron el compuesto 1g (27 mg, 0,039 mmol), el compuesto 14j (45 mg, 0,039 mmol) y HOBT anhidro (1 mg, 0,0078 mmol) en DMF (2 ml) a 0 °C. Luego se añadieron piridina (0,2 ml) y DIPEA (0,014 ml, 0,078 mmol). Después de agitar a 0 °C hasta temperatura ambiente durante 24 horas bajo N₂, se disolvió la mezcla de reacción en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 39a (36 mg, 58 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1582,9, [M+Na]⁺ 1604,5.

Preparación del compuesto 39b

Se disolvieron el compuesto 39a (35 mg, 0,022 mmol) y trifenilfosfina (1,5 mg, 0,005 mmol) en DCM (2 ml). Se añadieron pirrolidina (0,0025 ml, 0,026 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (1,3 mg, 0,001 mmol) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente y luego se dejó agitar durante 2 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (50 ml) y se extrajo con *n*-butanol (2 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se evaporaron a presión reducida. Se disolvió el residuo resultante en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 39b (34 mg, en bruto) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺: 1542,7.





Preparación del compuesto 39c

- 5 Se añadieron DIPEA (0,0026 ml, 0,039 mmol) y PyBOP (4,7 mg, 0,023 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 39b (15 mg, 0,009 mmol) y compuesto 16c (2,0 mg, 0,0038 mmol) en DMF (0,3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 13 horas bajo N₂, se disolvió la mezcla de reacción en DMSO (1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 39c (12 mg, 35 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1788,5.

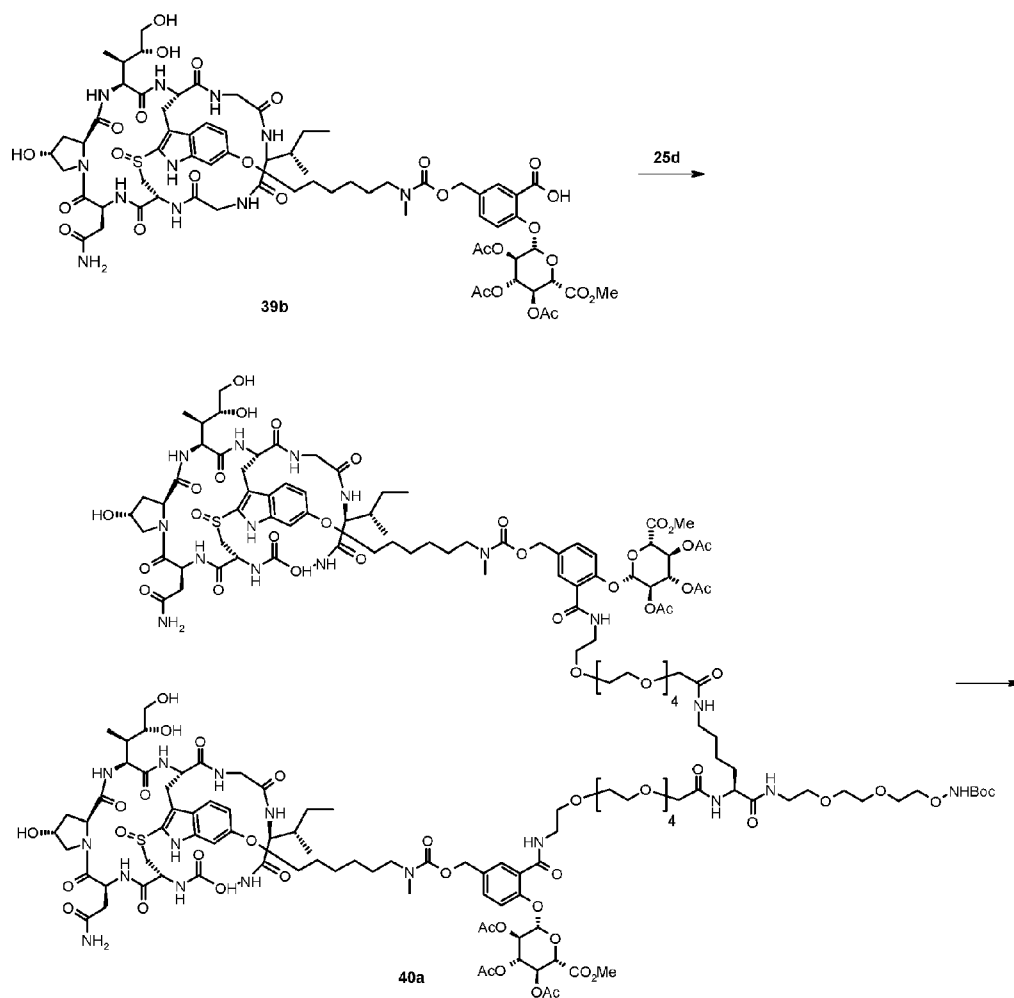
Preparación del compuesto 39d

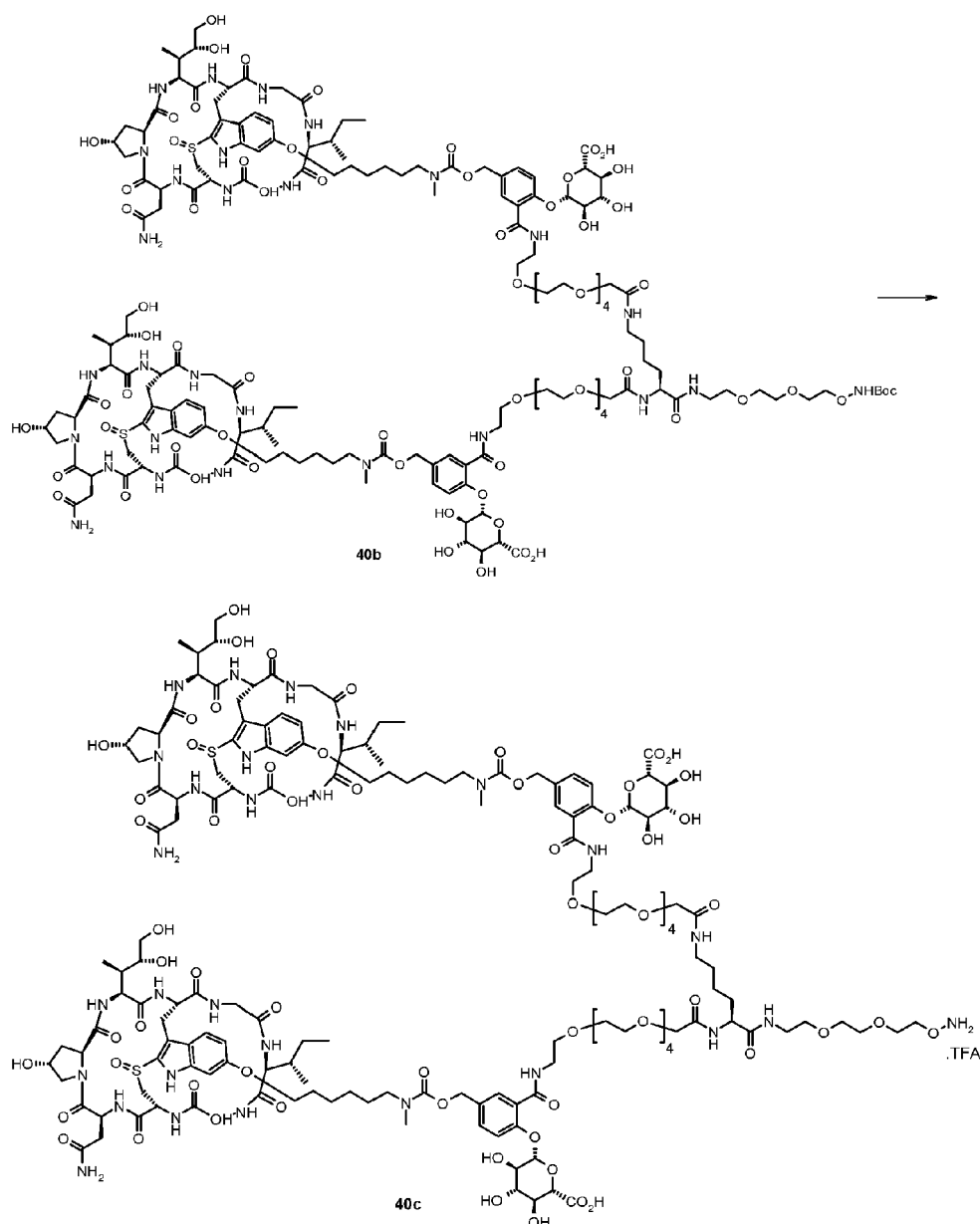
- 15 A una disolución del compuesto 39c (12 mg, 0,0033 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió LiOH monohidratado (1,4 mg, 0,033 mmol) en H₂O (1 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se ajustó el pH de la disolución con ácido acético a 4-5 y se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se disolvió el residuo resultante en DMSO (1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 39d (11 mg, 98 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1648,6.

Preparación del compuesto 39e

- 20 Se añadió TFA (0,5 ml) a una disolución con agitación del compuesto 39d (11 mg, 0,003 mmol) en DCM (3,0 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 39e (1,2 mg, 11 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1598,3.

Ejemplo 59. Preparación del compuesto 40c





Preparación del compuesto 40a

- 5 Se añadieron DIPEA (0,004 ml, 0,021 mmol) y HBTU (5,0 mg, 0,013 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 39b (20 mg, 0,012 mmol) y compuesto 25d (5,0 mg, 0,005 mmol) en DMF (1,5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se disolvió la mezcla de reacción en DMSO (1,0 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 40a (14,5 mg, 30 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1998,8.

10 Preparación del compuesto 40b

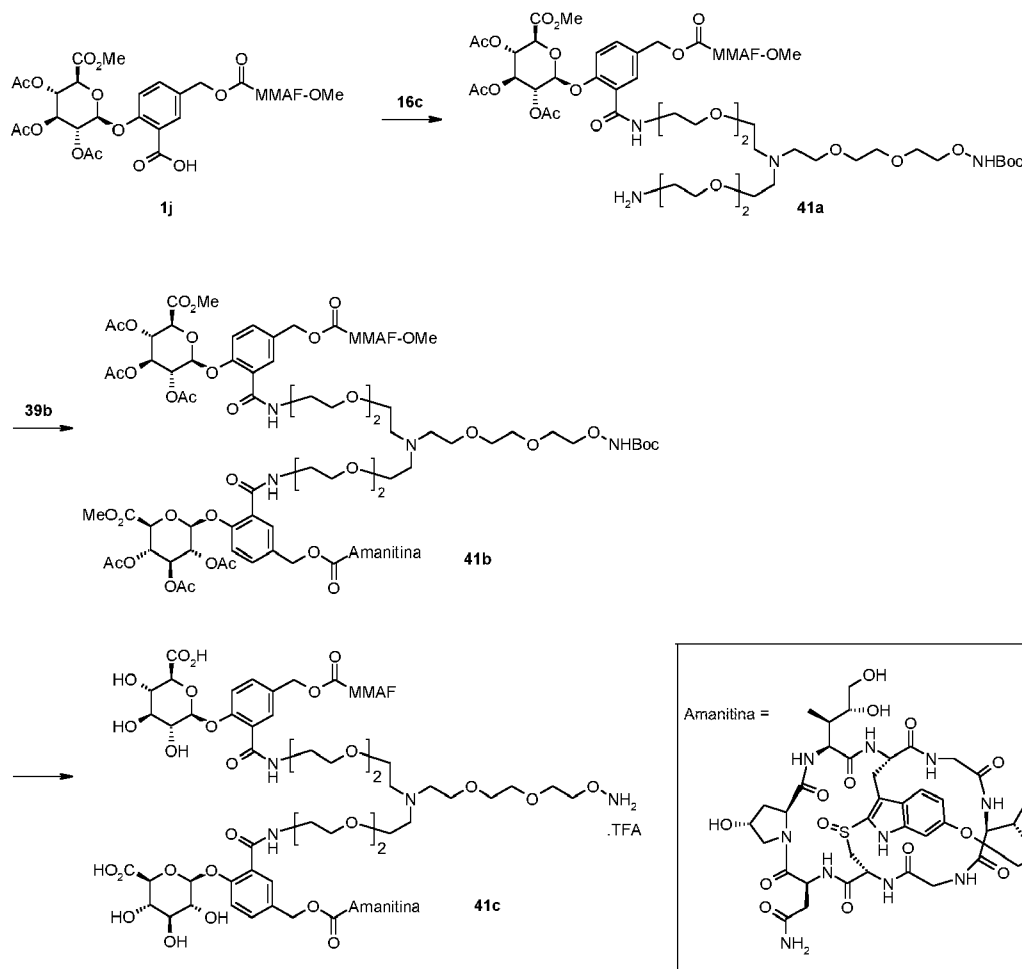
- A una disolución del compuesto 40a (10 mg, 0,0025 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió LiOH monohidratado (1,0 mg, 0,025 mmol) en H₂O (1 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió el residuo en DMSO (1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 40b (6,9 mg, 74 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1858,3.

Preparación del compuesto 40c

- 20 Se añadió TFA (0,2 ml) a una disolución con agitación del compuesto 40b (6,9 mg, 0,0018 mmol) en DCM (2,0 ml). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 40c (1,5 mg, 23 %) como un sólido de color

blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1808,6.

Ejemplo 60. Preparación del compuesto 41c



5

Preparación del compuesto 41a

Se añadieron DIPEA (0,116 ml, 0,66 mmol) y PyBOP (127 mg, 0,24 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 16c (280 mg, 0,22 mmol) y compuesto 1j (587 mg, 1,10 mmol) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (200 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 41a (250 mg, 64 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 883,2, [M+H]⁺ 1766.

15

Preparación del compuesto 41b

Se añadieron DIPEA (0,0017 ml, 0,0096 mmol) y PyBOP (2,0 mg, 0,0038 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 41a (5,7 mg, 0,0032 mmol) y compuesto 39b (5,0 mg, 0,0032 mmol) en DMF (0,5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas bajo N₂, se disolvió la mezcla de reacción en MeCN (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 41b (8,0 mg, 75 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1645.

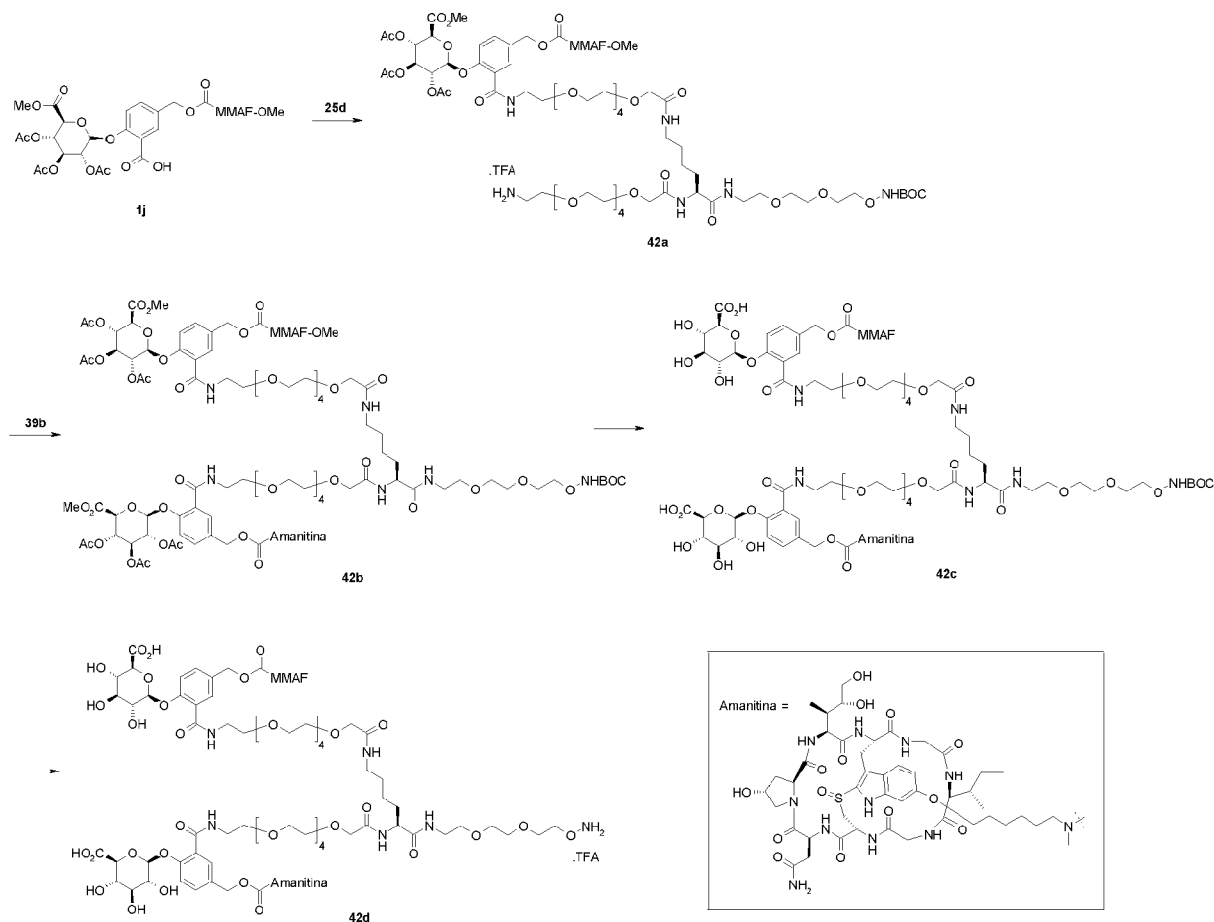
20

Preparación del compuesto 41c

A una disolución del compuesto 41b (8,0 mg, 0,0024 mmol) en MeOH (0,5 ml) se le añadió LiOH monohidratado (1,2 mg, 0,028 mmol) en H₂O (0,1 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando una disolución de HCl ac. 2 N y se concentró a presión reducida. Se diluyó el residuo resultante con DCM (2 ml) y H₂O (3 gotas). Luego se añadió TFA (0,1 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 41c (3,1 mg, 44 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1448, 1/2[M+Na]⁺ 1459.

30

Ejemplo 61. Preparación del compuesto 42d



5 Preparación del compuesto 42a

Se añadieron DIPEA (0,026 ml, 0,23 mmol) y HBTU (22 mg, 0,06 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 1j (60 mg, 0,048 mmol) y compuesto 25d (214 mg, 0,19 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se disolvió la mezcla de reacción en DMSO (1,0 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 42a (64 mg, 58 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 2286,8.

Preparación del compuesto 42b

Se añadieron DIPEA (0,011 ml, 0,06 mmol) y HBTU (14 mg, 0,036 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 42a (68 mg, 0,03 mmol) y compuesto 39b (46 mg, 0,03 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se disolvió la mezcla de reacción en DMSO (1,0 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 42b (60 mg, 52 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1906,3.

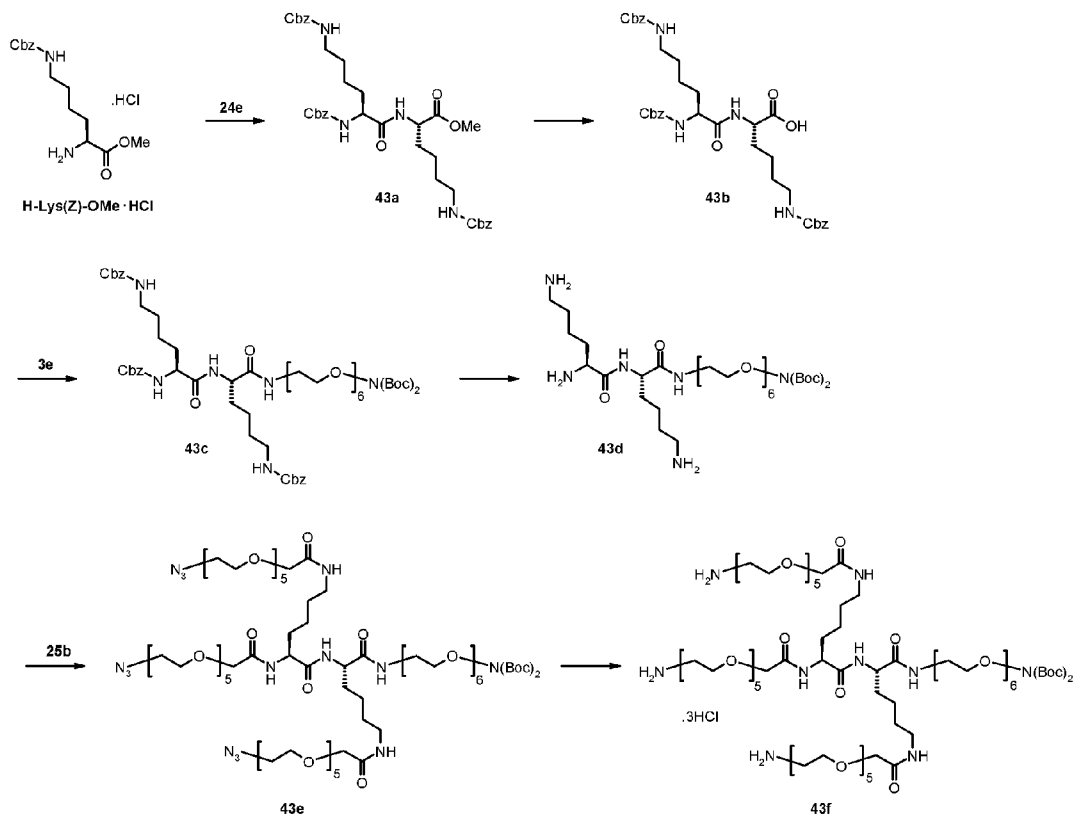
Preparación del compuesto 42c

A una disolución del compuesto 42b (60 mg, 0,016 mmol) en MeOH (2 ml) se le añadió LiOH monohidratado (5 mg, 0,126 mmol) en H₂O (2 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC prep., que produjo el compuesto 42c (37 mg, 65 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1759,3.

Preparación del compuesto 42d

Se añadió TFA (0,3 ml) a una disolución con agitación del compuesto 42c (37 mg, 0,01 mmol) en DCM (3 ml). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 42d (15 mg, 45 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 1659,6.

Ejemplo 62. Preparación del compuesto 43i



5 Preparación del compuesto 43a

Se añadieron DIPEA (10,4 ml, 23,8 mmol) y HBTU (13,5 g, 35,7 mmol) a una mezcla con agitación de clorhidrato de H-Lys(z)-OMe (7,0 g, 23,8 mmol) y compuesto 24e (9,86 mg, 23,8 mmol) en DMF (50 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 8 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 0,5 N (50 ml), NaHCO₃ ac. saturado (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 43a (9,3 g, 57 %). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,22 (d, 1H), 7,37-7,29 (m, 15H), 7,22 (m, 2H), 5,00 (s, 6H), 4,18 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,59 (s, 3H), 2,96 (m, 4H), 1,67-1,50 (m, 4H), 1,38-1,29 (m, 4H), 1,19-1,18 (m, 4H). EI-EM m/z: [M+Na]⁺ 712,96.

Preparación del compuesto 43b

A una disolución del compuesto 43a (9,3 g, 13,5 mmol) en THF:MeOH:H₂O (60 ml:30 ml:30 ml) se le añadió LiOH monohidratado (1,13 g, 26,9 mmol) a 0 °C bajo N₂. Después de 2 horas, se acidificó la mezcla de reacción con HCl ac. 1 N hasta pH 4 y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro. La filtración y concentración a presión reducida proporcionaron el compuesto 43b (9,1 g, en bruto), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 677,48, 2[M+H]⁺ 1353,82.

25 Preparación del compuesto 43c

Se añadieron DIPEA (1,47 ml, 8,44 mmol), HOBT (484 mg, 3,58 mmol) y EDC·HCl (809 mg, 4,22 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 43b (2,5 g, 3,71 mmol) y compuesto 3e (1,8 g, 3,38 mmol) en DMF (20 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se vertió la mezcla de reacción en agua (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 0,5 N (50 ml), NaHCO₃ ac. saturado (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 43c (2,3 g, 59 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1155,92, [M+H-Boc]⁺ 1055,83.

35 Preparación del compuesto 43d

A una mezcla con agitación del compuesto 43c (2,3 g, 1,99 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 424 mg, 3,98 mmol) en MeOH (200 ml) se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,99 ml, 3,98 mmol). Después de agitar a temperatura

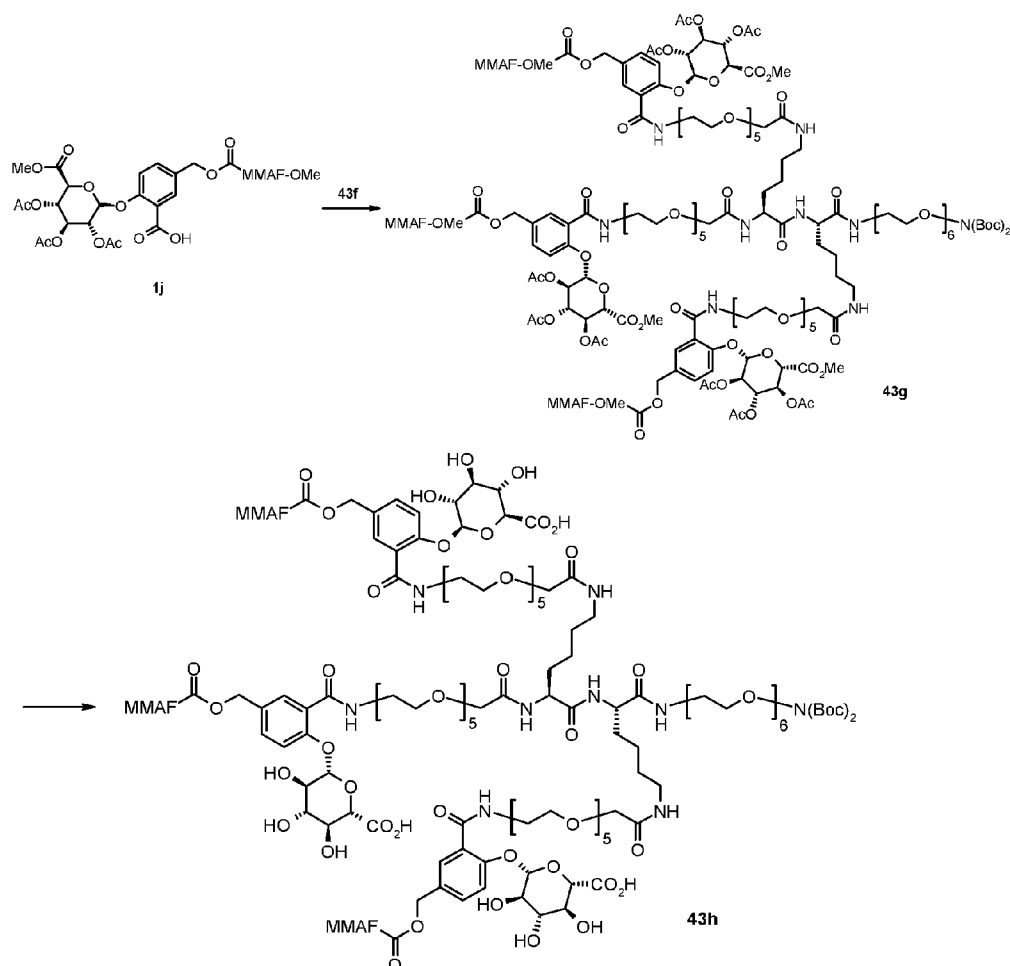
ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (100 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 43d (1,5 g, en bruto), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 753,29.

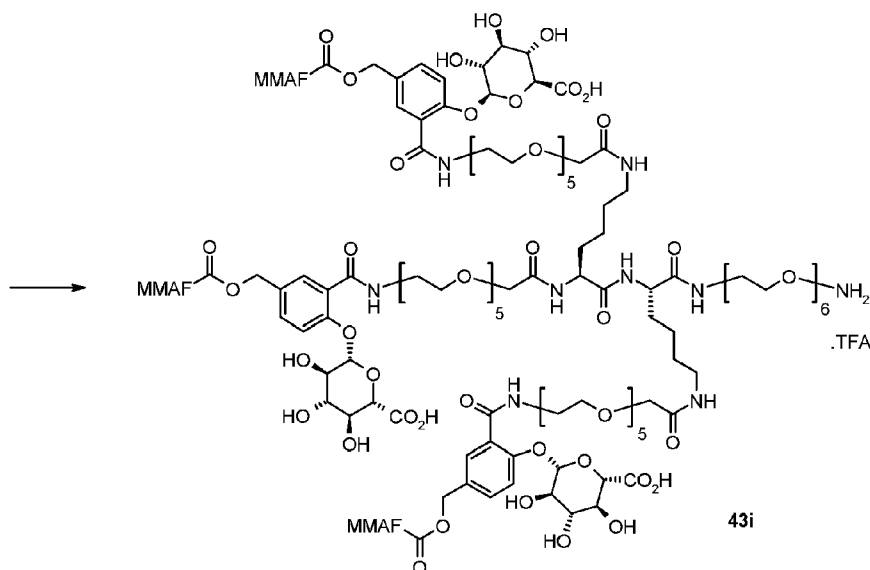
5 Preparación del compuesto 43e

Se añadieron DIPEA (0,14 ml, 0,80 mmol), HOBT (59 mg, 0,43 mmol) y EDC·HCl (102 mg, 0,53 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 43d (2,5 g, 3,71 mmol) y compuesto 25b (150 g, 0,46 mmol) en DMF (5 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 , se vertió la mezcla de reacción en agua (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 1 N (30 ml), $NaHCO_3$ ac. saturado (30 ml) y salmuera (30 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 43e (100 mg, 45 %) como un aceite incoloro. EI-EM m/z: $[M+Na]^+$ 1685,11, $1/2[M+H-Boc]^+$ 731,82.

15 Preparación del compuesto 43f

A una mezcla con agitación del compuesto 43e (100 mg, 0,06 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 20 mg, 0,192 mmol) en MeOH (20 ml) se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,045 ml, 0,18 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (30 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 43f (95 mg) como una espuma de color marrón, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1586,30, $1/2[M+H]^+$ 793,02.





Preparación del compuesto 43g

Se añadieron DIPEA (0,030 ml, 0,170 mmol) y HBTU (36 mg, 0,094 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 43f (45 mg, 0,028 mmol) y compuesto 1j (114 mg, 0,091 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas bajo N_2 , se disolvió la mezcla de reacción en $H_2O/DMSO$ (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 43g (31 mg, 21 %). EI-EM m/z: $1/3[M+H-Boc]^+$ 1705,74, $1/4[M+H-2Boc]^+$ 1254,79.

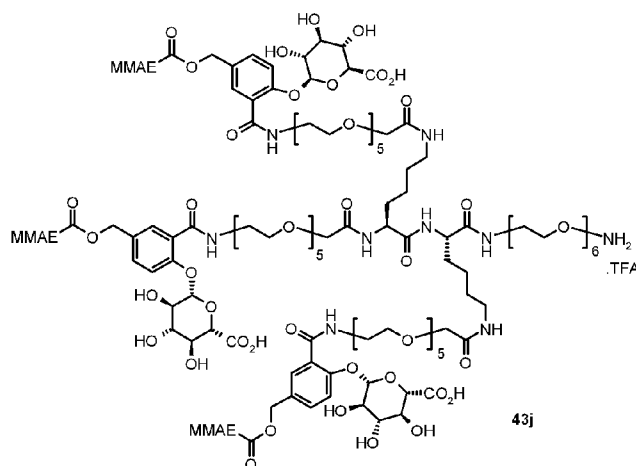
Preparación del compuesto 43h

A una disolución del compuesto 43g (31 mg, 0,006 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió LiOH monohidratado (3,7 mg, 0,088 mmol) en H_2O (1 ml) a $-20^\circ C$. Después de agitar durante 2 horas a $-20^\circ C$, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió la mezcla de reacción en $H_2O/DMSO$ (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 43h (18 mg, 64 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: $1/3[M+H-Boc]^+$ 1735,19, $1/4[M+H]^+$ 1301,95, $1/5[M+H-Boc]^+$ 1021,71.

Preparación del compuesto 43i

Se añadió TFA (0,3 ml) a una disolución con agitación del compuesto 43h (18 mg, 0,004 mmol) en DCM (1,0 ml) a $0^\circ C$. Después de agitar durante 1 hora, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N_2 . Luego se disolvió el residuo en $H_2O/MeCN$ (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 43i (6 mg, 33 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: $1/3[M+H]^+$ 1547,75, $1/4[M+H]^+$ 1161,14.

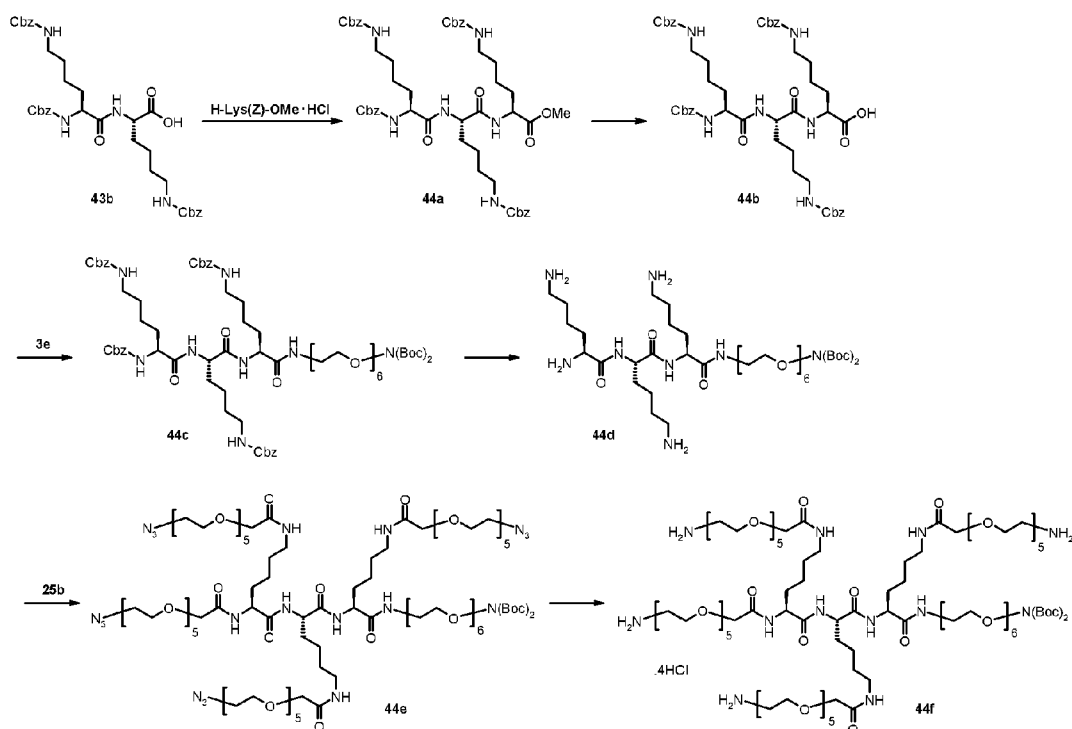
Ejemplo 63. Preparación del compuesto 43j



Se preparó el compuesto 43j a partir del compuesto 1i y compuesto 43f mediante un método similar de preparación

del compuesto 43i en el ejemplo 62. EI-EM m/z: $1/3[M+H]^+$ 1532,37, $1/4[M+H]^+$ 1149,69.

Ejemplo 64. Preparación del compuesto 44i



Preparación del compuesto 44a

Se añadieron DIPEA (1,9 ml, 11,0 mmol) y HBTU (2,5 g, 6,64 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto clorhidrato de H-Lys(z)-OMe (1,3 g, 4,43 mmol) y compuesto 43b (3,0 g, 4,43 mmol) en DMF (30 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 , se diluyó la mezcla de reacción con agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 0,5 N (50 ml), $NaHCO_3$ ac. saturado (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 44a (3,9 g, 93 %). EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 953,42.

Preparación del compuesto 44b

A una disolución del compuesto 44a (2,1 g, 2,20 mmol) en THF:MeOH:H₂O (24 ml:8 ml:8 ml) se le añadió LiOH monohidratado (185 mg, 4,40 mmol) a temperatura ambiente bajo N_2 . Después de 2 horas, se acidificó la mezcla de reacción con HCl ac. 1 N hasta pH 4 y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 anhidro. La filtración y concentración a presión reducida proporcionaron el compuesto 44b (2,0 g), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 939,35, $[M+Na]^+$ 961,37.

Preparación del compuesto 44c

Se añadieron DIPEA (0,93 ml, 5,33 mmol) y HBTU (1,21 g, 3,20 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 44b (2,0 g, 2,13 mmol) y compuesto 3e (1,14 g, 2,13 mmol) en DMF (20 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 , se vertió la mezcla de reacción en agua (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl ac. 0,5 N (50 ml), $NaHCO_3$ ac. saturado (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 44c (2,60 g, 86 %). EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1418,44, $[M+Na]^+$ 1440,39, $[M+H-Boc]^+$ 1318,47.

Preparación del compuesto 44d

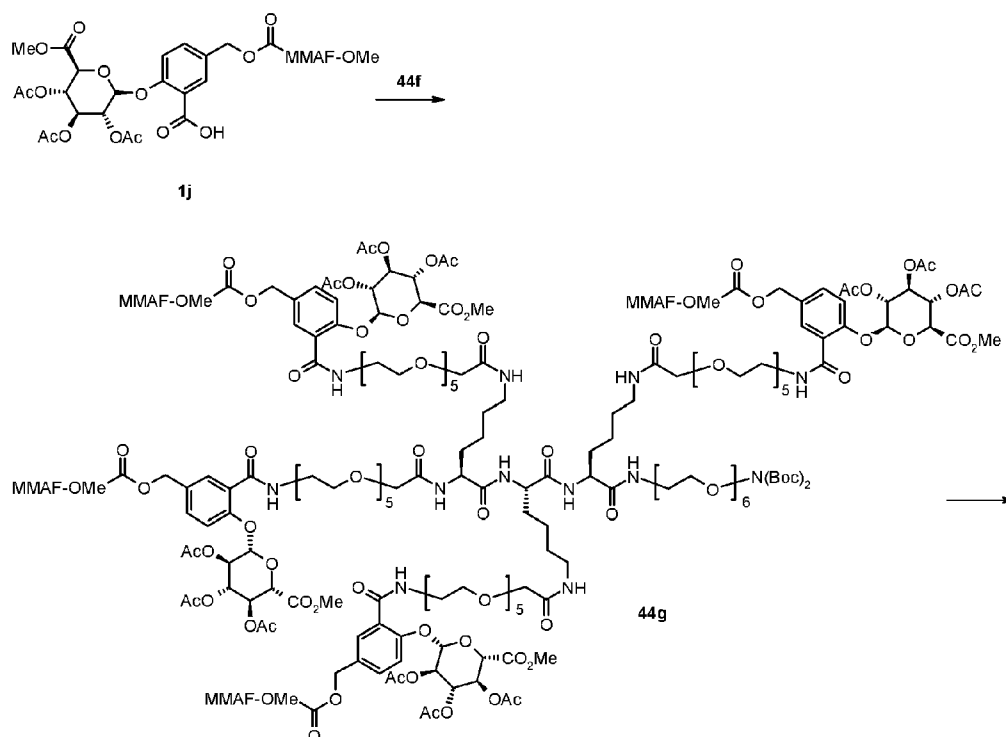
A una mezcla con agitación del compuesto 44c (2,60 g, 1,83 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 781 mg, 7,34 mmol) en MeOH (50 ml) se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,9 ml, 3,67 mmol). Y luego se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno. Se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (50 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 44d (1,73 g) como una espuma de color amarillo, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 881,90.

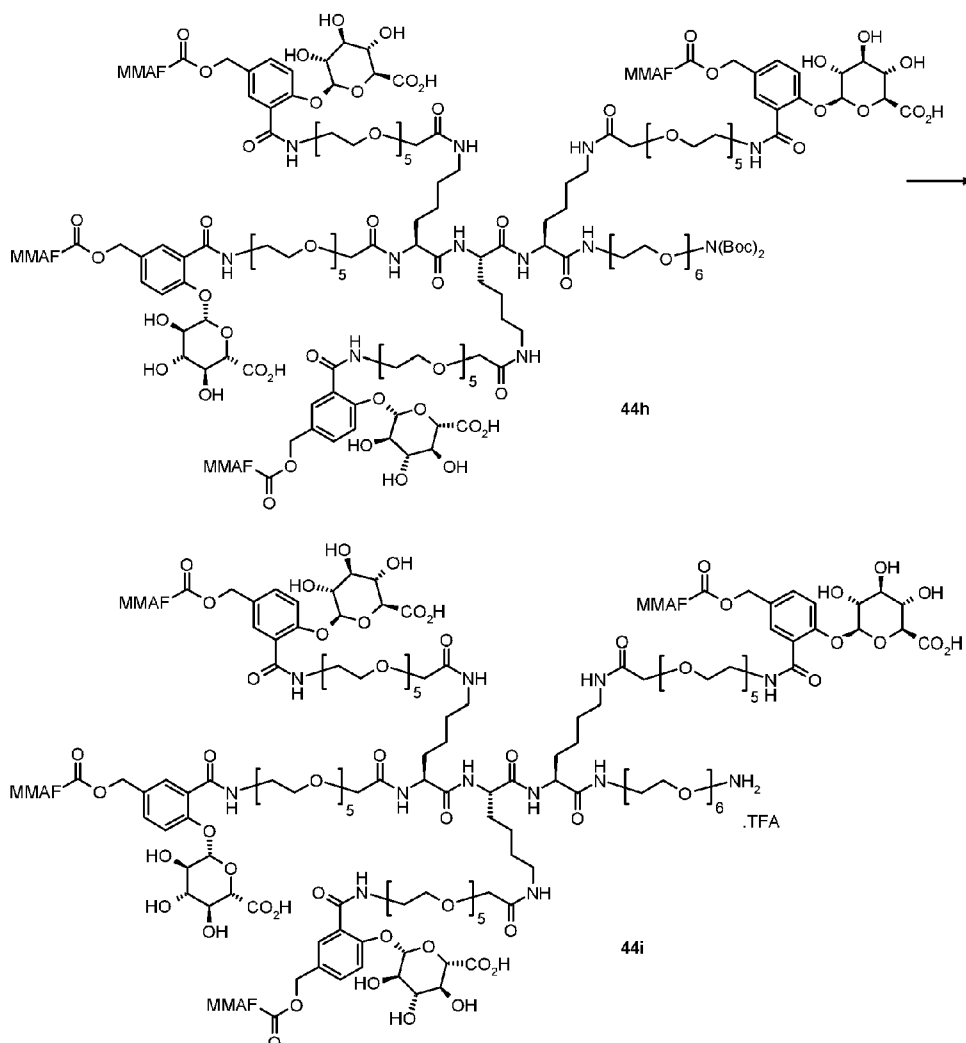
Preparación del compuesto 44e

Se añadieron DIPEA (1,58 ml, 9,08 mmol) y HBTU (2,58 g, 6,81 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 44d (1,0 g, 1,13 mmol) y compuesto 25b (1,82 g, 5,67 mmol) en DMF (20 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron de manera secuencial las fases orgánicas combinadas con HCl 0,5 N (50 ml), NaHCO₃ ac. saturado (50 ml) y salmuera (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración a presión reducida, se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 44e (848 mg, 36 %). EI-EM m/z: 1/2[M+H-2Boc]⁺ 947,63.

Preparación del compuesto 44f

A una mezcla con agitación del compuesto 44e (848 mg, 0,40 mmol) y Pd/C (10 % en peso, 172 mg, 1,62 mmol) en MeOH (50 ml) se le añadió HCl (4 N en 1,4-dioxano, 0,4 ml, 1,62 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas bajo hidrógeno, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se lavó con MeOH (50 ml). Se concentró el filtrado para producir el compuesto 44f (625 mg, en bruto), que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: 1/2[M+H]⁺ 996,40, 1/3 [M+H]⁺ 664,59





Preparación del compuesto 44g

- 5 Se añadieron DIPEA (0,067 ml, 0,386 mmol) y HBTU (110 mg, 0,289 mmol) a una mezcla con agitación del compuesto 44f (96 mg, 0,048 mmol) y compuesto 1j (303 mg, 0,24 mmol) en DMF (3 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas bajo N_2 , se disolvió la mezcla de reacción en $H_2O/DMSO$ (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 44g (67 mg, 20 %). EI-EM m/z: $1/3[M+H]^+ 2315,93$, $1/4[M+H]^+ 1737,60$, $1/5[M+H]^+ 1390,37$.

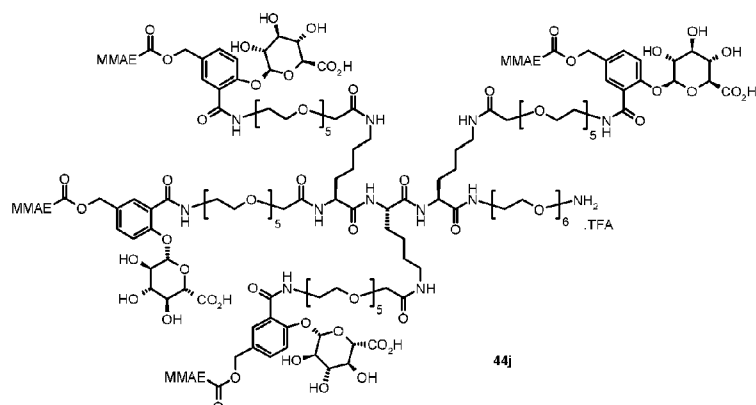
Preparación del compuesto 44h

- 15 A una disolución del compuesto 44g (67 mg, 0,009 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió LiOH monohidratado (8,1 mg, 0,192 mmol) en H_2O (1 ml) a $-20^\circ C$. Después de agitar durante 2 horas a $-20^\circ C$, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió la mezcla de reacción en $H_2O/DMSO$ (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 44h (27,9 mg, 45 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: $1/3[M+H]^+ 2110,24$, $1/4[M+H]^+ 1582,97$, $1/4[M+H-Boc]^+ 1557,91$.

Preparación del compuesto 44i

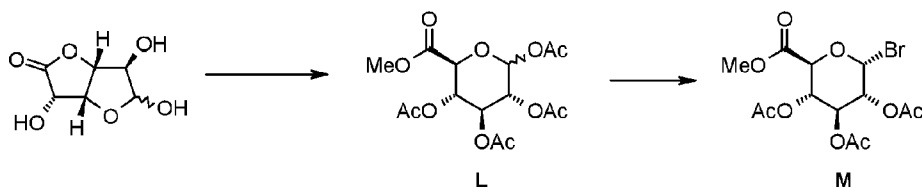
- 20 Se añadió TFA (0,3 ml) a una disolución con agitación del compuesto 44h (27,9 mg, 0,004 mmol) en DCM (1,0 ml) a $0^\circ C$. Después de agitar durante 1 hora, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N_2 . Luego se disolvió el residuo en $H_2O/MeCN$ (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 44i (13,6 mg, 50 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: $1/3[M+H]^+ 2043,49$, $1/4[M+H]^+ 1532,96$, $1/5[M+H]^+ 1226,62$.

Ejemplo 65. Preparación del compuesto 44j



- 5 Se preparó el compuesto 44j a partir del compuesto 1i y compuesto 44f mediante un método similar de preparación del compuesto 44i en el ejemplo 64. EI-EM m/z : $1/3[M+H]^+$ 2025,37, $1/4[M+H]^+$ 1519,10, $1/5[M+H]^+$ 1215,60.

Ejemplo 66. Preparación del compuesto 45k

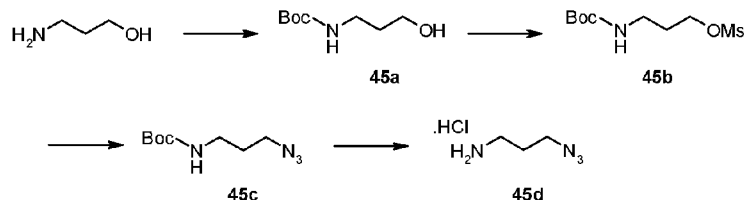


Preparación del compuesto L

Se disolvió D-glucurono-6,3-lactona (25,0 g, 141,9 mmol) en MeOH (250 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y se le añadió lentamente una disolución de NaOH (141 mg) en MeOH (100 ml). Después de agitar durante 24 horas, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y luego se añadieron piridina (66 ml) y anhídrido acético (71 ml) por debajo de 10 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se sometió a cromatografía en columna, que produjo el compuesto L (41,6 g, 77 %). $^1\text{H-RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5,77 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 5,31 (t, $J = 9,6$ Hz, 1H), 5,24 (t, $J = 9,6$ Hz, 1H), 5,14 (m, 1H), 4,17 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,04 (m, 9H).

Preparación del compuesto M

Se disolvió el compuesto L (10,0 g, 26,6 mmol) en HBr (33 % en AcOH, 20 ml) a 0 °C bajo nitrógeno. Se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas, se le añadió tolueno (50 ml) y se concentró la mezcla a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para producir el compuesto M (10,9 g, 99 %). $^1\text{H-RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 6,64 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 5,61 (t, $J = 3,6$ Hz, 1H), 5,24 (t, $J = 3,6$ Hz, 1H), 4,85 (m, 1H), 4,58 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,05 (s, 3H).



Preparación del compuesto 45a

Se disolvió 3-amino-1-propanol (3,0 g, 66,57 mmol) en DCM (150 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y se le añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (16 g, 73,23 mmol). Se agitó la mezcla obtenida a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se concentró el disolvente a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que produjo el compuesto 45a (6,4 g, 92 %). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4,78 (s, 1H), 3,65 (m, 2H), 3,30 (m, 2H), 2,90 (s, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,48 (s, 9H).

Preparación del compuesto 45b

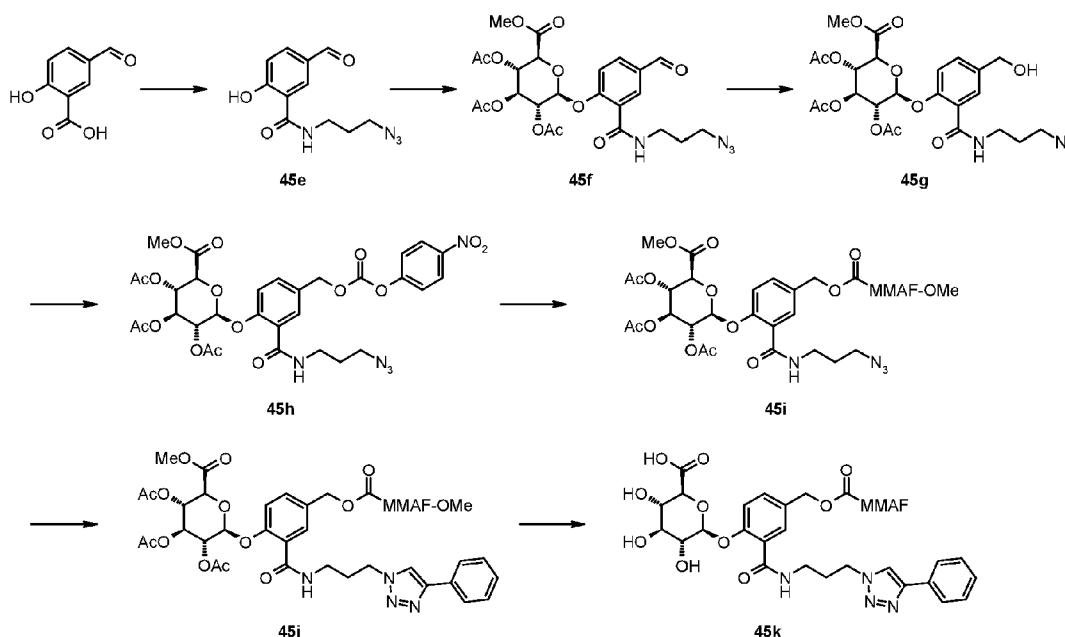
Se disolvieron el compuesto 45a (6,04 g, 34,47 mmol) y trietilamina (14,4 ml, 103,4 mmol) en THF a 0 °C bajo nitrógeno y luego se trataron lentamente con anhídrido metanosulfónico (7,21 g, 41,36 mmol). Se agitó la mezcla obtenida a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se concentró el disolvente a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que produjo el compuesto 45b (9,01 g, 98 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,73 (s, 1H), 4,30 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 3,31-3,24 (m, 2H), 3,04 (s, 3H), 1,94 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

Preparación del compuesto 45c

Se disolvió el compuesto 45b (3,0 g, 11,84 mmol) en DMF (40 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se trató con NaN₃ (924 mg, 14,21 mmol) y se agitó la mezcla obtenida a 60 °C durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se le añadieron EtOAc (50 ml), agua destilada (50 ml) y HCl ac. 1 N (5 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que produjo el compuesto 45c (2,3 g, 99 %). ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 4,63 (s, 1H), 3,36 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,24-3,18 (m, 2H), 1,80-1,75 (m, 2H), 1,45 (s, 9H).

Preparación del compuesto 45d

Se disolvió el compuesto 45c (3,8 g, 18,98 mmol) en DCM (10 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadió lentamente HCl 4 M en dioxano (10 ml). Después de agitar durante 12 horas, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida, que produjo el compuesto 45d (2,5 g, 99 %). ¹H-RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 8,06 (s, 3H), 3,47 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,82 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,84-1,79 (m, 2H).

Preparación del compuesto 45e

Se disolvieron el compuesto 45d (58 mg, 0,42 mmol) y ácido 5-formilsalicílico (100 mg, 0,60 mmol) en DMF (2 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se añadieron DIPEA (0,2 ml, 1,20 mmol) y PyBop (375 mg, 0,72 mmol) a la mezcla de reacción. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, se le añadieron EtOAc (30 ml) y agua destilada (10 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que dio el compuesto 45e (82 mg, 79 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 13,39 (s, 1H), 9,87 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,89 (dd, *J* = 1,6, 7,2 Hz, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,10 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 3,63-3,57 (m, 2H), 3,48 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 1,99-1,92 (m, 2H).

Preparación del compuesto 45f

Se disolvieron el compuesto 45e (78 mg, 0,31 mmol) y el compuesto M (125 mg, 0,31 mmol) en MeCN (3 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadieron óxido de plata (291 mg, 1,26 mmol) y tamiz molecular de 4 Å (125 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, se filtró la mezcla a través de Celite y se concentró el filtrado a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que produjo el compuesto 45f (160 mg, 90 %). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10,00 (s, 1H), 8,66 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 8,02 (dd, *J* =

2,0, 6,4 Hz, 1H), 7,46 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H), 7,14 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 5,48-5,33 (m, 4H), 4,28 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,73-3,64 (m, 1H), 3,50-3,42 (m, 3H), 2,09-2,07 (m, 9H), 2,00-1,92 (m, 2H).

Preparación del compuesto 45g

Se disolvió el compuesto 45f (160 mg, 1,51 mmol) en 2-propanol (0,4 ml) y cloroformo (2 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadieron gel de sílice (2 g) y borohidruro de sodio (27 mg, 0,71 mmol). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se filtró el reactante a través de Celite y se concentró el filtrado a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna, que produjo el compuesto 45g (115 mg, 71 %). $^1\text{H-RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8,06 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,50-7,44 (m, 2H), 7,01 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 5,45-5,31 (m, 4H), 4,38 (s, 2H), 4,22 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,67-3,61 (m, 1H), 3,46-3,41 (m, 3H), 2,07-2,04 (m, 9H), 1,97-1,91 (m, 2H).

Preparación del compuesto 45h

Se disolvió el compuesto 45g (100 mg, 0,18 mmol) en DMF (1 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadieron carbonato de bis(4-nitrofenilo) (110 mg, 0,35 mmol) y DIPEA (0,050 ml, 0,27 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, se le añadieron EtOAc (30 ml) y agua destilada (10 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para producir el compuesto 45h (75 mg, 58 %). $^1\text{H-RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8,29-8,27 (m, 2H), 8,23 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,54 (dd, $J = 2,4, 6,6$ Hz, 1H), 7,49 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H), 7,39-7,37 (m, 2H), 7,04 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 5,45-5,29 (m, 4H), 5,28 (s, 2H), 4,23 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,68-3,64 (m, 1H), 3,46-3,42 (m, 3H), 2,08-2,05 (m, 9H), 1,98-1,93 (m, 2H).

Preparación del compuesto 45i

Se disolvió el compuesto 45h (50 mg, 0,068 mmol) en DMF (0,8 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadió MMAF-OMe (51 mg, 0,068 mmol). Se trató la mezcla resultante con HOBT (2 mg, 0,013 mmol), piridina (0,24 ml) y DIPEA (0,012 ml, 0,068 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 18 horas, se le añadieron EtOAc (20 ml) y agua destilada (10 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para producir el compuesto 45i (71 mg, 78 %). EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1339.

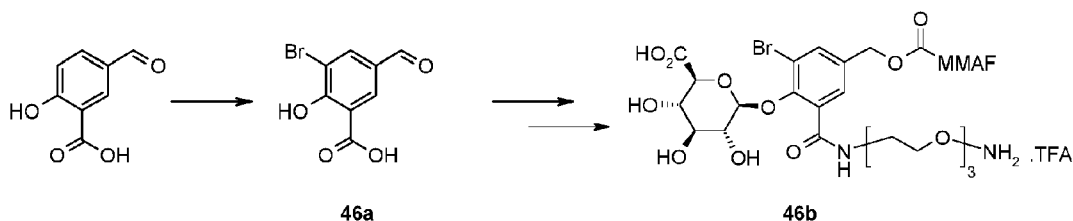
Preparación del compuesto 45j

Se disolvieron el compuesto 45i (30 mg, 0,022 mmol) y fenilacetileno (3,7 μl , 0,033 mmol) en EtOH (0,2 ml) y agua (30 μl) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadieron disolución ac. de CuSO_4 0,1 M (30 μl) y disolución ac. de ascorbato de sodio 1,0 M (30 μl). Se trató la mezcla resultante con HOBT (2 mg, 0,013 mmol), piridina (0,24 ml) y DIPEA (12 μl , 0,068 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 horas, se le añadieron EtOAc (20 ml) y agua destilada (5 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para producir el compuesto 45j (26 mg, 81 %). EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1441.

Preparación del compuesto 45k

Se disolvió el compuesto 45j (20 mg, 0,013 mmol) en MeOH (0,2 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadió $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6 mg, 0,14 mmol) en agua (0,2 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, se le añadieron cloroformo (10 ml), MeOH (1 ml), agua destilada (10 ml) y HCl ac. 0,5 N (1 ml). Se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para producir el compuesto 45k (17 mg, 87 %). EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1286.

Ejemplo 67. Preparación del compuesto 46b



Preparación del compuesto 46a

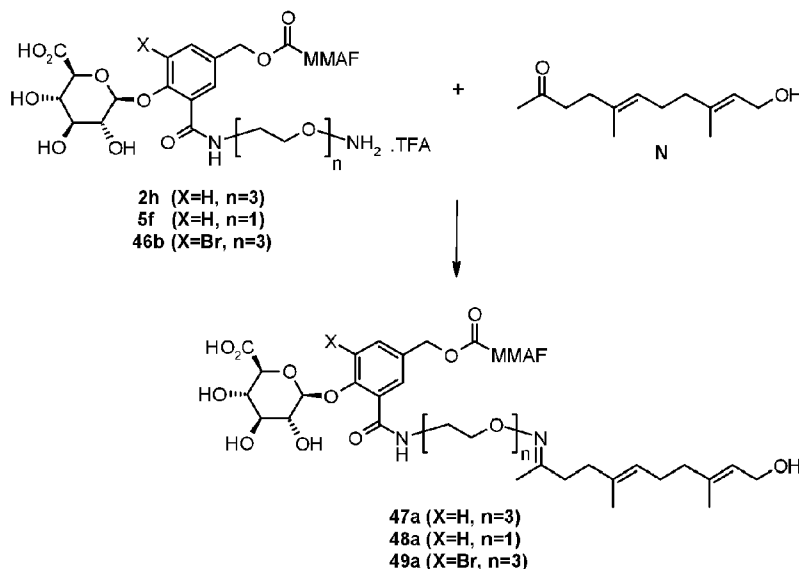
Se disolvió ácido 5-formilsalicílico (1,0 g, 6,02 mmol) en DMF (20 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadió *N*-bromosuccinimida (1,07 g, 6,11 mmol) y se agitó la mezcla a 70 °C durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se le añadieron EtOAc (100 ml), disolución de HCl ac. 2 N (2 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase

orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para producir el compuesto 46a (1,2 g, 84 %). ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,64 (s, 1H), 8,19 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 8,00 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 3,16 (s, 1H).

5 Preparación del compuesto 46b

Se preparó el compuesto 46b a partir del compuesto 46a mediante un método similar de preparación del compuesto 2h en el ejemplo 4. EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1328.

10 Ejemplos 68 a 70. Preparación del compuesto 47a, compuesto 48a y compuesto 49a



15 Se preparó el compuesto N mediante un método dado a conocer en la publicación abierta a consulta por el público de patente coreana n.º 10-2014-0035393.

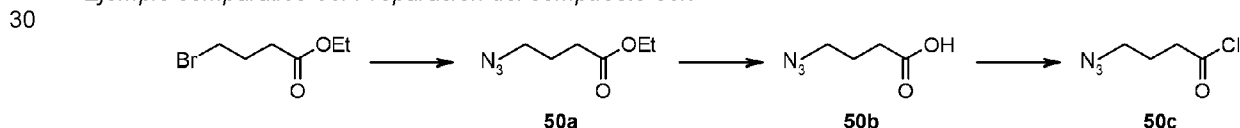
Ejemplo 68. Preparación del compuesto 47a

20 Se disolvió el compuesto 2h (20 mg, 0,014 mmol) en EtOH (0,7 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadió el compuesto N (3,7 mg, 0,017 mmol) y se agitó la mezcla a 45 °C durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se obtuvo el compuesto 47a (10,2 mg, 49 %) usando HPLC. EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1441.

Ejemplos 69 y 70. Preparación del compuesto 48a y 49a

25 Se prepararon el compuesto 48a (ejemplo 69) y compuesto 49a (ejemplo 70) mediante un método similar de preparación del compuesto 47a en el ejemplo 68. EI-EM de compuesto 48a m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1353. EI-EM de compuesto 49a m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1520.

Ejemplo comparativo 66. Preparación del compuesto 50k



Preparación del compuesto 50a

35 Se disolvió 4-bromobutanoato de etilo (5,0 ml, 34,6 mmol) en MeOH (75 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadió NaN_3 (4,5 g, 69,2 mmol) en agua (25 ml) y se agitó a 85 °C durante 8 horas. Después de completarse la reacción, se concentró el disolvente a presión reducida y se le añadieron cloroformo (300 ml) y agua destilada (200 ml). Se secó la fase orgánica obtenida tal como se describió anteriormente sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para producir el compuesto 50a (5,1 g, 94 %). ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 4,15 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,36 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,94-1,89 (m, 2H), 1,28 (t, $J = 8,4$ Hz, 3H).

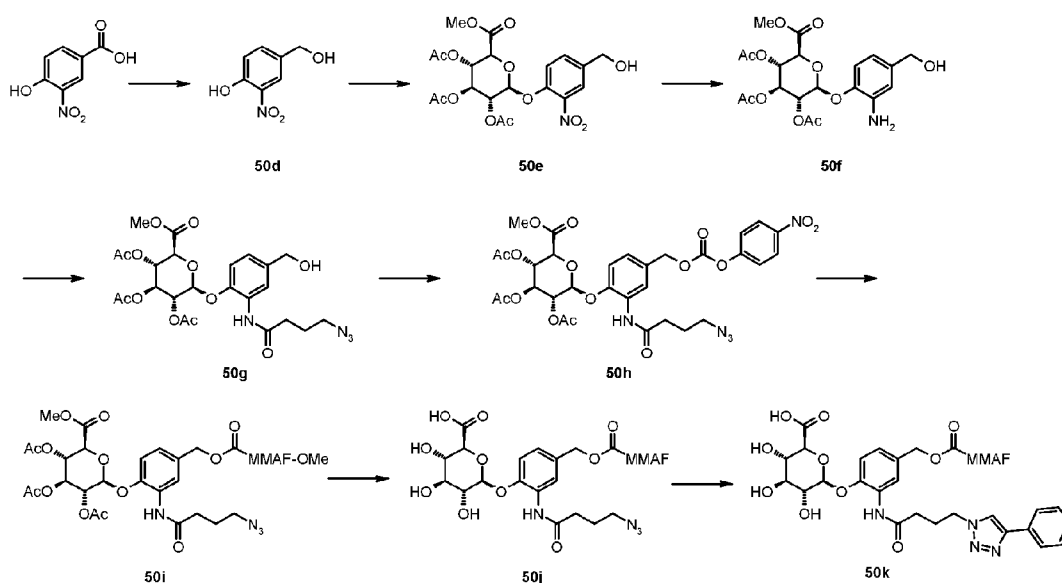
40

Preparación del compuesto 50b

Se disolvió el compuesto 50a (2,0 g, 12,7 mmol) en MeOH (32 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadió lentamente KOH (3,56 g, 63,6 mmol) en agua (26 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, se concentró el disolvente a presión reducida y se le añadieron cloroformo (300 ml), HCl ac. 1 N (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica obtenida tal como se describió anteriormente sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo resultante a cromatografía en columna para producir el compuesto 50b (1,28 g, 78 %). ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 3,38 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,48 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,95-1,90 (m, 2H).

Preparación del compuesto 50c

Se disolvió el compuesto 50b (850 mg, 6,58 mmol) en MeOH (10 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadieron cloruro de oxalilo (1,1 ml, 13,2 mmol) y DMF (1 gota) y se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Después de completarse la reacción, se concentró el disolvente a presión reducida para producir el compuesto 50c (965 mg), que se usó sin purificación adicional.

Preparación del compuesto 50d

Se disolvió ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzoico (5,0 g, 27,3 mmol) en THF (120 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadió complejo de BH₃-THF 1 M (54,6 ml, 54,6 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Después de completarse la reacción, se le añadieron EtOAc (200 ml), HCl ac. 0,5 N (20 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica obtenida tal como se describió anteriormente sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo resultante a cromatografía en columna para producir el compuesto 50d (4,2 g, 91 %). ¹H-RMN (600 MHz, CD₃OD) δ 8,06 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,59 (dd, J = 1,2, 7,8 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,83 (s, 2H).

Preparación del compuesto 50e

Se disolvió el compuesto 50d (937 mg, 5,54 mmol) en MeCN (15 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y se le añadieron el compuesto M (2,0 g, 5,04 mmol), óxido de plata (4,66 g, 20,1 mmol) y tamiz molecular de 4 Å (2,0 g) y se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla a través de Celite y se concentró el filtrado a presión reducida. Se sometió el residuo resultante a cromatografía en columna para producir el compuesto 50e (1,0 g, 40 %). ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 7,81 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,54 (dd, J = 1,8, 6,6 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,37-5,27 (m, 3H), 5,20 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 4,72 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 4,21 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,04-2,02 (m, 1H).

Preparación del compuesto 50f

Se disolvió el compuesto 50e (900 mg, 6,35 mmol) en EtOAc (100 ml) y luego se le añadió óxido de platino (IV) (84,2 mg, 0,370 mmol) y se agitó a temperatura ambiente bajo hidrógeno durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla a través de Celite y se concentró el filtrado a presión reducida para producir el compuesto 50f (700 mg, 83 %), que se usó sin purificación adicional.

Preparación del compuesto 50g

Se disolvió el compuesto 50f (350 mg, 0,77 mmol) en DCM (10 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadieron el compuesto 50c (136 mg, 0,92 mmol) y DIPEA (0,27 ml, 1,54 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de completarse la reacción, se le añadieron EtOAc (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica obtenida tal como se describió anteriormente sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo resultante a cromatografía en columna para producir el compuesto 50g (280 mg, 65 %). ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 8,37 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,07 (dd, *J* = 1,8, 6,6 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,43-5,28 (m, 3H), 5,06 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,63 (s, 2H), 4,19 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,44-3,41 (m, 2H), 2,56 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 2,17-2,00 (m, 12H).

Preparación del compuesto 50h

Se disolvió el compuesto 50g (250 mg, 0,44 mmol) en DMF (4 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadieron carbonato de bis(4-nitrofenilo) (270 mg, 0,88 mmol) y DIPEA (0,12 ml, 0,66 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de completarse la reacción, se le añadieron EtOAc (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica obtenida tal como se describió anteriormente sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo resultante a cromatografía en columna para producir el compuesto 50h (290 mg, 90 %). ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 8,54 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 8,28-8,25 (m, 2H), 8,02 (s, 1H), 7,40-7,36 (m, 2H), 7,11 (dd, *J* = 1,8, 6,6 Hz, 1H), 6,96 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,44-5,29 (m, 3H), 5,23 (s, 2H), 5,10 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,21 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,45-3,42 (m, 2H), 2,58 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,11-2,00 (m, 12H).

Preparación del compuesto 50i

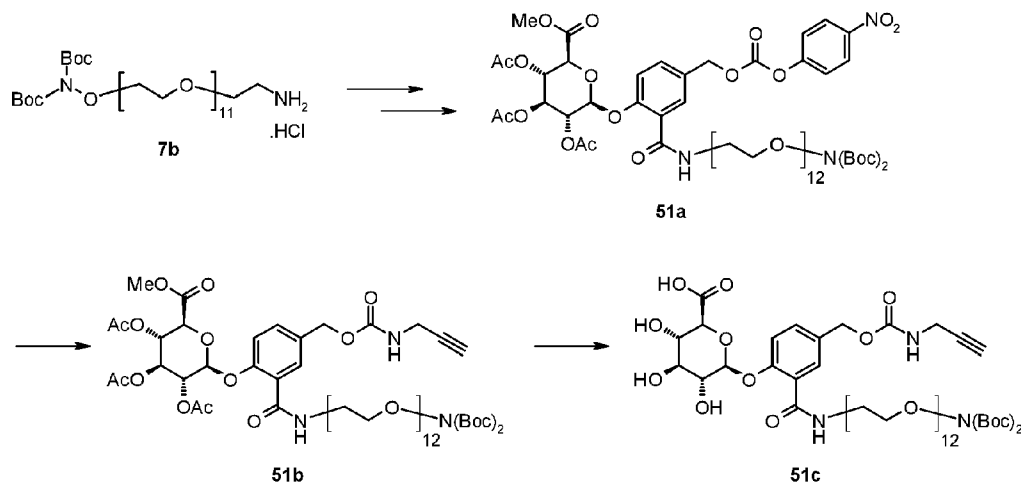
Se disolvió el compuesto 50h (250 mg, 0,34 mmol) en DMF (4 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadió MMAF-OMe (255 mg, 0,34 mmol). Se trató la mezcla resultante con HOBt (9 mg, 0,068 mmol), piridina (1,2 ml) y DIPEA (0,060 ml, 0,34 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 días, se le añadieron EtOAc (50 ml), HCl ac. 2 N (5 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica obtenida tal como se describió anteriormente sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para producir el compuesto 50i (340 mg, 74 %). EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 1339.

Preparación del compuesto 50j

Se disolvió el compuesto 50i (210 mg, 0,156 mmol) en MeOH (2 ml) a 0 °C bajo nitrógeno y luego se le añadió LiOH·H₂O (66 mg, 1,56 mmol) en agua (2 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se le añadieron cloroformo (50 ml), MeOH (5 ml), agua destilada (50 ml) y HCl ac. 0,5 N (5 ml). Se secó la fase orgánica obtenida tal como se describió anteriormente sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo resultante a cromatografía en columna para producir el compuesto 50j (107 mg, 57 %). EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 1184.

Preparación del compuesto 50k

Se disolvieron el compuesto 50j (10 mg, 0,008 mmol) y fenilacetileno (0,92 µl, 0,008 mmol) en EtOH (0,15 ml) y agua (10 µl) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y luego se le añadieron disolución acuosa de CuSO₄ 0,1 M (10 µl) y disolución acuosa de ascorbato de sodio 1,0 M (10 µl). Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 horas, se le añadieron EtOAc (10 ml) y agua destilada (5 ml). Se secó la fase orgánica obtenida tal como se describió anteriormente sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo resultante a cromatografía en columna para producir el compuesto 50k (5 mg, 46 %). EI-EM *m/z*: [M+H]⁺ 1286.

Ejemplo 71. Preparación del compuesto 51h**5 Preparación del compuesto 51a**

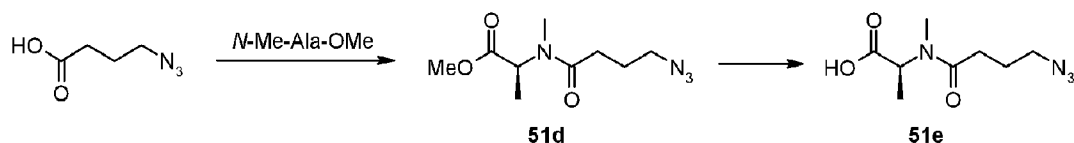
Se preparó el compuesto 51a a partir del compuesto 7b mediante un método similar al método de preparación del compuesto 14h del ejemplo 23. EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1392,8, $[M+H-Boc]^+$ 1292,7, $[M+Na]^+$ 1414,8.

10 Preparación del compuesto 51b

Se disolvieron el compuesto 51a (1,8 g, 1,29 mmol), propargilamina (0,1 ml, 1,55 mmol) y HOBt anhidro (35 mg, 0,25 mmol) en DMF (5 ml) a 0 °C. Luego se añadieron piridina (0,2 ml) y DIPEA (0,45 ml, 2,59 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas bajo N_2 , se diluyó la mezcla de reacción con H_2O (100 ml) y disolución de NH_4Cl ac. saturada (50 ml). Después de la extracción con EtOAc (2 x 100 ml), se secaron las fases orgánicas combinadas sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 51b (1,15 g, 68 %). ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,01 (s, 1H), 7,48-7,31 (m, 2H), 7,02 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,45-5,20 (m, 4H), 5,09 (s, 2H), 4,19 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 4,10-4,05 (m, 2H), 3,97 (s, 2H), 3,85-3,45 (m, 49H), 2,24 (s, 1H), 2,05 (s, 9H), 1,53 (s, 18H). EI-EM m/z: $[M+Na]^+$ 1330,3.

20 Preparación del compuesto 51c

A una disolución del compuesto 51b (1,15 g, 0,879 mmol) en THF/MeOH (20 ml/20 ml) se le añadió LiOH monohidratado (151 mg, 3,603 mmol) en H_2O (20 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo resultante en DMSO (5 ml) y se purificó mediante HPLC prep., que produjo el compuesto 51c (600 mg, 60 %). EI-EM m/z: $[M+H]^+$ 1169,2.

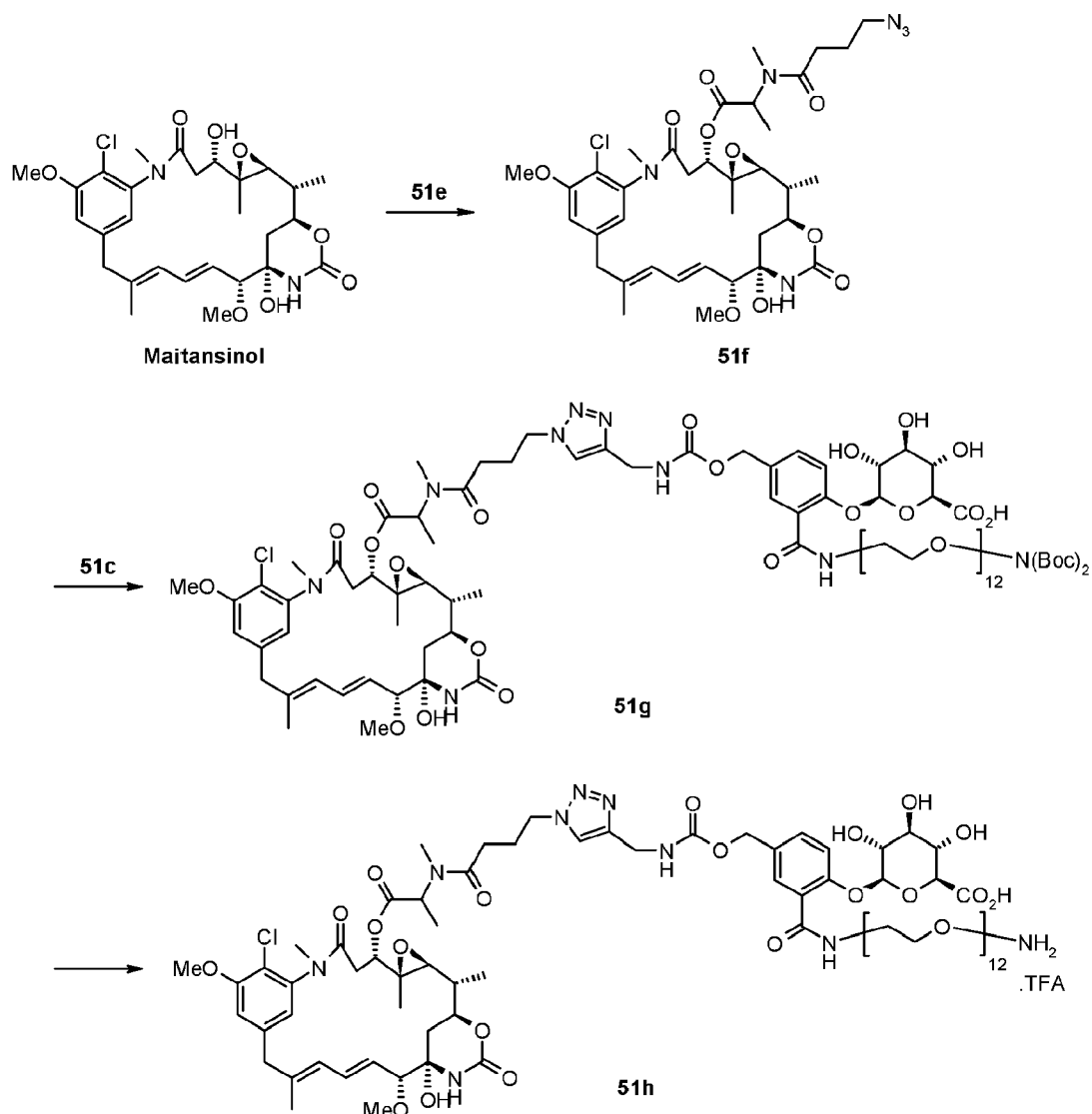
**30 Preparación del compuesto 51d**

Se añadieron DIPEA (0,92 ml, 5,30 mmol) y HBTU (1,0 g, 2,64 mmol) a una mezcla con agitación de ácido 4-azidobutanoico (228 mg, 1,76 mmol) y *N*-Me-Ala-OMe (298 mg, 1,94 mmol) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 14 horas bajo N_2 , se diluyó la mezcla de reacción con H_2O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 51d (310 mg, 77 %). ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,22 (q, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,39 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,95 (s, 3H), 2,52-2,39 (m, 2H), 1,98-1,92 (m, 2H), 1,41 (d, 3H).

40 Preparación del compuesto 51e

A una disolución del compuesto 51d (310 mg, 1,36 mmol) en MeOH (3 ml) se le añadió LiOH monohidratado (114 mg, 2,72 mmol) en H_2O (3 ml) a -20 °C. Después de agitar a 0 °C durante 1 hora, se diluyó la mezcla de reacción con disolución de H_2O/HCl ac. 2 N (50 ml/2 ml) y se extrajo con Et₂O (2 x 30 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 anhidro. La filtración y concentración produjeron el compuesto 51e (246 mg),

que se usó sin purificación adicional. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,15 (q, 1H), 3,39 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,98 (s, 3H), 2,49-2,45 (m, 2H), 1,98-1,92 (m, 2H), 1,41 (d, 3H).



5

Preparación del compuesto 51f

A una disolución de maitansinol (50 mg, 0,088 mmol) y compuesto 51e (113 mg, 0,528 mmol) en DCM (6 ml) bajo N_2 se le añadió una disolución de DIC (0,087 ml, 0,557 mmol) en DCM (1,4 ml). Después de 1 minuto, se añadió una disolución de ZnCl_2 (1 M en Et_2O , 0,11 ml, 0,11 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (10 ml). Se lavó la fase orgánica con NaHCO_3 ac. saturado (4 ml) y salmuera (2 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a presión reducida. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 51f (50 mg, 74 %) como una mezcla de maitansinoides diastereoméricos. EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 761,7.

15

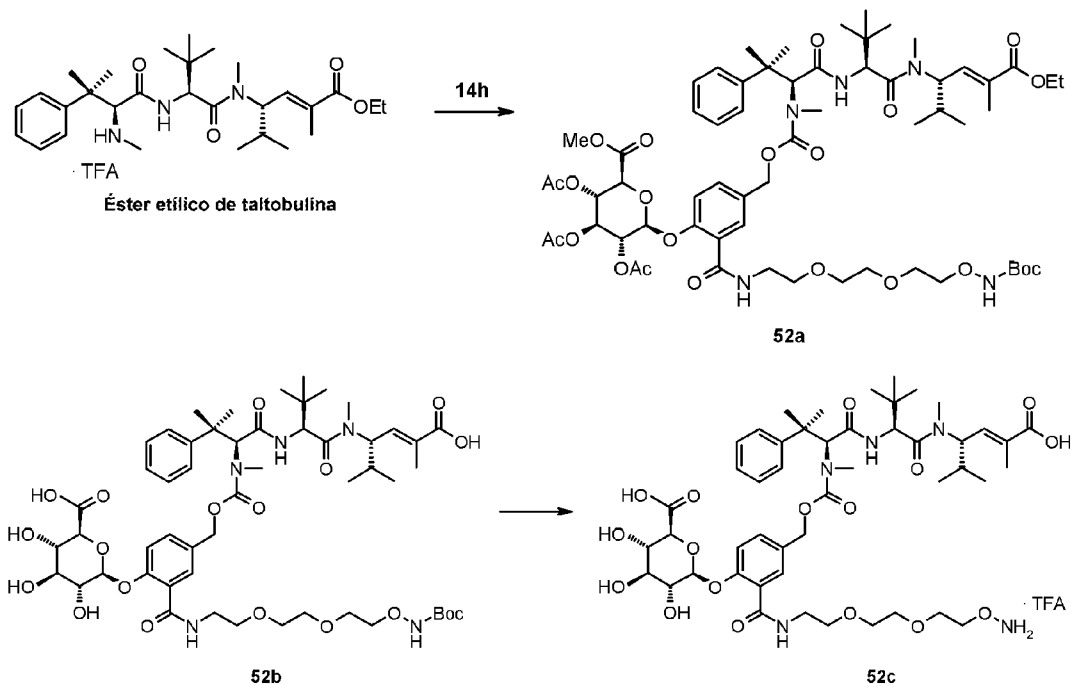
Preparación del compuesto 51g

Se añadieron $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 mg) y ascorbato de sodio (10 mg) a una mezcla con agitación del compuesto 51f (78 mg, 0,102 mmol) y compuesto 51c (132 mg, 0,112 mmol) en DMSO (4 ml) y H_2O (1 ml). Se ajustó el pH a aproximadamente 7 mediante adición de Na_2CO_3 ac. 1 M. Después de agitar a 20 °C durante 1 hora, se disolvió la mezcla de reacción en $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se concentraron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 51g (72,1 mg, 37 %). EI-EM m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1930,9, $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ 1830,9.

25

Preparación del compuesto 51h

Se añadió TFA (0,2 ml) a una disolución con agitación del compuesto 51g (72,1 mg, 0,037 mmol) en DCM (1 ml). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en H₂O/MeCN (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 51h (17 mg de isómero más polar y 6,0 mg de isómero menos polar, 36 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1730,8.

Ejemplo 72. Preparación del compuesto 52cPreparación del compuesto 52a

Se disolvieron éster etílico de taltobulina (sal de TFA, 80 mg, 0,029 mmol), compuesto 14h (128 mg, 0,0142 mmol) y HOBt anhidro (3,5 mg, 0,026 mmol) en DMF (3 ml) a 0 °C. Luego se añadieron piridina (0,5 ml) y DIPEA (0,045 ml, 0,26 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (10 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 10 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 52a (70 mg, 43 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1258,6, [M+H-Boc]⁺ 1158,6.

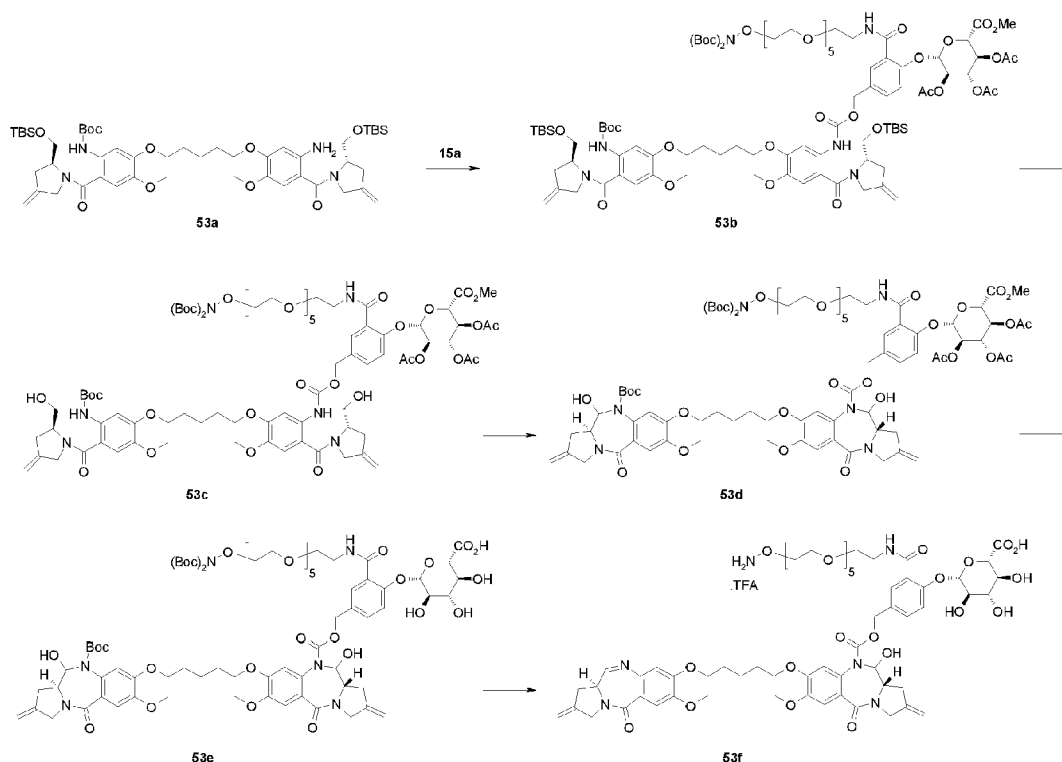
Preparación del compuesto 52b

A una disolución del compuesto 52a (70 mg, 0,055 mmol) en MeOH (1,4 ml) se le añadió LiOH monohidratado (11,7 mg, 0,275 mmol) en H₂O (1,4 ml) a -20 °C. Después de 1 hora a 0 °C, se ajustó el pH de la disolución a 4-5 con ácido acético. Se disolvió la disolución resultante en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 52b (4,5 mg, 8 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1090,4.

Preparación del compuesto 52c

A una disolución del compuesto 52b (4,5 mg, 0,0041 mmol) en DCM (1 ml) se le añadió TFA (0,2 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se purificó el residuo mediante HPLC, que produjo el compuesto 52c (2,4 mg, 59 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 990,4.

Ejemplo 73. Preparación del compuesto 53f



5 Preparación del compuesto 53b

Se disolvieron el compuesto 53a (300 mg, 0,31 mmol, el compuesto 53a se preparó mediante un método dado a conocer en la patente WO2013/055987 A1), el compuesto 15a (355 mg, 0,31 mmol) y HOBt anhidro (10 mg, 0,06 mmol) en DMF (0,5 ml) a 0 °C. Luego se añadieron piridina (0,3 ml) y DIPEA (0,14 ml, 0,78 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 23 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con disolución de H₂O/NH₄Cl ac. saturado (100 ml/50 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 53b (250 mg, 41 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1943,6, [M+Na]⁺ 1965,6.

15 Preparación del compuesto 53c

A una disolución del compuesto 53b (300 mg, 0,31 mmol) en THF/H₂O (2 ml/1 ml) se le añadió ácido acético (3 ml) a 0 °C bajo N₂. Después de 22 horas, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna para dar el compuesto 53c (140 mg, 68 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1713,6.

Preparación del compuesto 53d

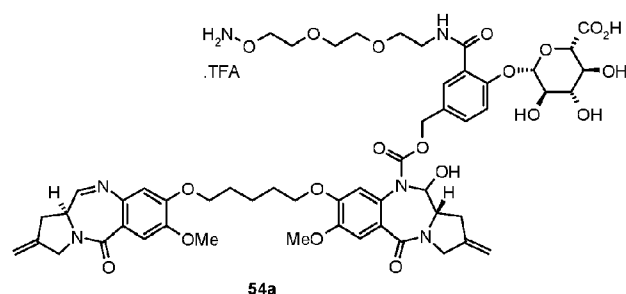
A una disolución del compuesto 53c (120 mg, 0,07 mmol) en DCM (10 ml) se le añadieron clorocromato de piridinio (158 mg, 0,42 mmol) y tamiz molecular de 4 Å (50 mg) a temperatura ambiente bajo N₂. Después de agitar durante 18 horas, se filtró la mezcla de reacción a través de una almohadilla de Celite y se concentró a presión reducida. Se obtuvo el compuesto resultante 53d (95 mg, 75 %) como un aceite incoloro, que se usó sin purificación adicional. EI-EM m/z: [M+Na]⁺ 1732,8.

Preparación del compuesto 53e

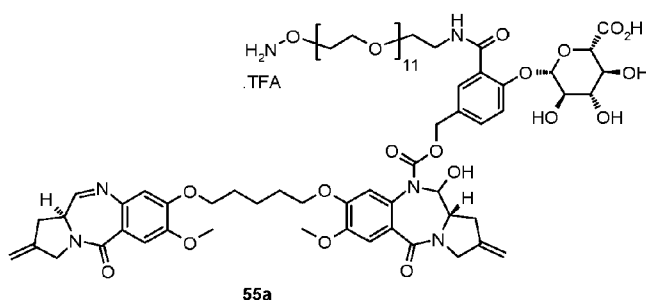
A una disolución del compuesto 53d (95 mg, 0,056 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió LiOH monohidratado (12 mg, 0,278 mmol) en H₂O (1 ml) a 0 °C. Después de 2 horas a 0 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo resultante en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC prep., que produjo el compuesto 53e (6 mg, 7 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1569,7.

Preparación del compuesto 53f

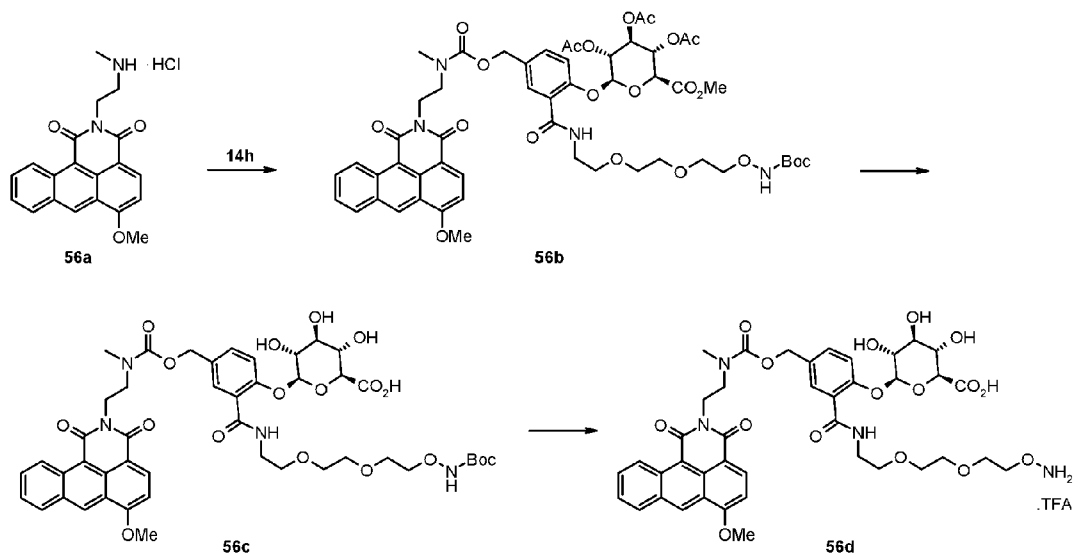
Se añadió TFA (0,2 ml) a una disolución con agitación del compuesto 53e (6 mg, 0,004 mmol) en DCM (2 ml). Después de agitar a 0 °C durante 2 horas, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en DMSO (1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 53f (2,7 mg, 53 %) como un sólido de color blanco. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1251,3.

Ejemplo 74. Preparación del compuesto 54a

Se preparó el compuesto 54a a partir del compuesto 53a y compuesto 14h mediante un método similar de preparación del compuesto 53f en el ejemplo 73.

Ejemplo 75. Preparación del compuesto 55a

Se preparó el compuesto 55a a partir del compuesto 53a y compuesto 51a mediante un método similar de preparación del compuesto 53f en el ejemplo 73. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1516,7, 1/2[M+H]⁺ 758,7.

Ejemplo 76. Preparación del compuesto 56d

Preparación del compuesto 56b

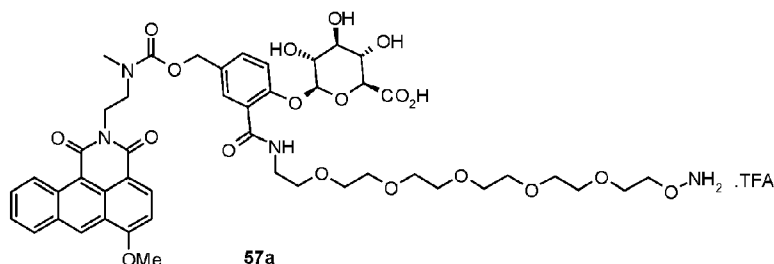
Se disolvieron el compuesto 56a (sal de HCl, 100 mg, 0,27 mmol), el compuesto 56a se preparó mediante un método dado a conocer en Curr. Med. Chem. 2009, 16, 1192-1213), el compuesto 14h (242 mg, 0,27 mmol) y HOBt anhidro (7,3 mg, 0,05 mmol) en DMF (3 ml) a 0 °C. Luego se añadieron piridina (0,4 ml) y DIPEA (0,09 ml, 0,60 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas bajo N₂, se diluyó la mezcla de reacción con disolución de NH₄Cl ac. saturada (10 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 20 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna para producir el compuesto 56b (184 mg, 63 %). EI-EM m/z: [M+H]⁺ 1091,9, [M+H-Boc]⁺ 991,7.

Preparación del compuesto 56c

A una disolución del compuesto 56b (90 mg, 0,08 mmol) en MeOH (2 ml) se le añadió LiOH monohidratado (17 mg, 0,41 mmol) en H₂O (2 ml) a -20 °C. Después de agitar durante 2 horas a -20 °C, se neutralizó la mezcla de reacción usando ácido acético y se concentró a presión reducida. Luego se disolvió la mezcla de reacción en H₂O/DMSO (1,5 ml/1,5 ml) y se purificó mediante HPLC, que produjo el compuesto 56c (35 mg, 45 %) como un sólido de color amarillo. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 951,7, [M+H-Boc]⁺ 851,5.

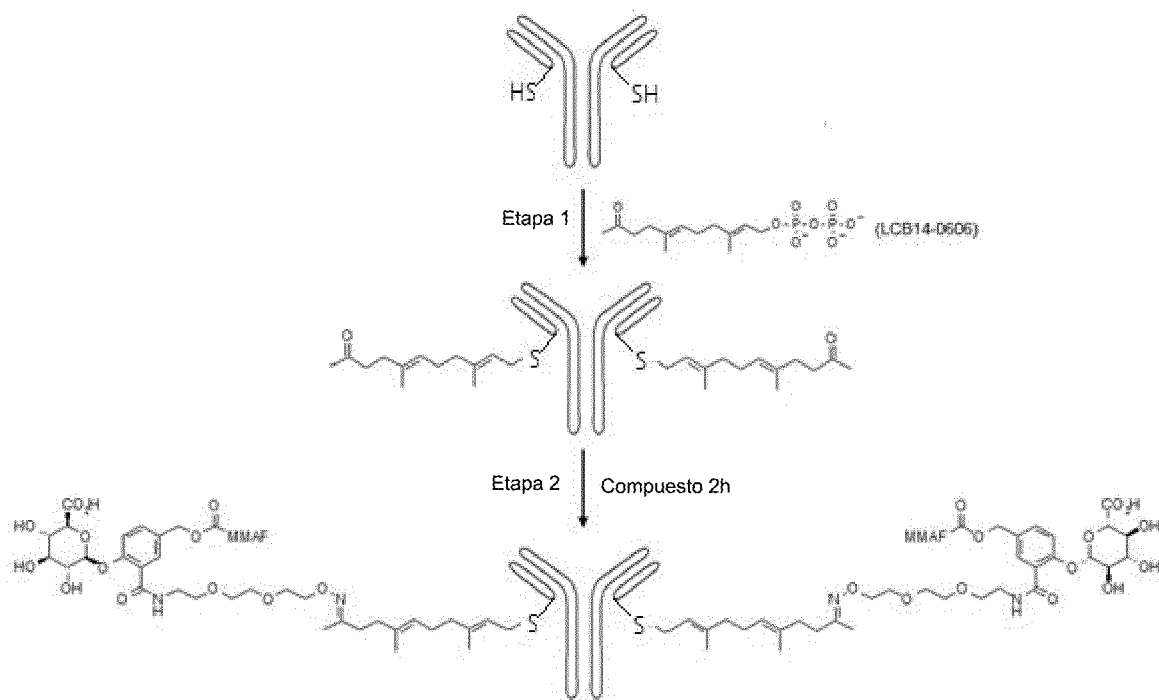
Preparación del compuesto 56d

Se añadió TFA (0,3 ml) a una disolución con agitación del compuesto 56c (35 mg, 0,04 mmol) en DCM (2,0 ml) a 0 °C. Después de agitar durante 1 hora, se eliminaron el disolvente y TFA en exceso mediante flujo de N₂. Luego se disolvió el residuo en H₂O/MeCN (1 ml/1 ml) y se purificó mediante HPLC. Se combinaron y se liofilizaron las fracciones puras con el mismo tiempo de retención para producir el compuesto 56d (24,9 mg, 68 %) como un sólido de color amarillo. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 851,6.

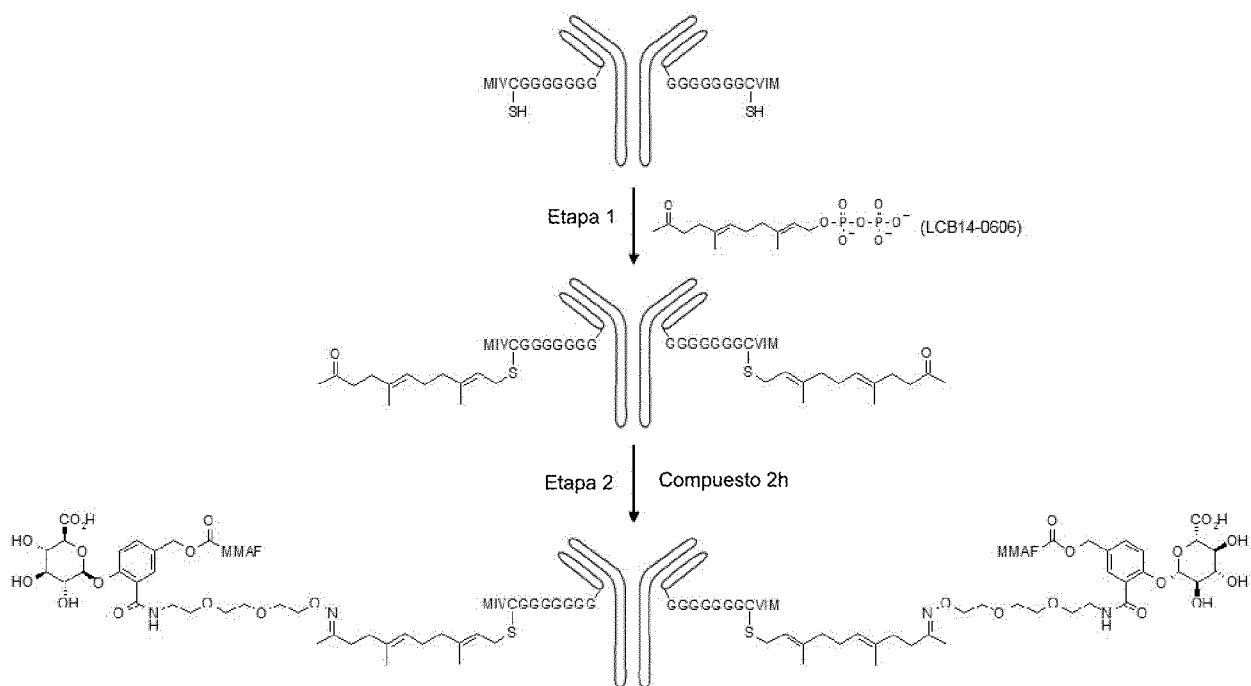
Ejemplo 77. Preparación del compuesto 57a

Se preparó el compuesto 57a a partir del compuesto 56a y compuesto 15a mediante un método similar de preparación del compuesto 56d en el ejemplo 76. EI-EM m/z: [M+H]⁺ 983,3.

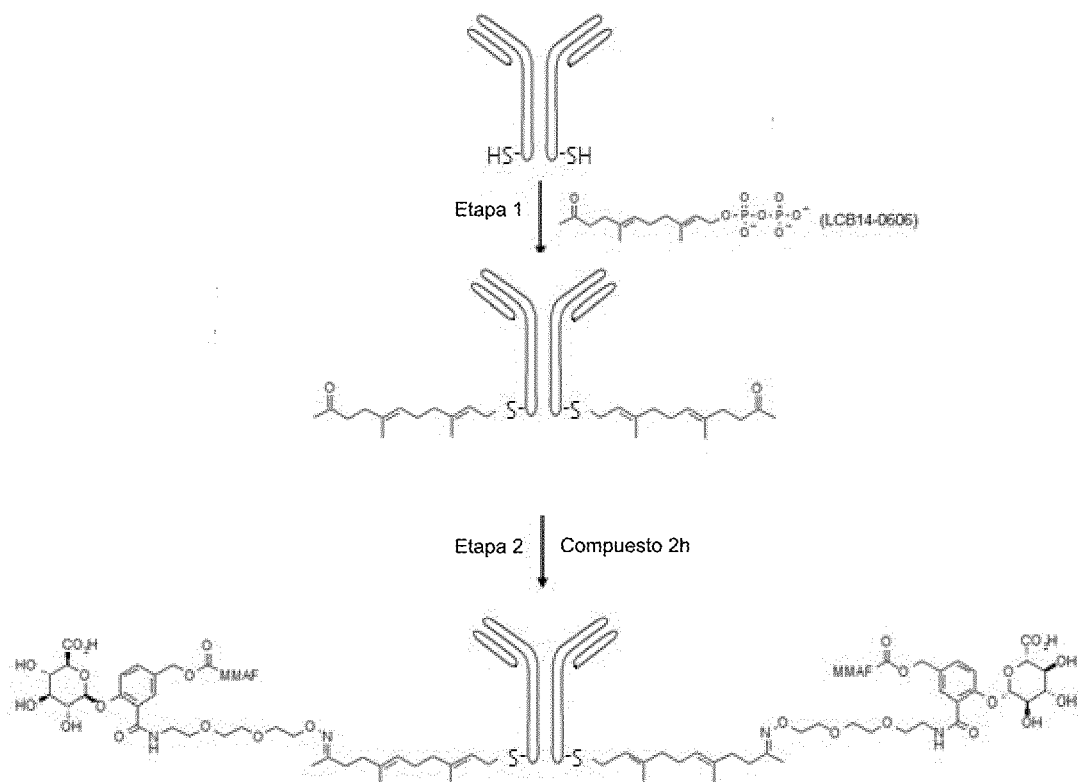
Ejemplo 78. Síntesis de ADC2



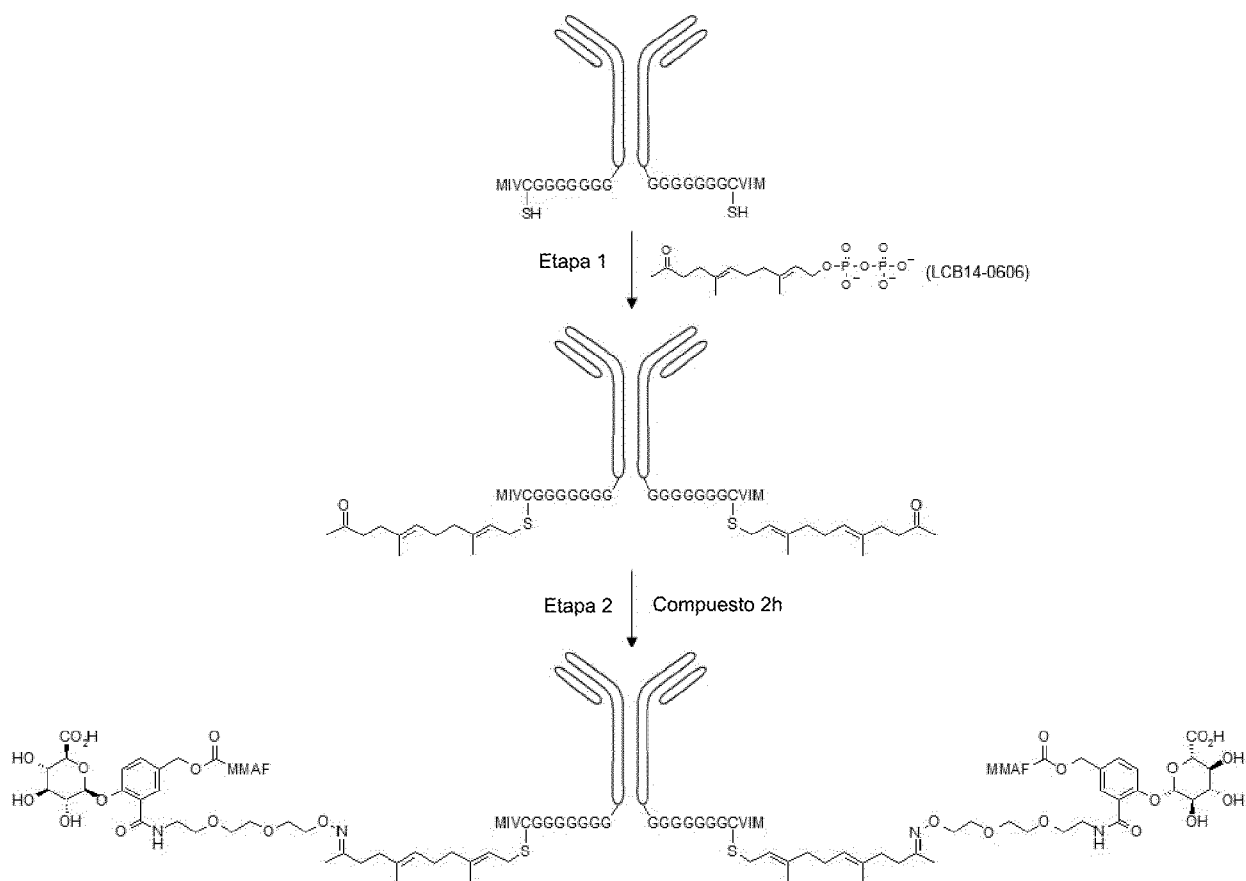
5 Ejemplo 79. Síntesis de ADC2



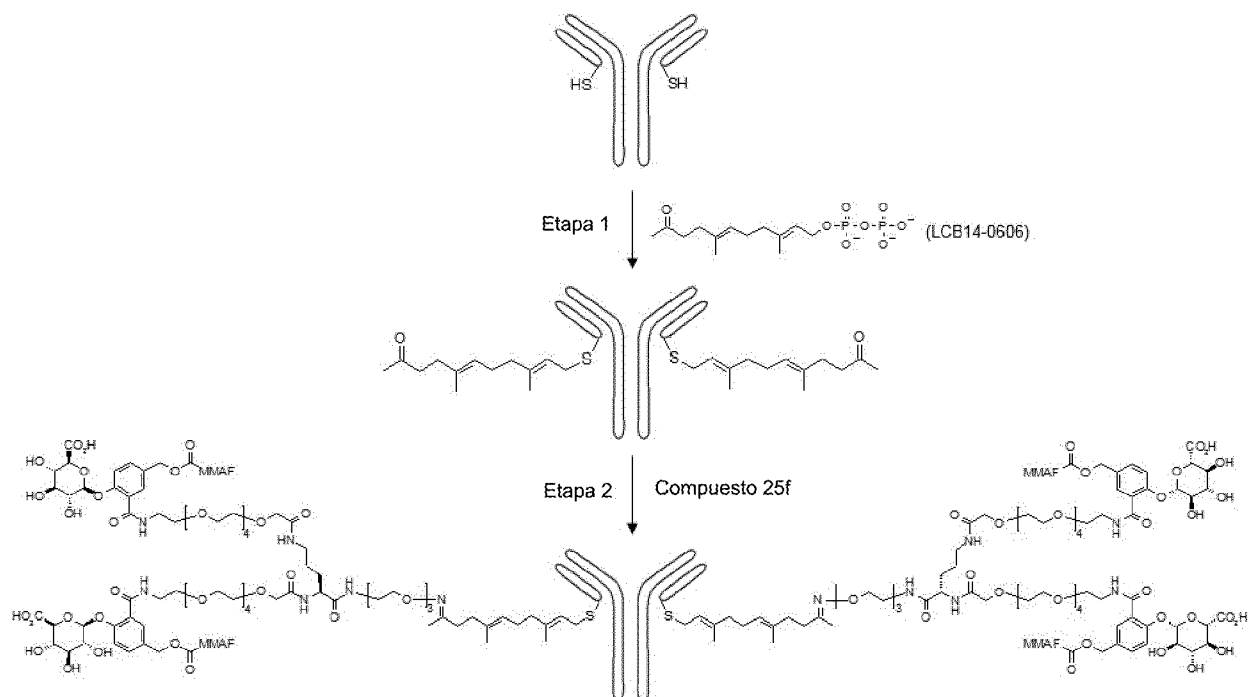
Ejemplo 80. Síntesis de ADC86



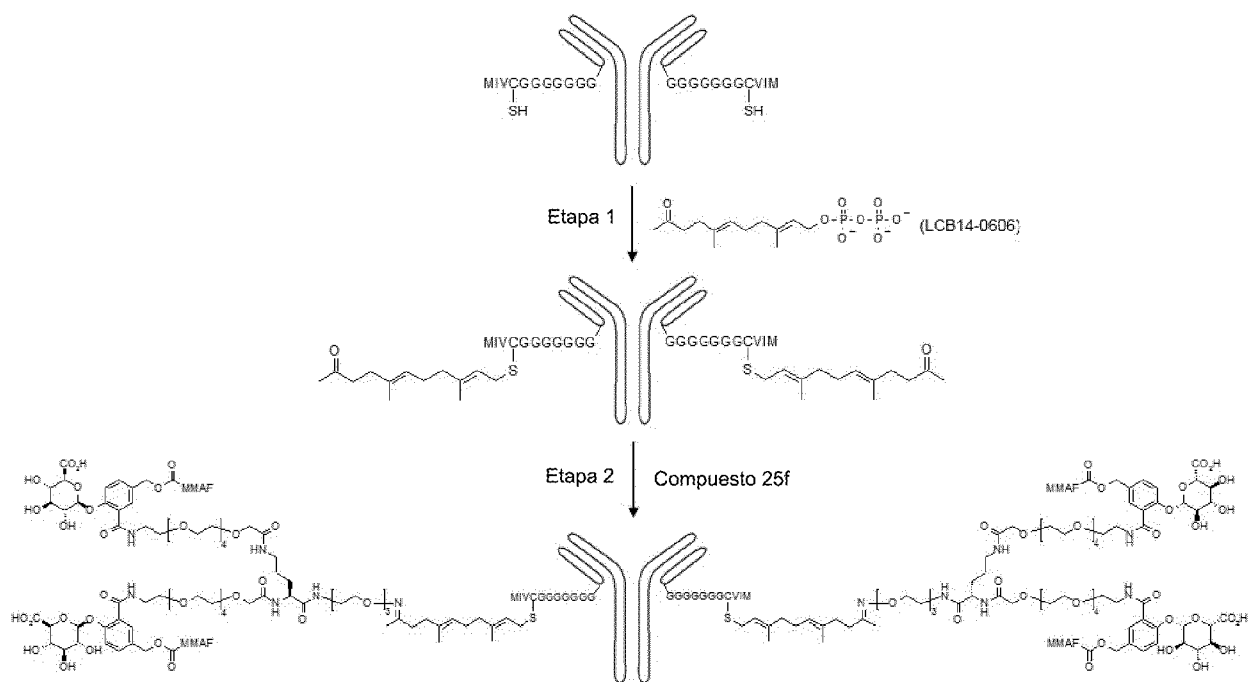
5 Ejemplo 81. Síntesis de ADC86



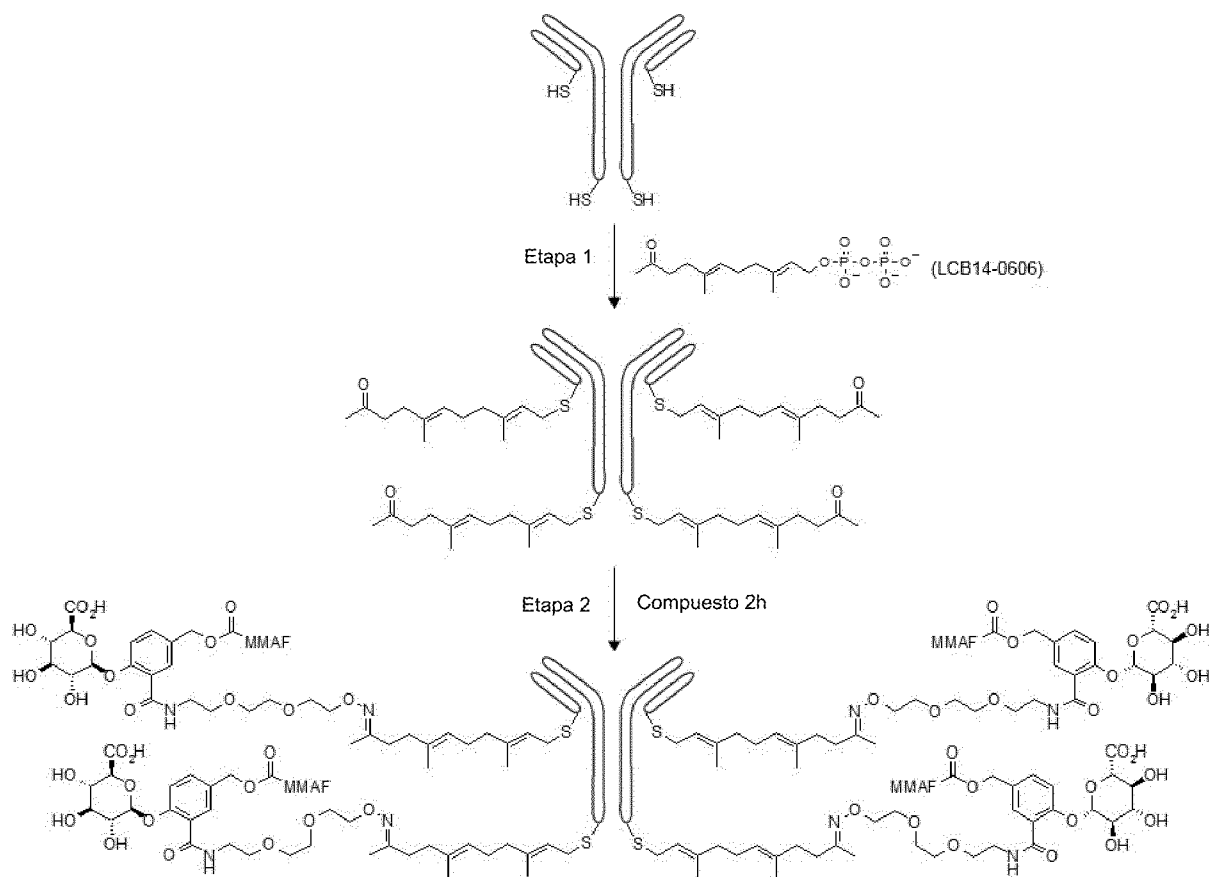
Ejemplo 82. Síntesis de ADC4



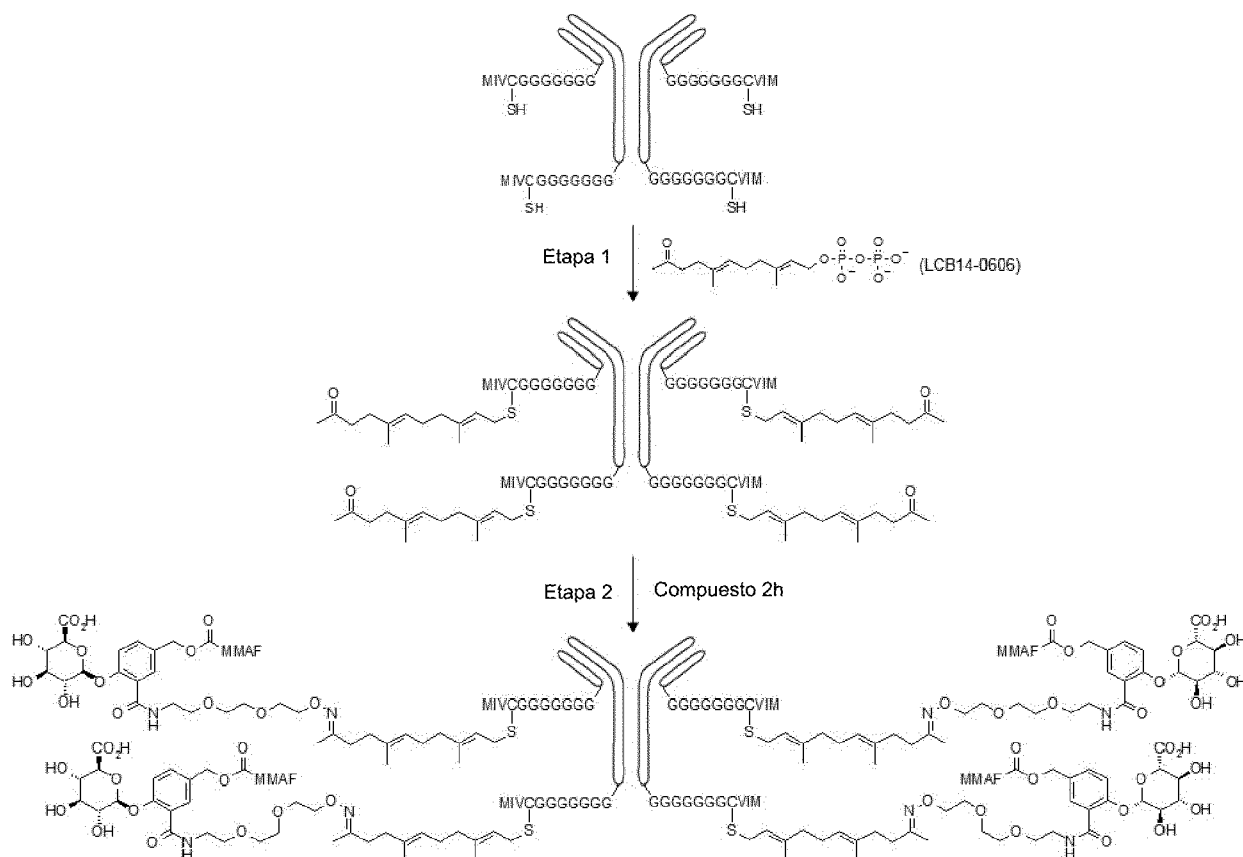
5 Ejemplo 83. Síntesis de ADC4



Ejemplo 84. Síntesis de ADC75



Ejemplo 85. Síntesis de ADC75

5 *Ejemplo experimental 1. Prueba de comparación de la capacidad de respuesta con respecto a la β -glucuronidasa.*

Para comparar la capacidad de respuesta del compuesto 45k del ejemplo 66 y del compuesto 50k del ejemplo comparativo 66 a la β -glucuronidasa entre sí, se realizó la prueba de comparación tal como sigue.

- 10 El compuesto 45k del ejemplo 66 y el compuesto 50k del ejemplo comparativo 66 se prepararon como disoluciones madre de DMSO 500 μ M y 50 μ M, respectivamente. Se prepararon disoluciones de reacción en las que se mezclaron 880 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y 100 μ l de disoluciones madre del compuesto 45k y del compuesto 50k, respectivamente (las concentraciones finales de los mismos fueron de 50 μ M y 5 μ M, respectivamente). Después de añadir 20 μ l de enzima β -glucuronidasa de *E. coli* (1 mg/ml, Sigma: E.C.3.2.1.31 tipo IX-A; 1 mg/ml en PBS; 3,6 μ g, 13 μ mol) a las disoluciones de reacción, se iniciaron las reacciones en un baño de agua a temperatura constante de 37 °C. Se dispensaron 100 μ l de las disoluciones mezcladas a los 0 min, 25 min, 60 min y 90 min, respectivamente, y se le añadieron 200 μ l de acetonitrilo. El MMAF liberado de cada uno de los sobrenadantes obtenidos realizando centrifugación (4 °C, 15 min, 14000 rpm) en las muestras de mezcla se analizó cuantitativamente usando CL-EM/EM (el experimento se realizó mediante un método similar a un método divulgado en la patente estadounidense n.º 8.568.728).

Los resultados de la prueba se ilustraron en la figura 2, y se confirmó a partir de la figura 2 que el MMAF se liberó significativamente rápido de cada compuesto 45k del ejemplo 66 y compuesto 50k del ejemplo comparativo 66 a través de una reacción de eliminación en 1,6 después de reacciones enzimáticas mediante β -glucuronidasa (patente estadounidense n.º 8.568.728).

Ejemplo experimental 2. Prueba de comparación de estabilidad plasmática, ligante-toxina

Se comparó la estabilidad plasmática del compuesto 45k del ejemplo 66 y del compuesto 50k del ejemplo comparativo 66.

Se disolvieron 10 μ l del compuesto 45k o 50k en DMSO a 5 mM, y cada composición se mezcló con 990 μ l de plasma de ratón, preparando así muestras de 50 μ M, para evaluar la estabilidad plasmática. Las disoluciones de plasma/compuesto se incubaron a 37 °C durante 7 días. Durante la incubación de 6 días, se tomaron alícuotas de 100 μ l a los 0, 1, 2 y 7 días y se mezclaron con 200 μ l de acetonitrilo que contenía un patrón interno para monitorizar

la precipitación de proteínas plasmáticas. Los sobrenadantes se obtuvieron centrifugando las muestras de acetonitrilo/plasma (4 °C, 15 min, 14000 rpm), y la cantidad de cada compuesto y producto se cuantificó realizando CL-EM/EM en los sobrenadantes. (El experimento se realizó usando métodos similares a los descritos en J. Chromatography B, 780:451-457 (2002)).

Los resultados obtenidos para el compuesto 45k del ejemplo 66 y el compuesto 50k del ejemplo comparativo 66 usando CL-EM/EM se ilustran en la figura 3 y en la tabla 1. La estabilidad del compuesto 50k del ejemplo comparativo 66 y la estabilidad del compuesto 45k del ejemplo 66 fue del 14 % y del 80 % a 1 día, respectivamente. Por tanto, la estabilidad del compuesto 45k del ejemplo 66 en plasma de ratón fue superior a la del compuesto 50k del ejemplo comparativo 66.

Tabla 1. Estabilidad del compuesto 45k y compuesto 50k en plasma de ratón

	Compuesto 45k del ejemplo 66	Compuesto 50k del ejemplo comparativo 66
Ligante	Glucurónido	Glucurónido
Estabilidad plasmática (ratón plasma)	80 % de estabilidad (a 7 días)	14 % de estabilidad (a 1 día)
Resultado	Estable	Instable

La estabilidad plasmática de los compuestos 47a, 48a y 49a se realizó mediante el método mencionado anteriormente (figura 4-6).

Ejemplo experimental 3. Preparación del conjugado anticuerpo-fármaco

Etapas 1. Método de anticuerpo prenilado (preparado según el método de la publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n.º 10-2014-0035393).

Se preparó una mezcla de reacción de prenilación de un anticuerpo y se hizo reaccionar a 30 °C durante 16 horas. Se usaron anticuerpos con la secuencia GGGGGGCVIM ("G7CVIM") añadida al extremo C-terminal de cada cadena ligera. La secuencia G7CVIM se añadió en el extremo C-terminal de la cadena pesada (ADC86-91) o tanto de la cadena pesada como de la ligera (ADC75-77). Las fuentes de las secuencias de los anticuerpos usados fueron las que figuran en la tabla 2.

Tabla 2. La lista de anticuerpos usados para preparación de ADC

Diana (anticuerpo)	Bibliografía
HER2 (Herceptin®)	http://www.drugbank.ca/drugs/DB00002
EGFR (Erbix®)	http://www.drugbank.ca/drugs/DB00002
CD19 (DI-B4)	Documento US8691952 B2
CD20 (Rituxan®)	http://www.drugbank.ca/drugs/DB00073
EGFR wt y EGFRvIII (ABT806)	Documento US 2014/02555410 A9

La mezcla de reacción se componía de una disolución tampón (Tris-HCl 50 mM (pH7,4), MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 10 µM, DTT 0,25 mM) que contenía anticuerpo 24 µM, FTasa 200 nM (Calbiochem #344145) y LCB 14-0606 144 µM (preparación propia según el método de la publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n.º 10-2014-0035393). Después de que se completara la reacción, se purificó un anticuerpo prenilado mediante FPLC.

Paso 2. Método de preparación de ADC

Se preparó una mezcla de reacción de formación de enlace oxima entre el anticuerpo prenilado y el ligante-toxina mezclando tampón Na-acetato 100 mM (pH 4,5, DMSO al 10 %), anticuerpo prenilado 12 µM y ligante-toxina 120 µM (de preparación propia) y se agitó suavemente a 30 °C. Después de incubar la reacción durante 24 horas, el conjugado anticuerpo-fármaco se purificó por desalación mediante FPLC y cromatografía de interacción hidrófoba-HPLC.

Tabla 3. Lista de ADC anti-HER2 (DAR2)

n.º de ADC	n.º de compuesto
ADC1	2g
ADC2	2h
ADC3	3f
ADC4	3g
ADC5	4f
ADC6	4g
ADC7	5e
ADC8	5f
ADC9	6e
ADC10	7e
ADC11	8f
ADC12	9j
ADC13	10c
ADC14	10d
ADC15	11j
ADC16	11k
ADC17	12c
ADC18	12d
ADC19	13e
ADC20	13f
ADC86	2h
ADC87	2g

Tabla 4. Lista de ADC anti-HER2 (DAR4)

n.º de ADC	n.º de compuesto
ADC23	16f
ADC24	16g
ADC25	17d
ADC26	18c
ADC27	19c
ADC28	20q
ADC29	21i
ADC30	22h
ADC31	23h
ADC32	24l
ADC33	25e
ADC34	25f
ADC35	26e
ADC36	27e
ADC37	28d
ADC38	28e
ADC39	29j
ADC40	29k
ADC41	30b
ADC42	30c
ADC43	31f
ADC44	31g
ADC45	32c
ADC46	32d
ADC47	33e
ADC48	33f
ADC49	34e
ADC50	34f
ADC51	35g
ADC52	36e
ADC53	37d
ADC54	38b
ADC55	38e
ADC76	2h
ADC88	16f
ADC89	16g
ADC90	25f
ADC91	25e

Tabla 5. Lista de ADC anti-HER2 (DAR4<)

	n.º de ADC	n.º de compuesto
<DAR6>	ADC60	43i
	ADC61	43j
<DAR8>	ADC62	44i
	ADC63	44j
	ADC77	16f

Tabla 6. Lista de ADC anti-HER2 usando amanitina como carga activa

DAR 2		DAR4	
n.º de ADC	n.º de compuesto	n.º de ADC	n.º de compuesto
ADC21	14m	ADC56	39e
ADC22	15b	ADC57	40c
		ADC58	41c
		ADC59	42d

Tabla 7. Lista de ADC usando anticuerpos que seleccionan como diana diversas proteínas

Diana (anticuerpo)	n.º de ADC	n.º de compuesto
EGFR (Erbix®)	ADC64	2h
	ADC65	25e
	ADC66	25f
CD19 (DI-B4)	ADC67	2h
	ADC68	25e
	ADC69	25f
CD20 (Rituxan®)	ADC70	2h
	ADC71	25e
	ADC72	25f
EGFR wt y EGFRvIII	ADC73	4g
(ABT806)	ADC74	25e
	ADC75	25f

10 Ejemplo experimental 4. Citotoxicidad de los ADC anti-HER2

Se usaron las líneas celulares comerciales de cáncer de mama humano MCF-7 (negativo a normal a HER2), OE-19 (positivo a HER2), NCI-N87 (positivo a HER2), SK-OV-3 (positivo a HER2), JIMT-1 (positivo a HER2) y SK-BR-3 (positivo a HER2). Las líneas celulares se cultivaron según las especificaciones recomendadas proporcionadas con las líneas celulares disponibles comercialmente.

Se midieron las actividades antiproliferativas de los anticuerpos, fármacos y conjugados con respecto a las líneas celulares cancerosas. Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a 1×10^4 células por pocillo. Después de 24 horas de incubación, se añadieron los anticuerpos, fármacos y conjugados en diversas concentraciones. El número de células viables después de 72 horas se contó mediante el ensayo SRB. La absorbancia se midió a 540 nm usando SpectraMax 190 (Molecular Devices, EE. UU.).

Tabla 8. Valor de Cl_{50} de los diferentes ADC anti-HER2 (DAR2)

Carga activa	ADC	Ligante-toxina	SK-BR-3	JIMT-1	OE-19	NCI-N87	SK-OV-3	MCF-7
MMAF	ADC8	5f	0,10	0,34	-	-	-	>33,33
	ADC2	2h	0,14	0,16	0,42	0,75	1,19	>33,33
	ADC4	3g	0,10	0,32	-	0,97	1,21	>33,33
	ADC6	4g	0,03	0,38	-	-	-	>33,33
	ADC16	11k	0,06	0,26	-	-	-	>33,33
	ADC14	10d	0,09	0,31	-	-	-	>33,33
	ADC18	12d	0,10	0,34	-	-	-	>33,33
	ADC20	13f	0,08	0,29	-	-	-	>33,33
MMAE	ADC7	5e	0,10	13,44	-	-	-	>33,33
	ADC1	2g	0,47	275	-	0,69	241	>33,33
	ADC3	3f	0,29	1,63	-	1,04	1,34	>33,33
	ADC5	4f	0,15	0,97	-	0,40	1,04	>33,33
	ADC9	6e	0,10	>33,3	-	-	-	>33,33
	ADC15	11j	0,17	>33,3	-	-	-	>33,33
	ADC10	7e	0,12	0,64	-	-	-	>33,33
	ADC12	9j	0,20	2,01	-	-	-	>33,33
	ADC13	10c	0,19	1,09	-	-	-	>33,33
	ADC17	12c	0,03	0,11	-	-	-	>33,33
	ADC19	13e	0,13	0,38	-	-	-	>33,33

Tabla 9. Valor de Cl_{50} de los diferentes ADC de longitud PEG

5

Muestras de prueba					Cl_{50} (nM)	
Toxina	DAR	ADC	n.º de unidad de PEG	Ligante-toxina	JIMT-1	MCF-7
MMAE	2	ADC7	1	5e	>10,0	>10,0
		ADC1	3	2g	>10,0	>10,0
		ADC3	6	3f	>10,0	>10,0
		ADC5	12	4f	1,01	>10,0

Tabla 10. Valor de Cl_{50} de ADC MMAF con los diferentes tipos de ligantees

ADC	Ligante-toxina	SK-BR-3	JIMT-1	NCI-N87	SK-OV-3	MCF-7
ADC23	16f	0,05	0,12	0,35	0,44	>33,33
ADC34	25f	0,03	0,10	-	-	>33,33
ADC38	28e	0,03	0,05	-	-	>33,33
ADC40	29k	0,02	0,06	-	-	>33,33
ADC42	30c	0,03	0,04	-	-	>33,33
ADC44	31g	0,03	0,05	-	-	>33,33
ADC46	32d	0,04	0,08	-	-	>33,33
ADC48	33f	0,03	0,08	-	-	>33,33
ADC50	34f	0,03	0,05	-	-	>33,33
ADC53	37d	0,03	0,05	-	-	>33,33
ADC54	38b	0,05	0,12	-	-	>33,33

Tabla 11. Valor de Cl_{50} de ADC de MMAE con los diferentes tipos de ligantees

ADC	Ligante-toxina	SK-BR-3	JIMT-1	NCI-N87	SK-OV-3	MCF-7
ADC24	16g	0,14	0,26	0,17	0,37	>33,33
ADC25	17d	0,03	0,10	0,36	0,37	>33,33
ADC26	18c	0,08	0,14	-	-	>33,33
ADC27	19c	0,05	0,43	0,29	0,38	>33,33
ADC28	20q	0,03	0,12	0,36	0,36	>33,33
ADC29	21i	0,03	0,41	0,31	0,49	>33,33
ADC30	22h	0,05	0,41	0,30	0,35	>33,33
ADC31	23h	0,14	0,24	-	-	>33,33
ADC32	24l	0,03	0,40	0,32	0,35	>33,33
ADC33	25e	0,04	0,23	0,27	0,33	>33,33
ADC35	26e	0,13	0,19	-	-	>33,33
ADC36	27e	0,13	0,22	-	-	>33,33
ADC37	28d	0,04	0,07	-	-	>33,33
ADC39	29j	0,03	0,11	-	-	>33,33
ADC41	30b	0,03	0,10	-	-	>33,33
ADC43	31f	0,03	0,04	-	-	>33,33
ADC45	32c	0,03	0,08	-	-	>33,33
ADC47	33e	0,04	0,07	-	-	>33,33
ADC49	34e	0,03	0,05	-	-	>33,33
ADC51	35g	0,04	0,24	0,34	-	>33,33
ADC52	36e	0,07	0,40	0,37	-	>33,33
ADC55	38e	0,04	0,07	-	-	>33,33

Tabla 12. Valor de Cl_{50} de los ADC híbridos

Muestras de prueba				Cl_{50} (nM)				
Toxina	DAR	ADC	Ligante-toxina	SK-BR-3	JIMT-1	NCI-N87	SK-OV-3	MCF-7
MMAF	2	ADC2	2h	0,08	0,40	0,84	0,84	>33,33
	4	ADC23	16f	0,05	0,10	0,25	0,36	>33,33
Amanitina	2	ADC21	14m	0,09	>33,3	0,88	0,25	>33,33
MMAF y amanitina	4	ADC58	41c	0,06	0,73	0,95	0,64	>33,33
	8	ADC78	41c	0,03	0,03	0,33	0,76	>33,33
MMAF-OMe				0,12	0,07	0,49	0,78	0,60

La comparación de dos ADC conjugados con toxinas diferentes y ADC conjugados con la misma toxina

Tabla 13. Valor de Cl_{50} de los diversos ADC de DAR

Muestras de prueba			Cl_{50} (nM)	
			JIMT-1	MCF-7
n.º de DAR	Código de ADC	Ligante-toxina		
DAR2	ADC2	2h	1,37	>33,33
DAR4	ADC23	16f	0,21	>33,33
	ADC34	25f	0,09	>33,33
	ADC76	2h	0,27	>33,33
DAR8	ADC62	44i	0,08	>33,33
	ADC77	16f	0,02	>33,33

Ejemplo experimental 5. Citotoxicidad de Erbitux (LC)-glucurónido ligante-MMAF

Las células A431, que expresan altos niveles de EGFR, y las células MCF-7, que expresan bajos niveles de EGFR, se sembraron a aproximadamente 1.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos en 100 μ l de medio. Las células HCC-827, que expresan un nivel intermedio de EGFR, se sembraron a aproximadamente 5000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos en 100 μ l de medio. Las células se incubaron a 37 °C en el 5 % de CO_2 durante 24 horas. Luego, se añadieron a las células diluciones en serie de monometil auristatina F-OMe (MMAF-OMe), Erbitux (LC)-G7CVIM y el conjugado anticuerpo-fármaco ADC64 que comprende Erbitux (LC)-G7CVIM y MMAF a concentraciones de 100 a 0,00128 nM. Las células se incubaron durante 72 horas y después se fijaron durante 1 hora a 4 °C después de añadir 100 μ l de ácido tricloroacético al 10 % helado a cada pocillo. Se contaron las células viables usando el colorante SRB (sulforodamina B, Sigma S1402) y un lector de placas SpectraMax 190 de Molecular Devices con Softmax Pro v5, monitorizando la absorbancia a 540 nm (tabla 14).

Erbitux (LC)-G7CVIM tuvo una Cl_{50} superior a 100 nM para cada línea celular (A431, MCF-7 y HCC-827). MMAF-OMe tuvo una Cl_{50} de 1,81 nM frente a células MCF-7, 1,99 nM frente a células HCC-827 y 1,11 nM frente a células A431. Los conjugados anticuerpo-fármaco ADC64, 65 y 66 presentaron una Cl_{50} superior a 100 nM frente a células MCF-7, 0,47, 0,17 y 0,11 nM frente a células HCC-827, respectivamente. El ADC64 mostró 1,3 nM frente a células A431, mostrando así una especificidad superior a la del MMAF-OMe y una potencia superior a la del Erbitux (LC)-G7CVIM.

Tabla 14. Valor de Cl_{50} de AcM anti-EGFR, ADC basados en Erbitux

Código de ADC	Líneas celulares		
	A431	HCC-827	MCF-7
ADC64	1,30	0,47	>33,33
ADC65	-	0,17	>33,33
ADC66	-	0,11	>33,33

Ejemplo experimental 6. Citotoxicidad de ABT-806 (LC)-glucurónido ligante-MMAF

La citotoxicidad de los ADC basados en ABT-806 se sometió a prueba frente a líneas celulares derivadas de pacientes establecidas en el Samsung Medical Center (Seúl, República de Corea). Las células se mantuvieron en medio Neurobasal®-A (Thermo Fisher Scientific) con suplemento de L-glutamina (200 nM), bFGF (20 ng/ml), EGF (20 ng/mL), suplemento N2 y suplemento B27. Para la prueba de viabilidad, las células se alicuotaron en una placa de 96 pocillos (5000 células/pocillo) y se incubaron a 37 °C en el 5 % de CO₂ durante 1 día antes del tratamiento. Después del tratamiento con ADC, las células se incubaron durante 72 h. Se añadieron 100 µl de reactivo CellTiter-Glo® (Promega) a cada pocillo para analizar la viabilidad celular. Después de 10 minutos de incubación, se analizó la señal luminiscente con el luminómetro.

Los ADC de DAR4 (ADC74, ADC75) tuvieron mejor potencia que los ADC de DAR2 (ADC73) como era de esperar. Algunas células de pacientes mostraron una sensibilidad un poco diferente a la carga útil. Las células 22 y 780 fueron más sensibles a MMAF que a MMAE, las células 464 viceversa.

Tabla 15. Actividad citotóxica de ADC basados en ABT-806 frente a líneas celulares derivadas de pacientes

Muestras de prueba		Líneas celulares derivadas de pacientes				
		vIII352T1	780	437	464	22
ABT806	ADC73	0,572	0,959	0,357	0,472	0,501
	ADC75	0,104	0,227	0,241	0,151	0,282
	ADC74	0,170	0,425	0,253	0,069	0,489

Ejemplo experimental 7. Citotoxicidad de ADC anti-CD19

Las células Ramos, que son células humanas de linfoma de Burkitt, se sembraron en una placa de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo en 100 µl de medio de crecimiento. Las células se incubaron a 37 °C con el 5 % de CO₂ durante 1 día. Se añadieron a los pocillos diluciones en serie de anticuerpos anti-CD19 DI-B4-(LC)-G7CVIM y ADC de 33,33 nM a 5,1 pM en 100 µl de medio, y las células se incubaron con el anticuerpo y los ADC durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó usando WST-1 (TaKaRa MK400) y un lector de placas SpectraMax 190 de Molecular Devices con Softmax Pro v5, monitorizando la absorbancia a 450 nm (tabla 16).

Los experimentos en células Ramos se realizaron en paralelo con experimentos en células K562, células de leucemia mielógena humana que no expresan CD19, como control negativo para evaluar cualquier citotoxicidad inespecífica.

ADC68 y ADC69 mostraron una CI₅₀ de 0,09 nM frente a células Ramos, superior al DI-B4 no conjugado (tabla 16). Ningún anticuerpo mostró citotoxicidad por debajo de 33,33 nM frente a las células de control K562.

Tabla 16. Actividad citotóxica de ADC basados en anticuerpo anti-CD19

Código de ADC	Líneas celulares	
	Ramos	K562
ADC67	>33,33	>33,33
ADC68	0,09	>33,33
ADC69	0,09	>33,33

Ejemplo experimental 8. Citotoxicidad de ADC basados en Rituxan

Las células Ramos, que son células humanas de linfoma de Burkitt, se sembraron en una placa de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo en 100 µl de medio de crecimiento. Las células se incubaron a 37 °C con el 5 % de CO₂ durante 1 día. Se añadieron a los pocillos diluciones en serie de Rituxan (LC)-G7CVIM y ADC de 33,33 nM a 5,1 pM en 100 µl de medio, y las células se incubaron con el anticuerpo y los ADC durante 72 horas. La viabilidad celular se sometió a ensayo usando WST-1 (TaKaRa MK400) y un lector de placas SpectraMax 190 de Molecular Devices con Softmax Pro v5, monitorizando la absorbancia a 450 nm (tabla 17).

Los experimentos en células Ramos se realizaron en paralelo con experimentos en células K562, células de leucemia mielógena humana que no expresan CD20, como control negativo para evaluar cualquier citotoxicidad inespecífica.

ADC70, ADC71 y ADC72 mostraron una CI_{50} de 4,56 nM, 1,47 nM y 1,78 nM frente a células Ramos respectivamente, superior al anticuerpo anti-CD20 no conjugado (tabla 17). Ningún anticuerpo mostró citotoxicidad por debajo de 33,33 nM frente a las células de control K562.

5 Tabla 17. Actividad citotóxica de ADC basados en Rituxan

Código de ADC	Líneas celulares	
	Ramos	K562
ADC70	4,56	>33,33
ADC71	1,47	>33,33
ADC72	1,78	>33,33

Ejemplo experimental 9. Diferencias en la susceptibilidad a la beta glucuronidasa

10 Los ADC en tampón de Na-acetato 0,06 M (pH5,2) se alicuotaron en el microtubo de 1,5 ml. La concentración final de ADC en la mezcla se ajustó a 12 μ M. Se añadieron 0,001 μ g de β -glucuronidasa humana (R&D systems: 6144-GH-020) a cada tubo. Luego, las mezclas se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 3 horas. La reacción se
 15 terminó añadiendo tampón PBS frío (pH7,4) a la dilución 15 veces mayor. El cambio del patrón de ADC por la beta-glucuronidasa se analizó mediante HIC-HPLC. La eficacia de la actividad enzimática se visualizó mediante el % restante (figura 10).

El atributo de la susceptibilidad parecía ser la unidad de ramificación (BR) de la parte ligante-toxina. Cuando se localizó Lys en BR, la liberación de toxina se produjo de manera muy eficiente. La amida y la amina mostraron
 20 menos susceptibilidad que la Lys.

Ejemplo experimental 10. Estabilidad plasmática de ADC

Para comparar la estabilidad plasmática entre ADC2 (Herceptin- LBG-MMAF, DAR2) y Kadcyla, estos ADC se incubaron en plasma de ratón y humano durante 5 segundos (0 h) o 96 horas (96 h), seguido de una prueba de
 25 citotoxicidad *in vitro* con células SK-BR3 durante 72 h. El ADC2 incubado en plasma conserva una potente citotoxicidad (sin cambios en la CI_{50} ; 0,06 (0 h) y 0,07 nM (96 h) para MP, 0,08 (0 h) y 0,08 nM (96 h) para HP) mientras que Kadcyla incubado en plasma mostró una citotoxicidad menor en comparación con Kadcyla 0 h (aumento en la CI_{50} ; 0,26 (0 h) y 1,59 nM (96 h) para MP, 0,29 (0 h) y 4,21 nM (96 h) para HP) (figura 11).

30 Para caracterizar la estabilidad plasmática de los ADC elaborados de diversos anticuerpos, los ADC se incubaron en plasma humano durante 5 segundos (0 h) o 168 horas (168 h), seguido de la prueba de citotoxicidad *in vitro* SRB usando células SK-BR3 durante 72h. (Tabla 18-20 y figura 12).

Tabla 18. Estabilidad plasmática de ADC basados en Herceptin (nM)

Muestras de prueba			Tiempo de incubación de plasma	
			0 h	168 h
MMAF-OMe			0,48	N.D.
Herceptin	MMAF	ADC2	0,09	0,15
		ADC6	0,07	0,09
		ADC8	0,11	0,18
		ADC14	0,06	0,08
		ADC16	0,05	0,07
		ADC23	0,04	0,05
		ADC34	0,03	0,04
		ADC40	0,03	0,05
		ADC46	0,03	0,03
		ADC48	0,03	0,04
		ADC62	0,02	0,02
	MMAE	ADC1	0,26	0,41
		ADC3	0,20	0,32
		ADC5	0,19	0,31
		ADC7	0,17	0,26
		ADC12	0,51	0,79
		ADC13	0,63	0,87
		ADC15	0,52	0,70
		ADC24	0,08	0,11
		ADC25	0,07	0,12
		ADC26	0,17	0,22
		ADC27	0,10	0,14
		ADC28	0,07	0,08
		ADC29	0,06	0,08
		ADC30	0,15	0,19
		ADC31	0,08	0,12
		ADC32	0,05	0,09
		ADC33	0,04	0,09
		ADC35	0,11	0,21
		ADC36	0,09	0,12
		ADC39	0,12	0,17
		ADC45	0,04	0,05
		ADC47	0,04	0,05
		ADC61	0,32	0,32

Tabla 19. Estabilidad plasmática de ADC basados en anticuerpo anti-CD19 (nM)

Muestras de prueba		Incubación de plasma	
		0 h	168 h
MMAF-OMe		0,160	N.D.
CD19	ADC68	0,036	0,048
	ADC69	0,047	0,135

Tabla 20. Estabilidad plasmática de ADC basados en anticuerpo anti-CD19 (nM)

Muestras de prueba		Incubación de plasma	
		0 h	168 h
MMAF-OMe		0,160	N.D.
CD20	ADC71	4,001	4,134
	ADC72	2,026	3,851

Ejemplo experimental 11. Farmacocinética de Herceptin® y ADC

Se administraron por vía intravenosa 3 mg/kg de anticuerpos o de conjugados anticuerpo-fármaco a ratas macho Sprague Dawley. Se tomaron muestras de sangre en múltiples momentos después de la dosificación, se enfriaron en agua helada y se aisló el plasma. El plasma se congeló a -80 °C hasta su posterior análisis mediante CL/EM/EM.

Se mezclaron 20 µl de cada muestra con 340 µl de PBS y 60 µl de microesferas magnéticas de proteína A y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las perlas se lavaron tres veces con PBS. Luego, se añadieron a las microesferas 25 µl de un patrón interno (péptidos marcados con isótopos a 10 µg/ml, 75 µl de RapiGest SF (Waters) y 10 µl de ditiotreitol. La mezcla se agitó durante 1 minuto y luego se incubó durante 1 hora a 60 °C. Se añadieron 25 µl de ácido yodoacético a la mezcla, se agitó durante 1 minuto y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 10 µl de tripsina modificada de grado de secuenciación (Promega), se agitó la mezcla durante 1 minuto y se incubó la mezcla durante la noche a 37 °C. Se añadieron a la mezcla 15 µl de ácido clorhídrico, se agitó la mezcla durante 1 minuto y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Se centrifugó la mezcla. La mezcla se centrifugó a 5000 × g durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un vial de HPLC.

El sistema de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas consistía en dos bombas Shimadzu LC-20AD, un controlador de bomba HPLC Shimadzu CBM-20A (Shimadzu Corporation, Columbia, MD, EE. UU.), un inyector automático CTC HTS PAL (CEAP Technologies, Carrboro, NC, EE. UU.) y un espectrómetro de masas de triple tiempo de vuelo 5600 (EM de triple TOF) (AB Sciex, Foster City, CA, EE. UU.). La columna analítica fue una columna Phenomenex Kinetex XB-C18 de 2,1 × 30 (2,6 µm). La HPLC se realizó con un gradiente de agua/acetronitrilo y se acidificó con ácido fórmico al 0,1 %. Los volúmenes de inyección fueron de 10 µl. Para completar el experimento de alta resolución se usó una EM de triple TOF, equipada con una fuente de iones Duospray™. La EM de triple TOF funcionó en el modo de iones positivos. Se usó gas nitrógeno de alta pureza para el nebulizador/Duospray™ y los gases de cortina. La temperatura de la fuente se fijó en 500 °C con un flujo de gas de cortina de 30 l/min. El voltaje de pulverización iónica se fijó en 5500 V, el potencial de desagrupamiento en 145 V y la energía de colisión en 38 V. Se usó el modo de ion producto como modo de exploración. Para el control del instrumento y la adquisición de datos se usó Analyst® TF version 1.6 (AB Sciex) con Windows® (Microsoft). Las integraciones de picos se realizaron con MultiQuant® versión 2.1.1 (AB Sciex). Se realizaron cálculos con MultiQuant® versión 2.1.1 para razones de áreas de pico, regresiones de curvas de calibración, valores de concentración de muestras y estadísticas descriptivas. La CL/EM/EM se calibró usando disoluciones patrón a concentraciones de 0,1, 0,4, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 y 100 µg/ml. En la figura 13 se muestra un perfil PK representativo. El perfil PK de ADC2 (Herceptin (LC)-MMAF, DAR2) fue muy similar al de Herceptin.

Ejemplo experimental 12. Efecto de la combinación de PEG (unidad de conexión) en el ligante ramificado-toxina

Para identificar los atributos críticos que afectan al perfil PK del ADC, se sometieron a prueba diferentes longitudes y estructuras de la unidad de conexión (número y disposición del PEG). El experimento para el análisis PK se realizó tal como se describió en el ejemplo experimental 9. Aunque el ADC23 (un ADC de DAR4) tuvo una eficacia más potente *in vitro* e *in vivo* que los ADC de DAR2, su perfil PK se redujo en semivida y AUC (figura 14). Al reemplazar el ligante-toxina de 16f a 25f (uniendo una unidad de conexión adicional (3 PEG) a la unidad de ramificación posterior (BR), el perfil PK se había recuperado tanto como el de Herceptin (figura 14). Estos efectos se reprodujeron bien en los ADC basados en MMAE, ADC24 y ADC33 (figura 15). Debido a que el MMAE es más

hidrófobo que el MMAF, los ADC basados en MMAE han empeorado en el perfil PK tal como muestran el ADC1 y el ADC24. Añadir una unidad de PEG más larga era la aplicación tradicional para extender la semivida y el AUC. Sin embargo, el simple alargamiento del número de unidades de PEG desde 3 hasta 12 no mostró grandes diferencias al comparar ADC1 con ADC5. Por otra parte, al reemplazar la unidad de enlace lineal (compuesto 2g o 4f) por una ramificada (compuesto 11j, ADC15), el perfil PK mejoró significativamente (figura 16), lo que indica que el atributo crítico para la PK podría no ser una simple longitud, sino la estructura de la unidad de conexión.

Ejemplo experimental 13. Efectos de la unidad de conexión hidrófila en la PK del ADC

Muchas cargas útiles usadas para ADC tienen carácter hidrófobo, lo que da lugar a una mala propiedad de PK. Para compensar la hidrofobia, se sometieron a prueba compuestos hidrófilos como parte de la unidad de conexión. La inserción de compuestos hidrófilos tales como Asp potenció el AUC y la semivida de los ADC (figuras 17, 18 y 19). En los casos de DAR2, el ADC con unidad de conexión que incluía Asp mostró un AUC mayor que Herceptin (figura 17, 18). El efecto compensador por aminoácido polar, tal como Asp o Glu, puede observarse en los ADC con DAR4 (figura 19, 20). ADC49 (2 Asp) y ADC52 (2 D-Glu) fueron superiores a ADC47 (1 Asp) y ADC51 (1D-Glu) respectivamente en AUC y semivida.

Ejemplo experimental 14. Eficacia in vivo

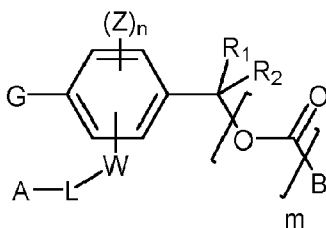
Se descongeló una reserva de células JIMT-1 congeladas y se cultivaron en condiciones de 37 °C, el 5 % de CO₂. Para la implantación se usaron células JIMT-1 en las mejores condiciones, con una viabilidad superior al 95 %. Se implantaron células de 5×10^6 suspendidas en 50 µl de solución salina fría en la pata trasera derecha de ratones balb/c desnudos. Se usaron 5 ratones por grupo para los experimentos. La formación y el crecimiento tumoral se controlaron periódicamente. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: volumen = (a²b)/2, "a" significa diámetro corto y "b" diámetro largo.

Cuando el volumen tumoral alcanzó aproximadamente 200 mm³, se seleccionaron los ratones que tenían un valor promedio y se agruparon según el volumen tumoral. Luego, se trató a los ratones con PBS (control de vehículo) o con los ADC indicados en las figuras 21 y 22. Se determinó el tamaño del tumor 2 veces por semana con un intervalo de 3-4 días durante el periodo experimental. Los volúmenes tumorales medidos desde el primer día de administración hasta la fecha final se representaron gráficamente para la curva de crecimiento tumoral.

Se sometieron a prueba ADC representativos mediante inyección única. En general, los ADC con unidad de ramificación (BR) que contenía Lys tuvieron mejor eficacia que los ADC con BR que contenía amida.

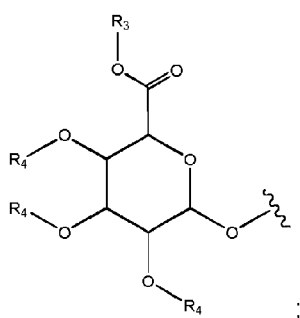
REIVINDICACIONES

1. Conjugado ligando-fármaco, que comprende un ligando, un ligante y un agente activo, que tiene la fórmula:



en la que:

G representa



A representa un anticuerpo;

B representa el agente activo;

W representa $-C(O)-$, $-C(O)NR'-$, $-C(O)O-$, $-S(O)_2NR'-$, $-P(O)R''NR'-$, $-S(O)NR'-$ o $-PO_2NR'-$, en cada caso donde el C(O), S o P se une directamente al anillo de fenilo y R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₈), alcoxilo (C₁-C₈), alquiltio (C₁-C₈), mono- o di-alquil (C₁-C₈)amino, heteroarilo (C₃-C₂₀) o arilo (C₆-C₂₀);

cada Z representa independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o un grupo aceptor de electrones (tal como una amida, ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, halógeno, ciano o nitro), alquilo (C₁-C₈), halógeno, ciano o nitro;

n es un número entero desde 1 hasta 3;

m es 0 ó 1;

L es un ligante que enlaza de manera covalente A a W, en el que el ligante comprende un péptido que comprende al menos un aminoácido hidrófilo;

R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o cicloalquilo (C₃-C₈);

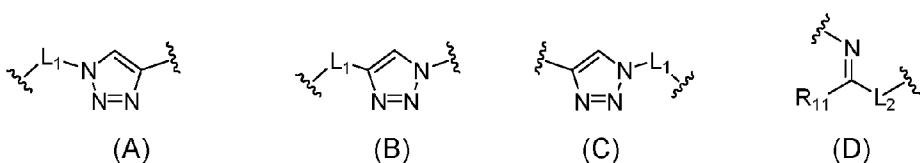
o R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de carbono al que se unen forman un anillo de cicloalquilo (C₃-C₈);

R₃ es hidrógeno o un grupo protector de carboxilo; y

cada R₄ es independientemente hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo.

2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, fragmento de anticuerpo, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena sencilla ("scFv"), diacuerpo, anticuerpo lineal, anticuerpo biespecífico, anticuerpo multiespecífico, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo humano o una proteína de fusión que comprende la porción de unión a antígeno de un anticuerpo.
3. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es muromonab-CD3, abciximab, rituximab, daclizumab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, etanercept, basiliximab, gemtuzumab, alemtuzumab,

- 5 ibrutumomab, adalimumab, alefacept, omalizumab, efalizumab, tositumomab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, eculizumab, rilonacept, certolizumab, romiplostim, AMG-531, golimumab, ustekinumab, ABT-874, belatacept, belimumab, atacicept, un anticuerpo anti-CD20, canakinumab, tocilizumab, atlizumab, mepolizumab, pertuzumab, HuMax CD20, tremelimumab, ticilimumab, ipilimumab, IDEC-114, inotuzumab, aflibercept, HuMax-CD4, teplizumab, orelizumab, catumaxomab, el anticuerpo anti-EpCAM IGN101, adecatumomab, oregovomab, dinutuximab, girentuximab, denosumab, bapineuzumab, motavizumab, efumgumab, raxibacumab, LY2469298 o veltuzumab.
- 10 4. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R_3 y R_4 son cada uno hidrógeno.
5. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que W es $-C(O)NR'$, donde C(O) se une al anillo de fenilo y NR' se une a L.
- 15 6. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligante comprende un alquileo que tiene de 1 a 100 átomos de carbono y o bien:
- 20 el alquileo incluye al menos un enlace insaturado;
- el alquileo incluye al menos un heteroarileno;
- un átomo de carbono del alquileo se reemplaza por uno o más heteroátomos seleccionados de nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre (S); o
- 25 el alquileo se sustituye además con uno o más alquilos que tienen de 1 a 20 átomos de carbono.
7. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende alanina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, glicina, lisina, ornitina, prolina, serina o treonina.
- 30 8. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido comprende aspartato o glutamato.
9. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- 35 el ligante se une de manera covalente al ligando mediante un enlace tioéter y el enlace tioéter comprende un átomo de azufre de una cisteína del ligando,
- el ligando comprende un resto de aminoácido que se reconoce mediante una isoprenoide transferasa; y
- 40 el enlace tioéter comprende un átomo de azufre de una cisteína del resto de aminoácido.
10. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligante comprende al menos una unidad de isoprenilo.
- 45 11. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligante comprende una unidad de conexión representada por $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_{q-}$, $-((CH_2)_pV)_{q-}$, $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_qY-$, $-((CH_2)_pV)_q(CH_2)_r-$, $-Y(((CH_2)_pV)_{q-})$ o $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_qYCH_2-$ en las que:
- 50 r es un número entero desde 0 hasta 10;
- p es un número entero desde 1 hasta 10;
- q es un número entero desde 1 hasta 20;
- 55 V e Y son cada uno independientemente un enlace sencillo, $-O-$, $-S-$, $-NR_{21}-$, $-C(O)NR_{22}-$, $-NR_{23}C(O)-$, $-NR_{24}SO_2-$ o $-SO_2NR_{25}-$; y
- R_{21} a R_{25} son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_6), alquil (C_1-C_6)arilo (C_6-C_{20}) o alquil (C_1-C_6)heteroarilo (C_3-C_{20}).
- 60 12. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligante comprende una unidad de enlace que se representa mediante una cualquiera de las fórmulas A, B, C o D:



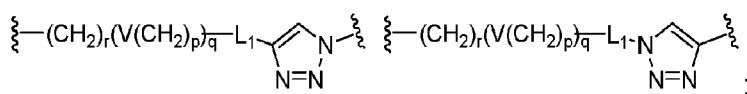
en las que:

5 L₁ es un enlace sencillo o alquileo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono;

R₁₁ es hidrógeno o alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono; y

L₂ es alquileo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono.

13. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligante comprende:



o en la que

V es un enlace sencillo, -O-, -S-, -NR₂₁-, -C(O)NR₂₂-, -NR₂₃C(O)-, -NR₂₄SO₂- o -SO₂NR₂₅-, preferiblemente -O-;

R₂₁ a R₂₅ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquil (C₁-C₆)arilo (C₆-C₂₀) o alquil (C₁-C₆)heteroarilo (C₃-C₂₀);

r es un número entero desde 1 hasta 10, preferiblemente 2 ó 3;

p es un número entero desde 0 hasta 10, preferiblemente 1 ó 2;

q es un número entero desde 1 hasta 20, preferiblemente de 1 a 6; y

L_1 es un enlace sencillo.

14. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo se selecciona de:

(a) erlotinib, borteomib, fulvestrant, sutent, letrozol, mesilato de imatinib, PTK787/ZK 222584, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, leucovorina, rapamicina, lapatinib, lonafarnib, sorafenib, gefitinib, AG1478, AG1571, tiotepa, ciclofosfamida, busulfano, improsulfano, pipsulfano, benzodopa, carbocuna, meturedopa, uredopa, etilenimina, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida, trimetilolomelamina, bullatacina, bullatacinona, camptotecina, topotecán, briostatina, callistatina, CC-1065, adozelesina, carzelesina, bizelesina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, KW-2189, CB1-TM1, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, predinimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, caliqueamicina gamma 1, caliqueamicina omega 1, dinemicina, dinemicina A, clodronato, esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina, aclacinomisinas, actinomicina, antimicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carbinomicina, carzinoquina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina liposomal, desoxidoxorrubicina, epirubicina, esorubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptomigrina, estreptozocina, tuberculidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, 5-fluorouracilo, denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tiguana, anticitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona, aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido folínico, aceglatona, glicósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestabucil, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuna, elfornitina, acetato de elliptinio, etoglucido, nitrato de galio, hidroxiurea, lentinano, lonidaina, maitansina, ansamitocinas, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraquina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, 2-etilhidrazida, procarbazona, polisacárido-K, razoxano, rizoxina, sizofirano, espirogermano, ácido tenuazónico, triazicuna, 2,2',2"-triclorotrietilamina, toxina T-2, verracurina A, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina,

- manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, gacitosina, arabinósido, ciclofosfamida, tiotepa, paclitaxel, formulación de nanopartículas de paclitaxel modificadas por ingeniería con albúmina, doxetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, carboplatino, vinblastina, platino, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, xeloda, ibandronato, CPT-11, inhibidor de topoisomerasa RFS 2000, difluorometilornitina, ácido retinoico, capecitabina o sales, solvatos o ácidos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores;
- (b) monocina, una linfocina, una hormona polipeptídica tradicional, hormona paratiroidea, tiroxina, relaxina, prorrelaxina, una hormona glicoproteica, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante del tiroides, hormona luteinizante, factor de crecimiento hepático, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , hormona antimülleriana, péptido asociado a gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular, trombopoyetina, eritropoyetina, un factor osteoinductivo, un interferón, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , un factor estimulante de colonias ("CSF"), macrófago-CSF, granulocito-macrófago-CSF, granulocito-CSF, una interleucina ("IL"), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, un factor de necrosis tumoral, TNF- α , TNF- β , un factor polipeptídico, LIF, ligando en kit o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- (c) toxina diftérica, toxina botulínica, toxina tetánica, toxina de disentería, toxina del cólera, amanitina, α -amanitina, un derivado de amanitina, pirrolobenzodiazepina, derivados de pirrolobenzodiazepina, tetrodotoxina, brevetoxina, ciguatoxina, ricina, toxina AM, auristatina (por ejemplo, auristatina E (MMAE) o auristatina F (MMAF)), tubulisina, geldanamicina, maitansinoides, daunomicina, vindesina, SG2285, dolastatina, un análogo de dolastatina, criptoficina, camptotecina, un derivado o metabolito de camptotecina (por ejemplo, SN-38), rizoxina, un derivado de rizoxina, CC-1065, un análogo o derivado de CC-1065, duocarmicina, un antibiótico de enedina, esperamicina, epotilona, azonafida, aplidina, un toxoide o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- (d) un ligando de afinidad, en el que el ligando de afinidad es un sustrato, un inhibidor, un agente estimulante, un neurotransmisor, un radioisótopo o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- (e) un marcador radioactivo, ^{32}P , ^{35}S , un colorante fluorescente, un reactivo denso en electrones, una enzima, biotina, estreptavidina, dioxigenina, un hapteno, una proteína inmunogénica, una molécula de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- (f) un compuesto inmunomodulador, un agente antineoplásico, un agente antiviral, un agente antibacteriano, un agente antifúngico y un agente antiparasitario o una combinación de cualquiera de los anteriores;
- (g) tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona o toremifeno;
- (h) 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, letrozol o anastrozol;
- (i) flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, goserelina o troxacitabina;
- (j) un inhibidor de aromatasa;
- (k) un inhibidor de proteína cinasa; y
- (l) un inhibidor de lípido cinasa.
15. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el agente activo se selecciona de un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una vacuna y un agente antiangiogénico.
16. Composición farmacéutica que comprende el conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para su uso en el tratamiento de cáncer.
18. Método para elaborar el conjugado ligando-fármaco según la reivindicación 1, que comprende hacer reaccionar una biomolécula con un profármaco, en el que:
- la biomolécula comprende un ligando y una cetona o aldehído;

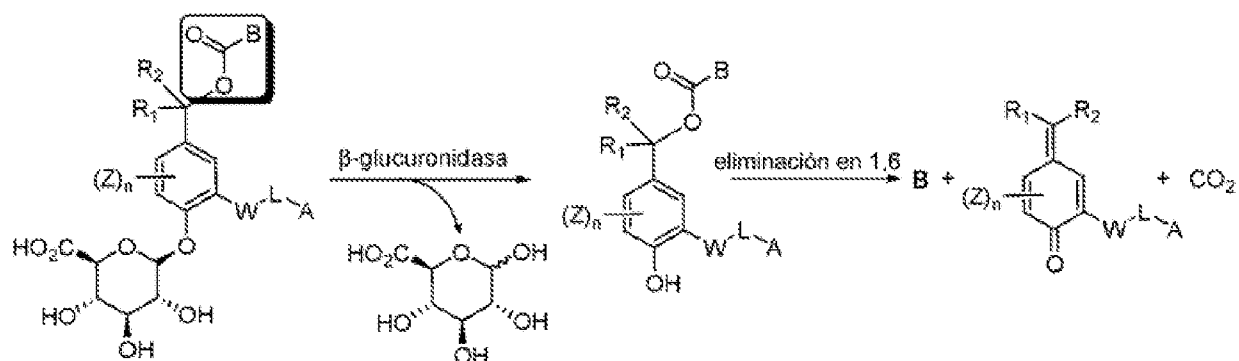
el profármaco comprende una alcoxiamina; y

la reacción produce una oxima, enlazando así de manera covalente el ligante al profármaco.

5

Figura 1

Cuando la parte  es carbamato,



Cuando la parte  es éster,

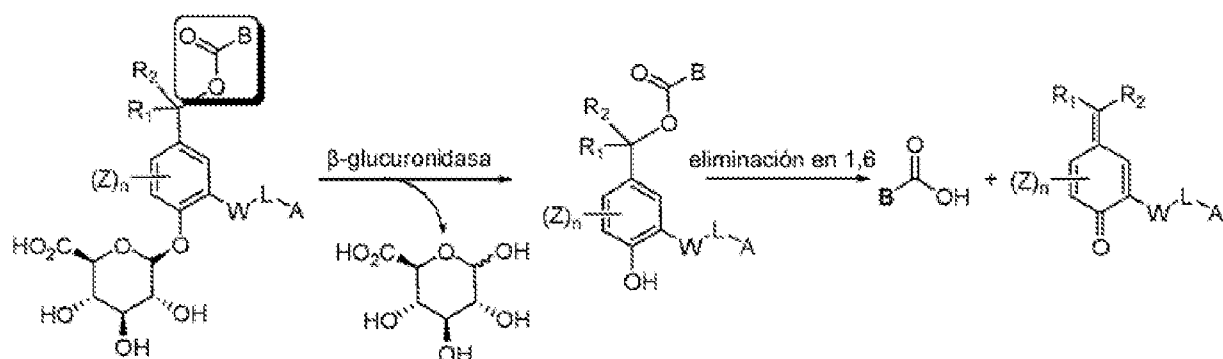


Figura 2

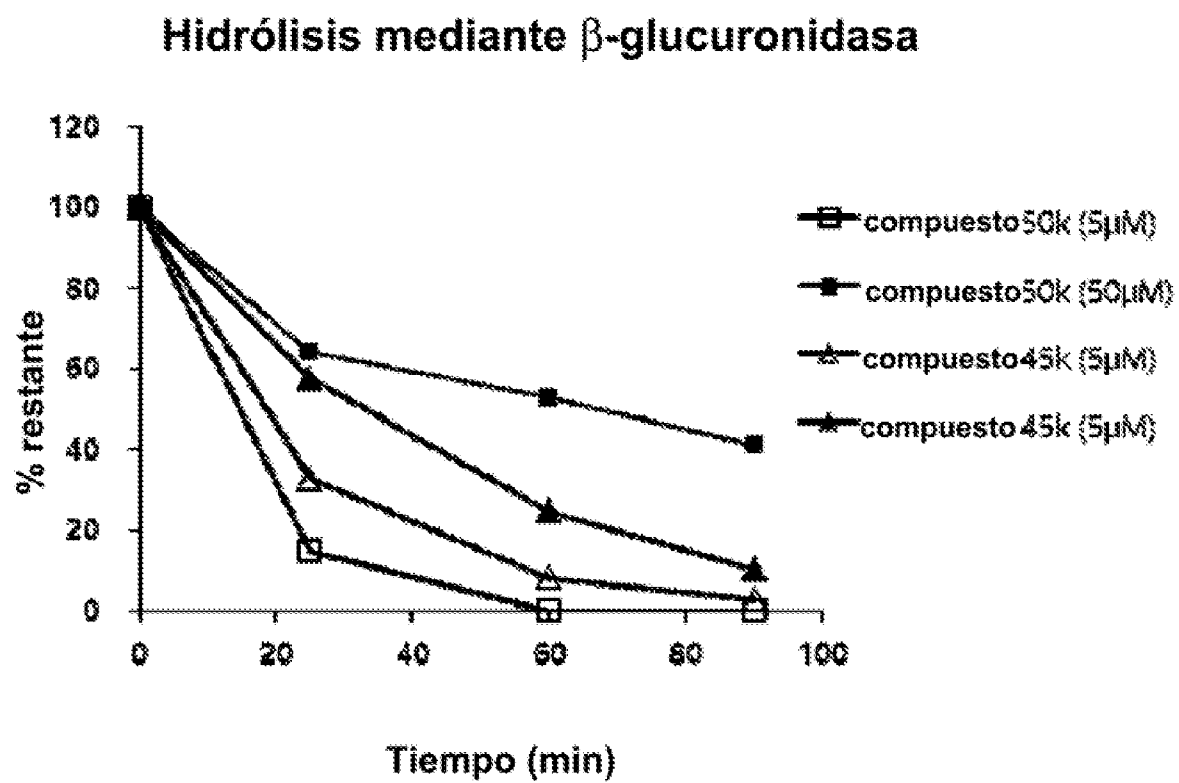


Figura 3

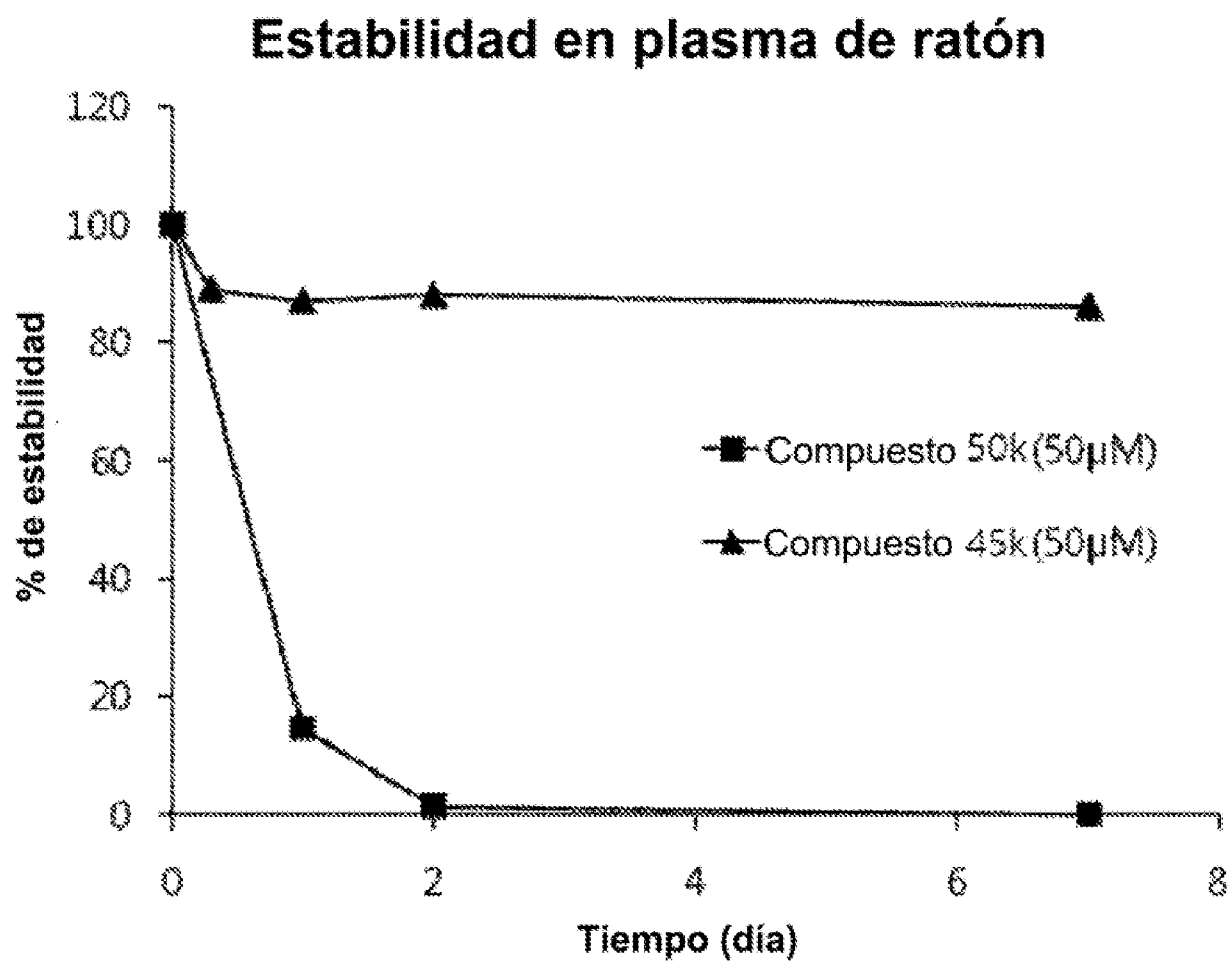


Figura 4

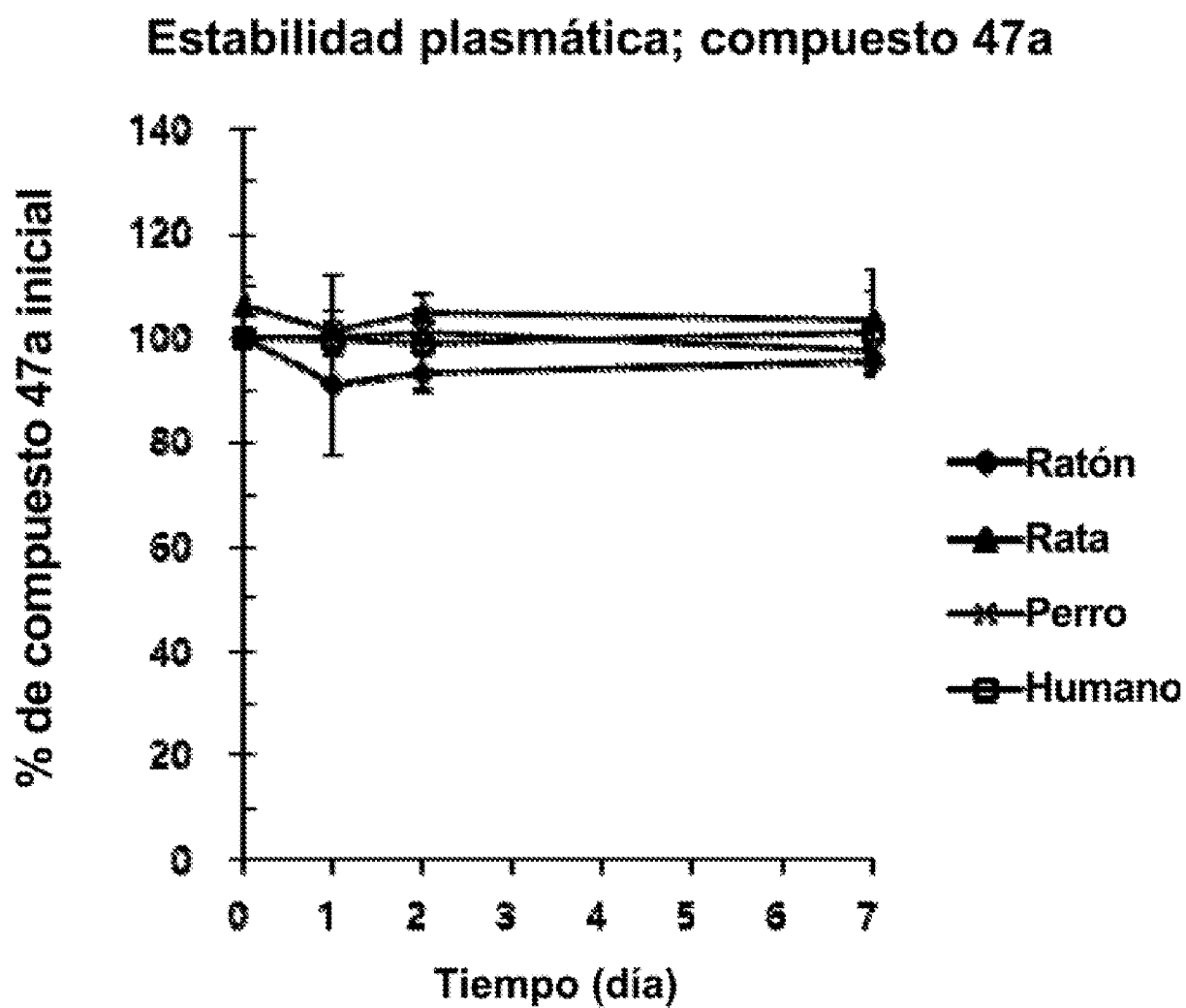


Figura 5

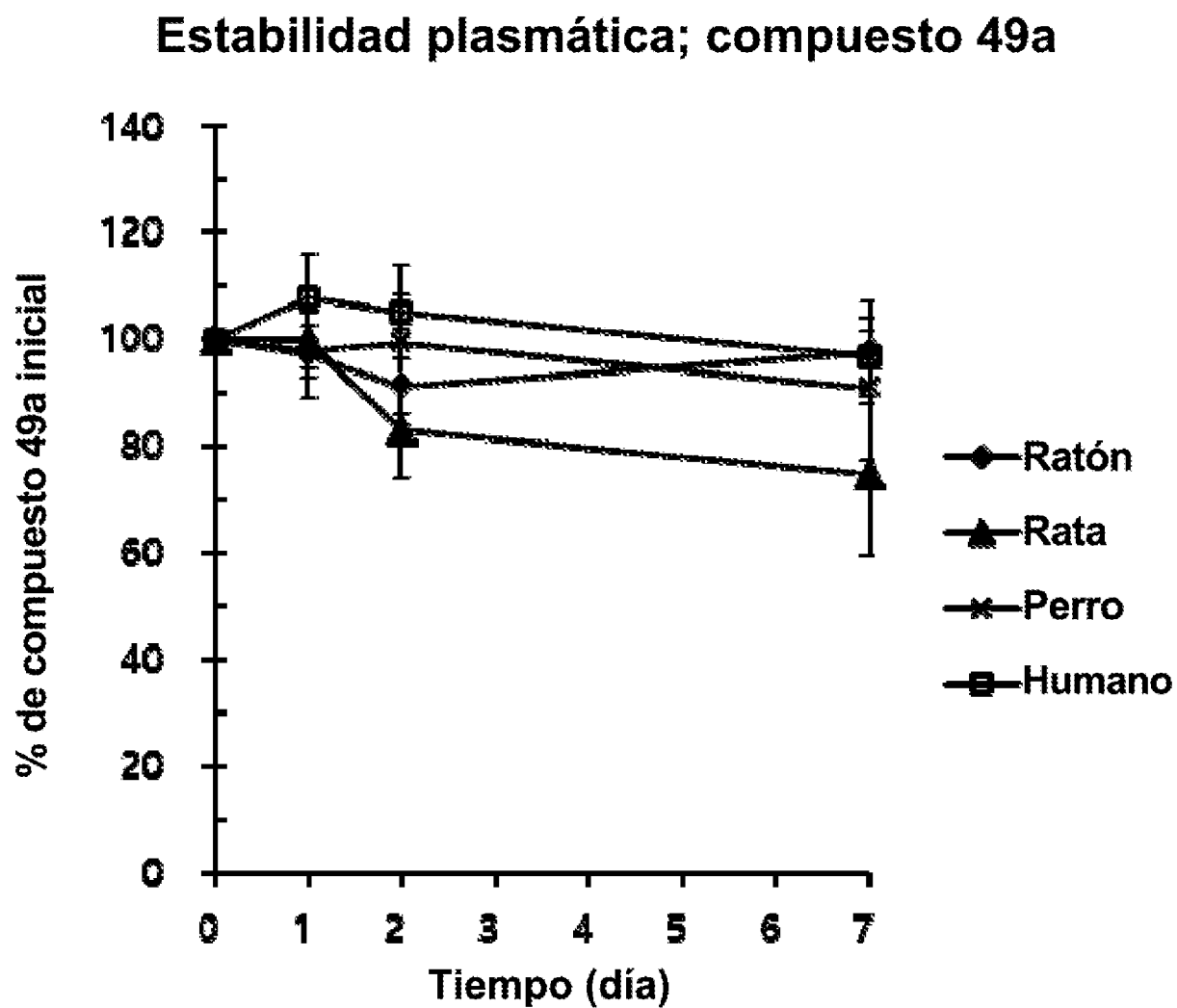


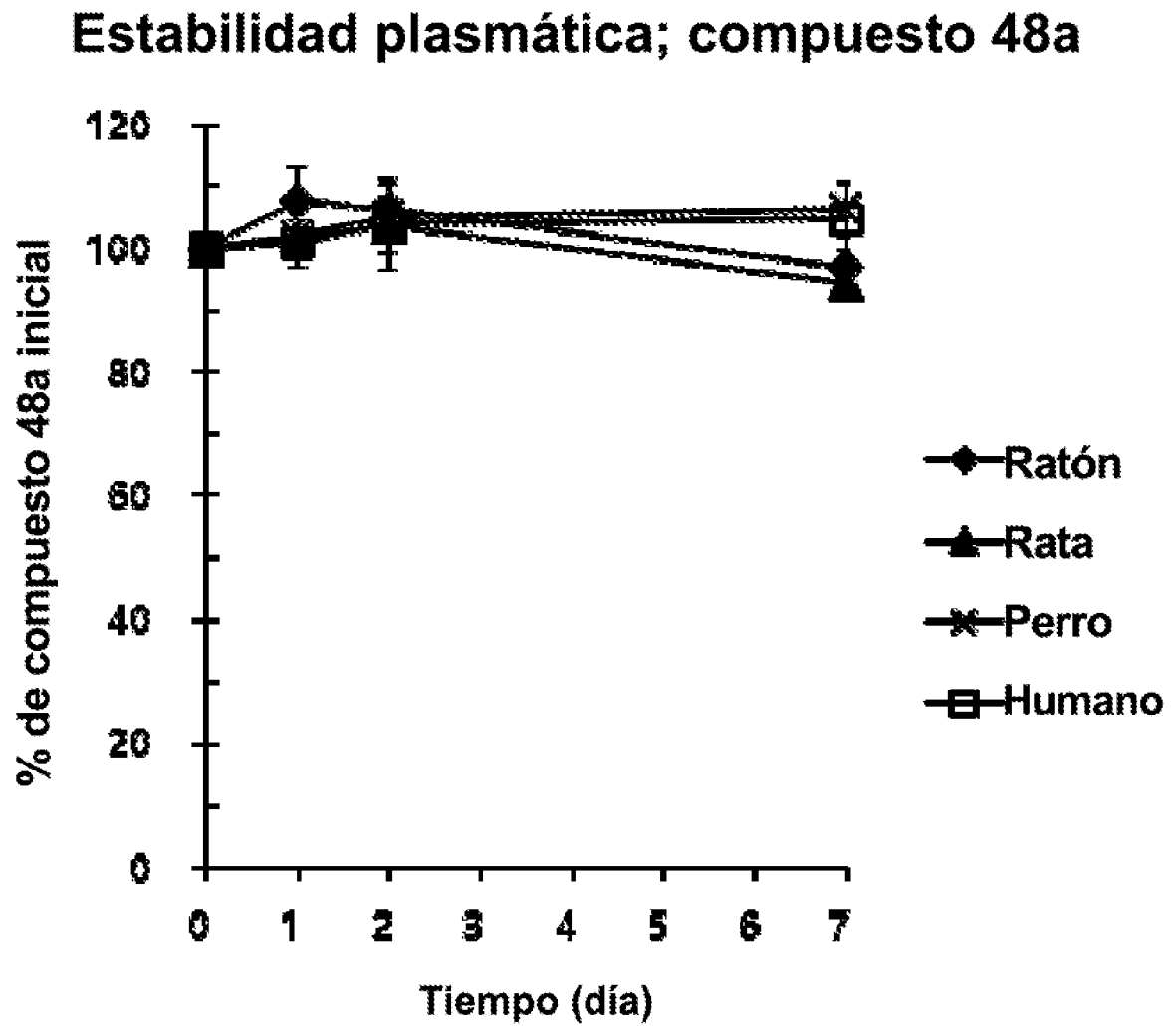
Figura 6

Figura 7A

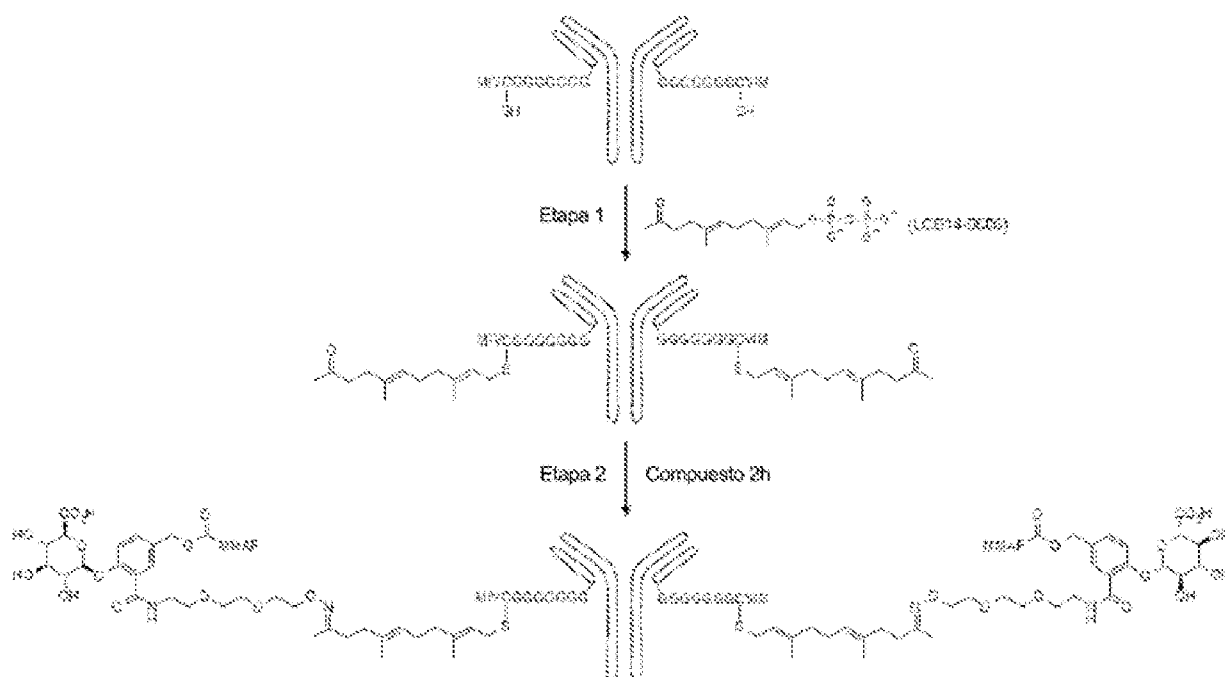


Figura 7B

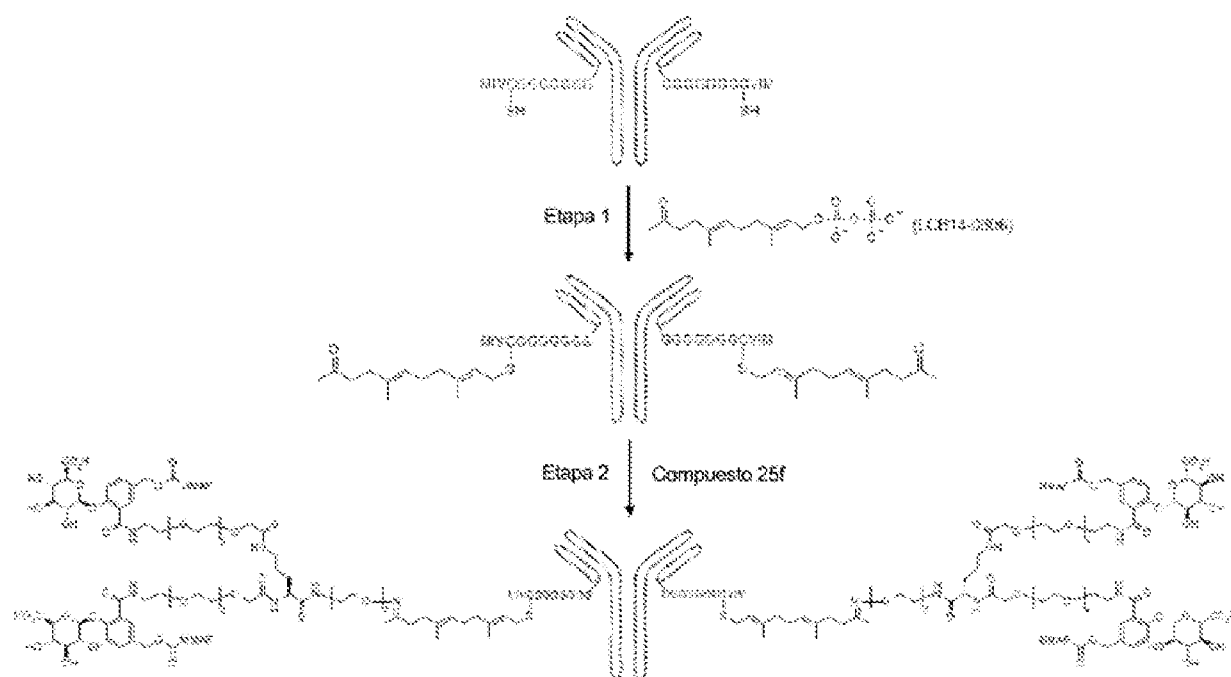


Figura 8

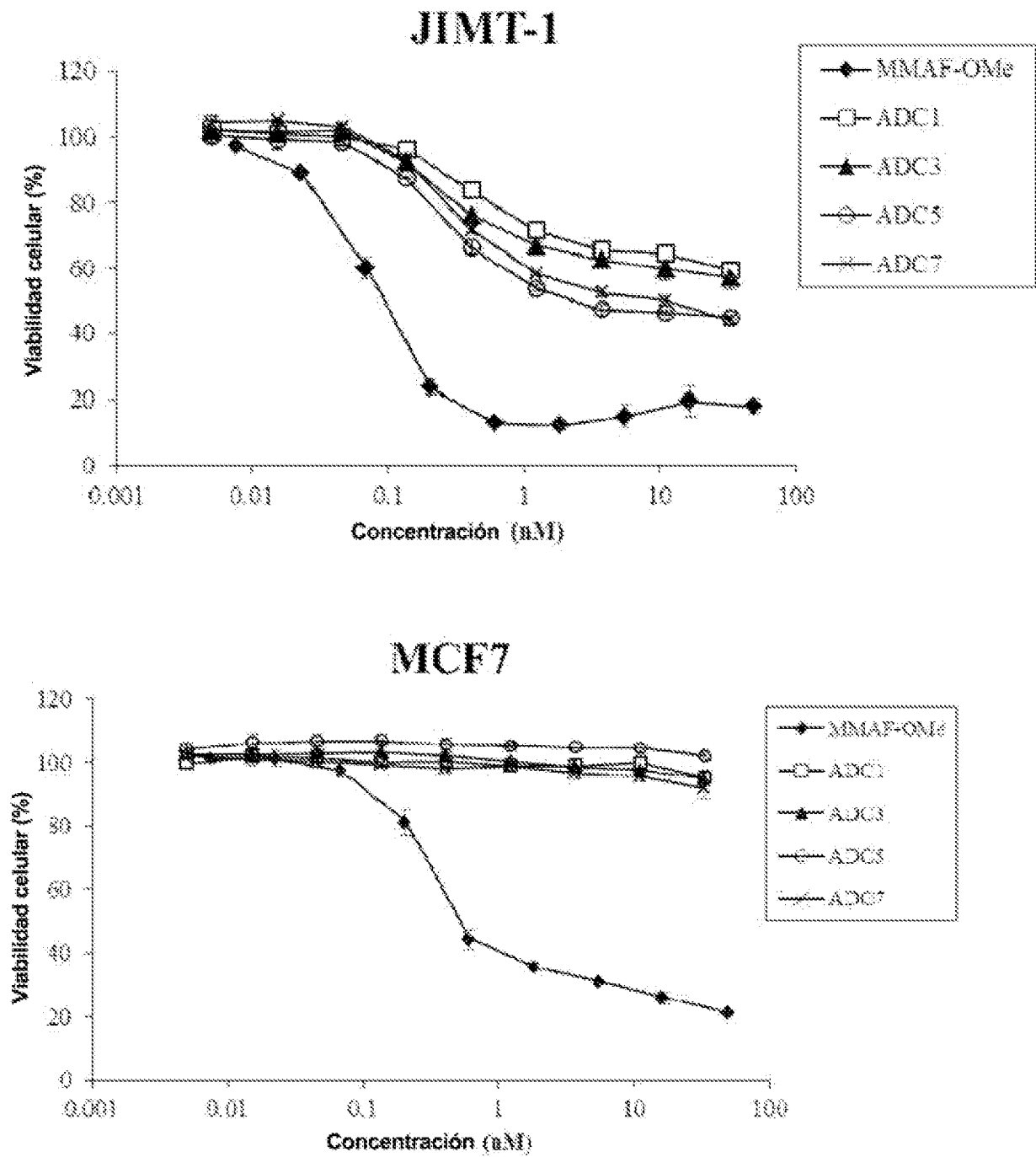


Figura 9

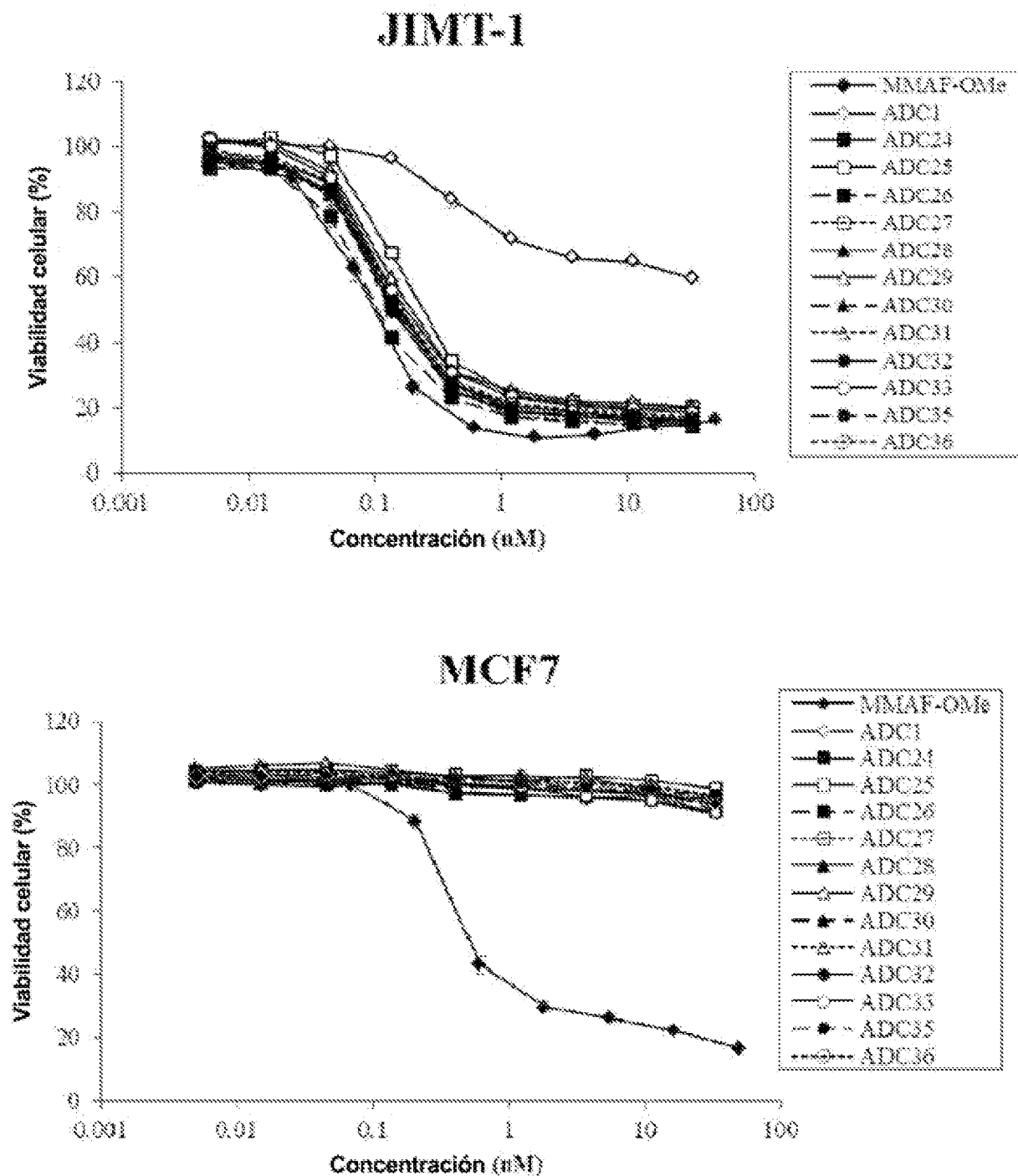


Figura 10

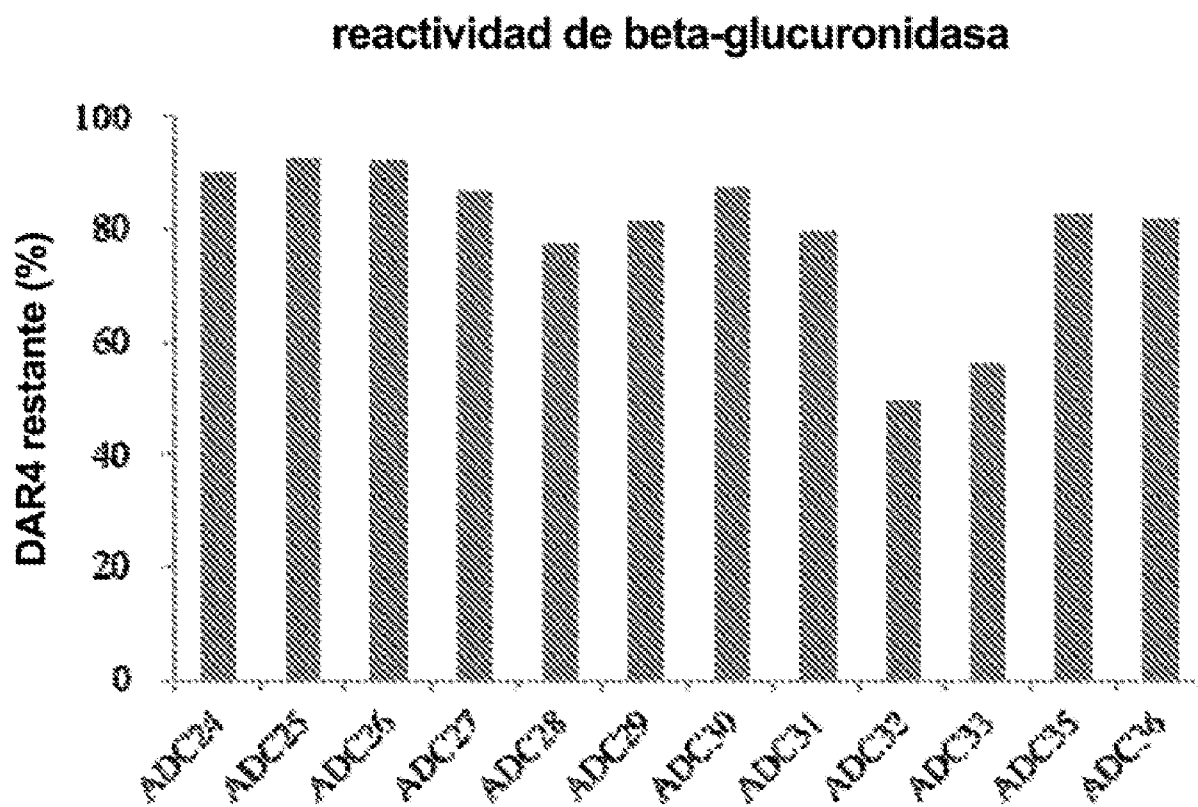


Figura 11

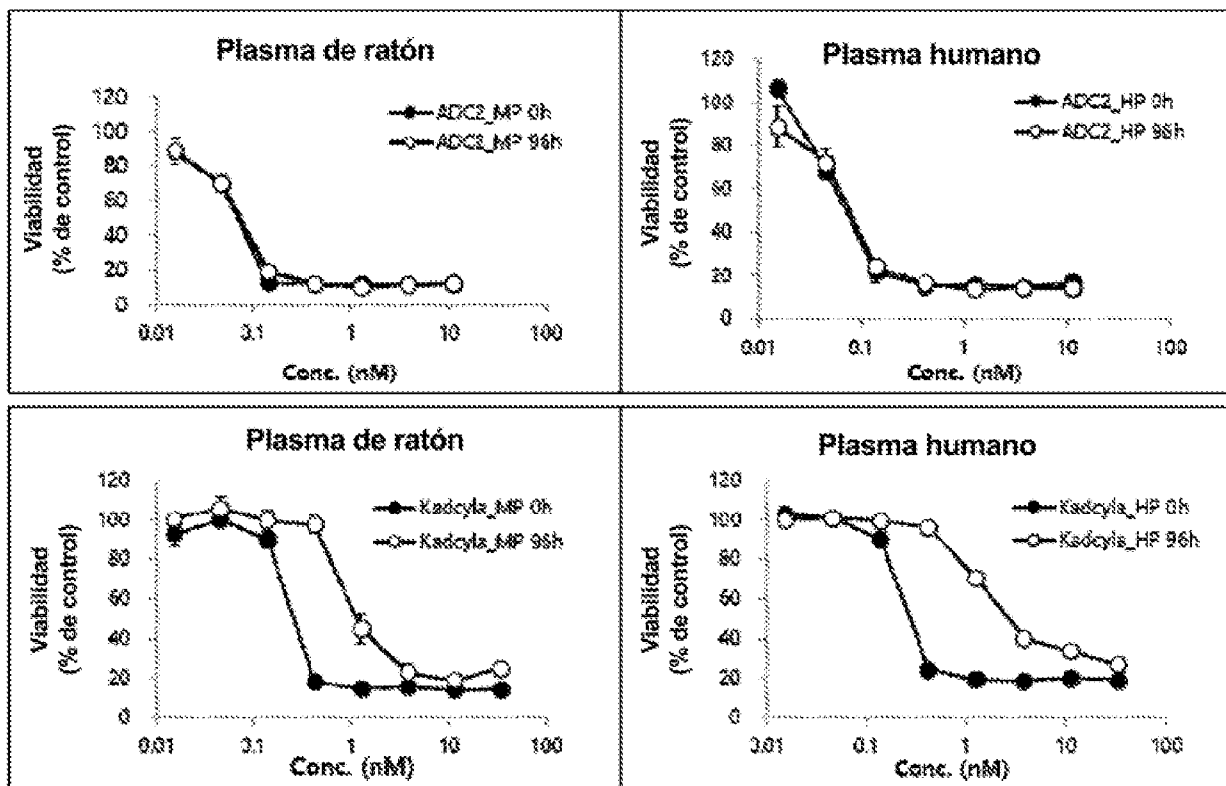


Figura 12

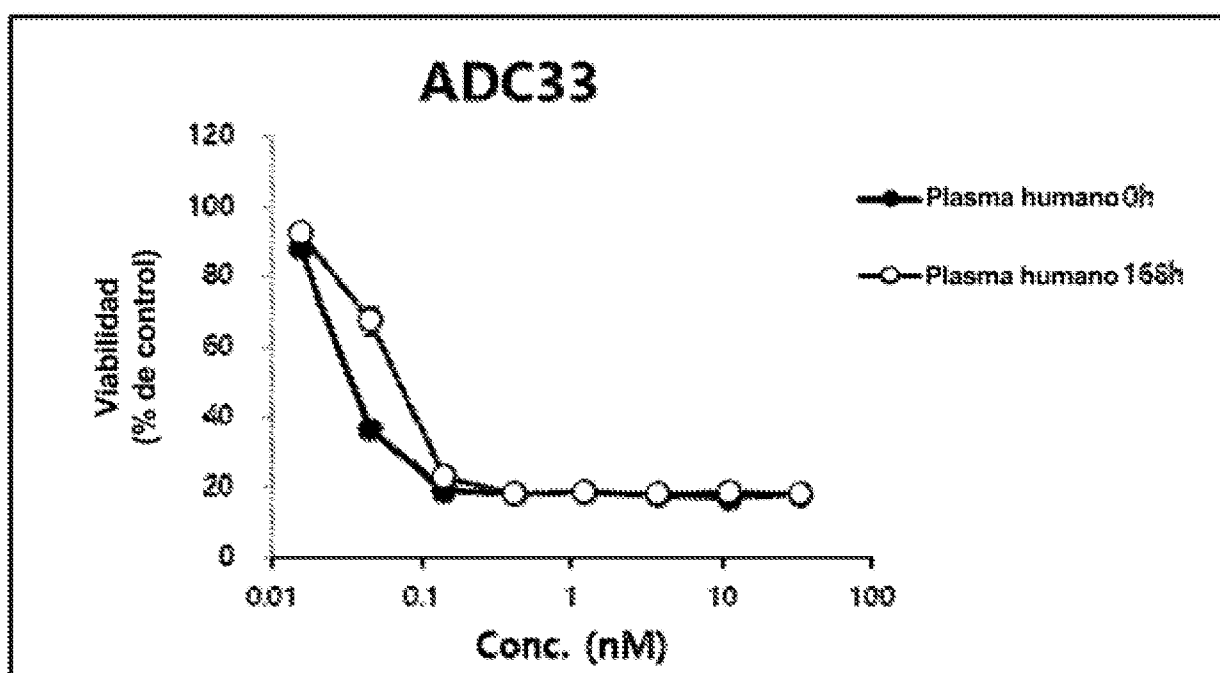
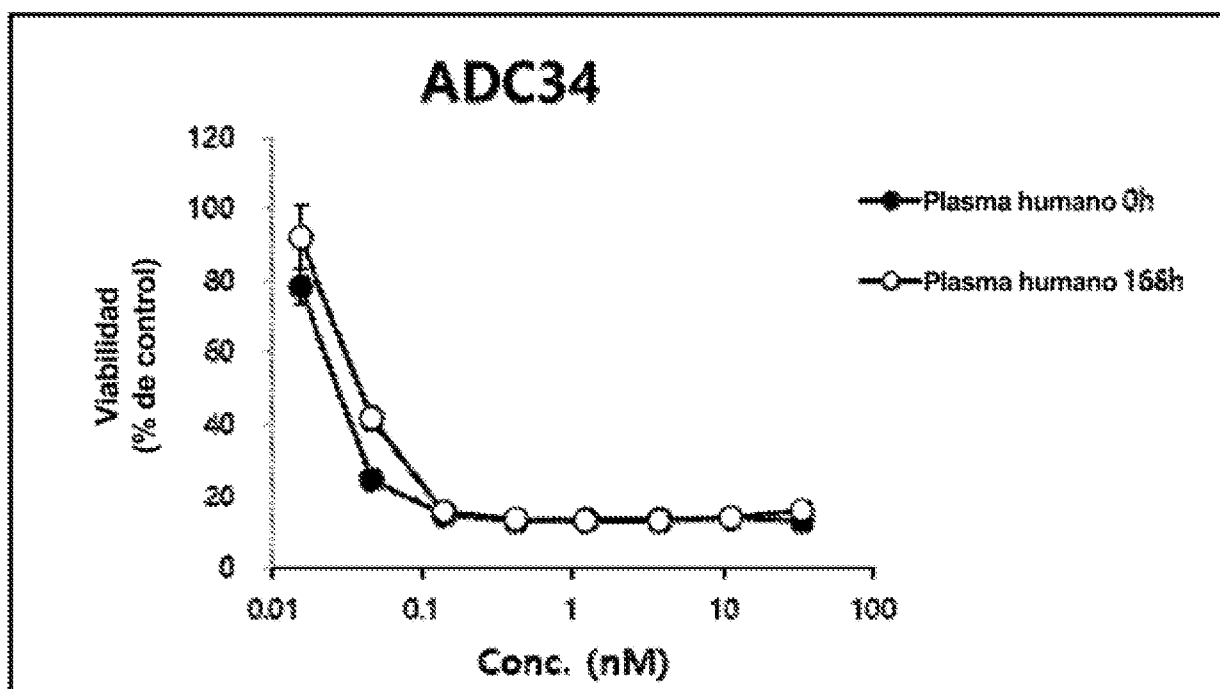


Figura 13

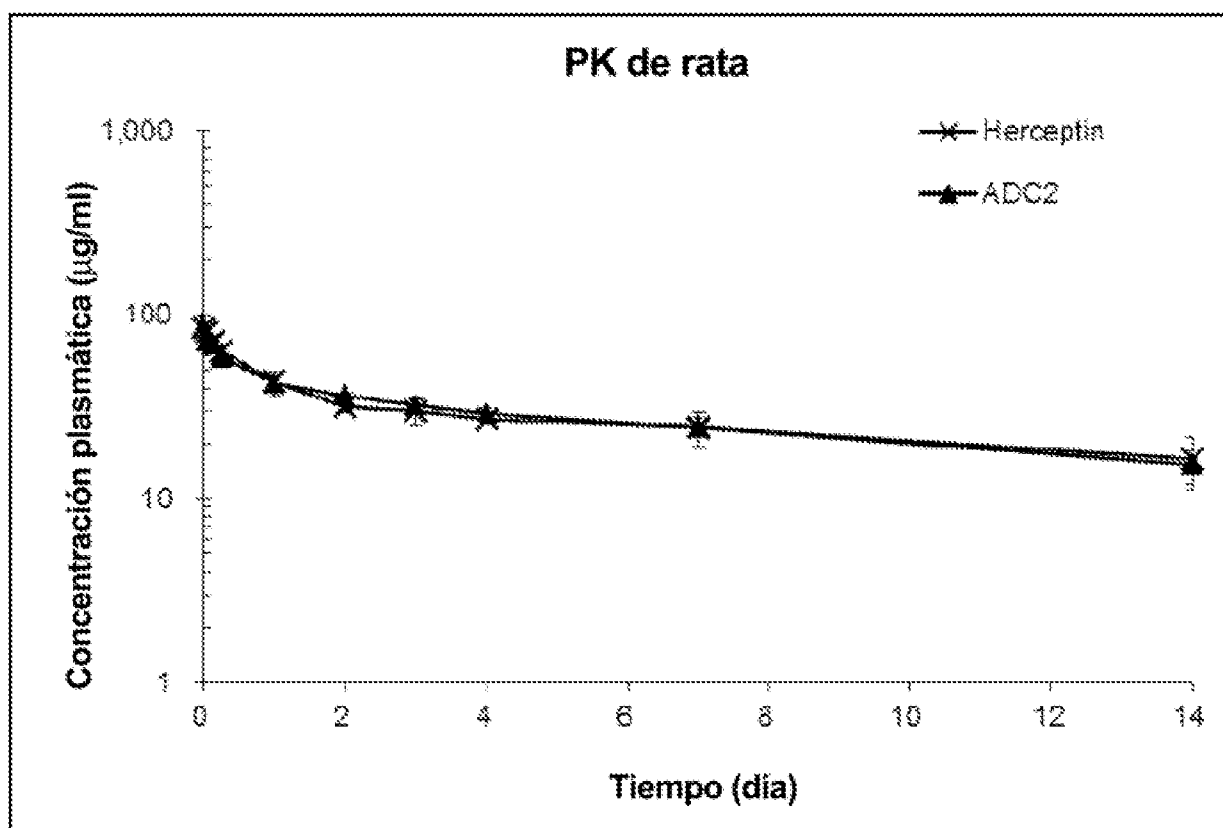


Figura 14

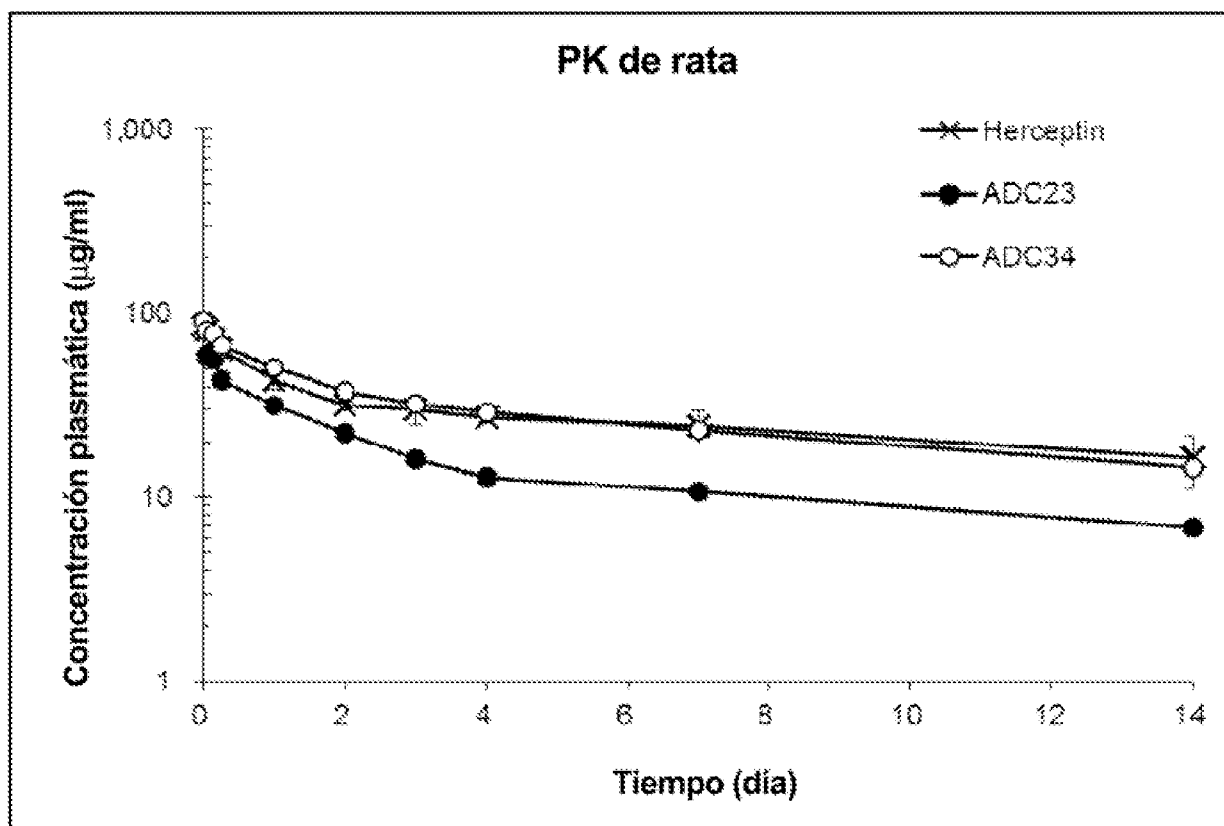


Figura 15

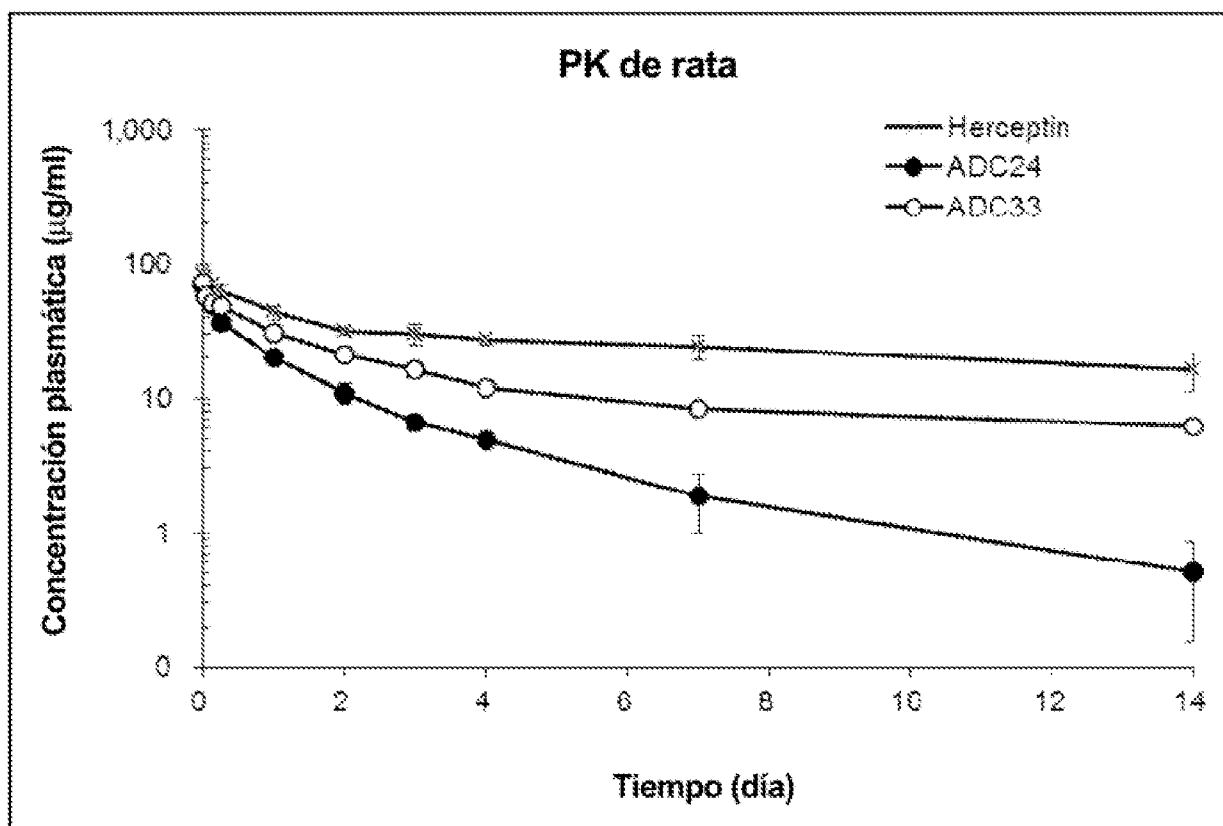


Figura 16

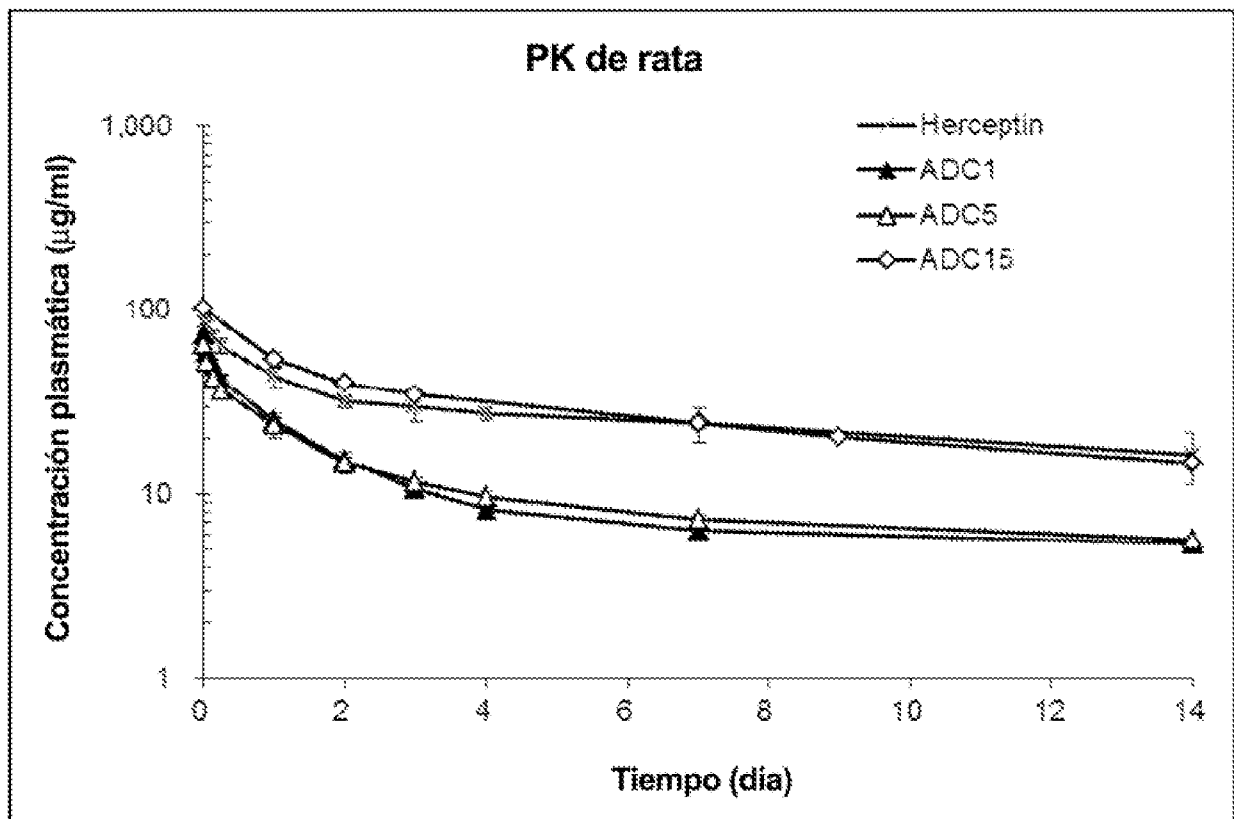


Figura 17

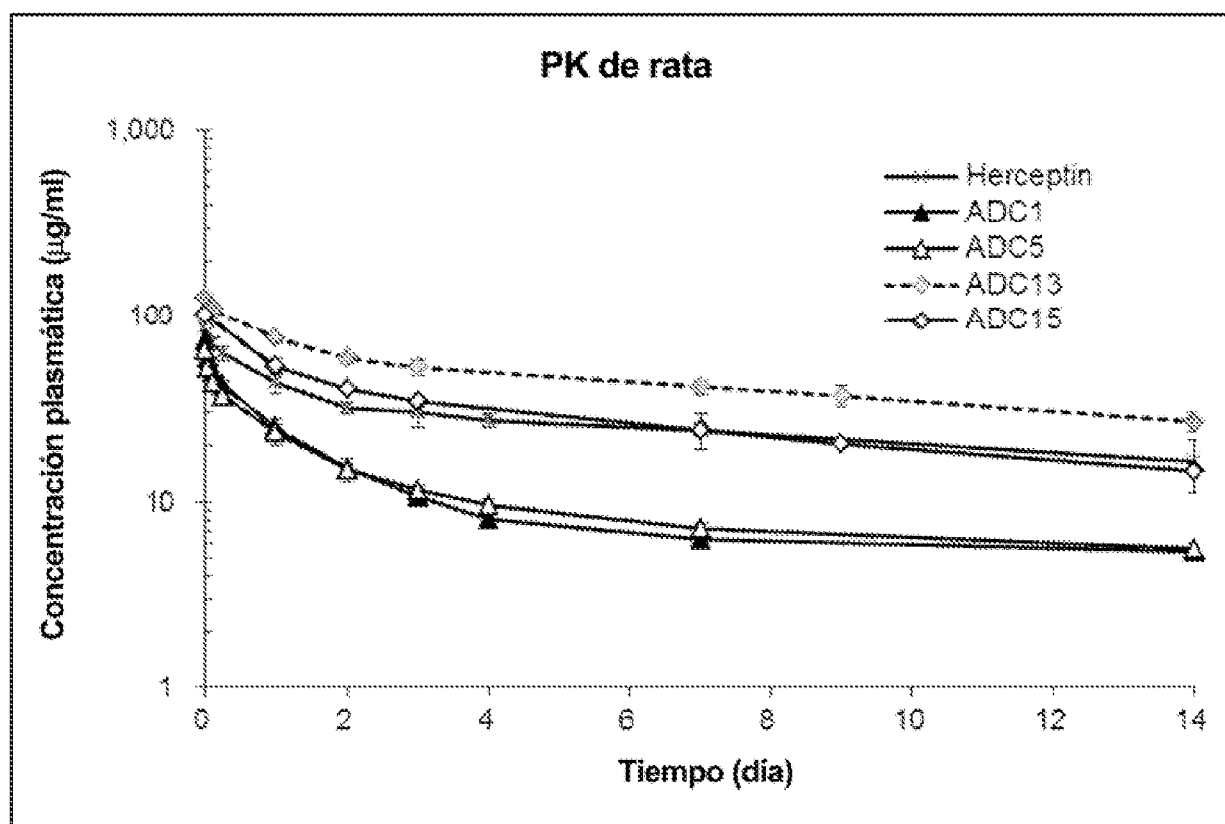


Figura 18

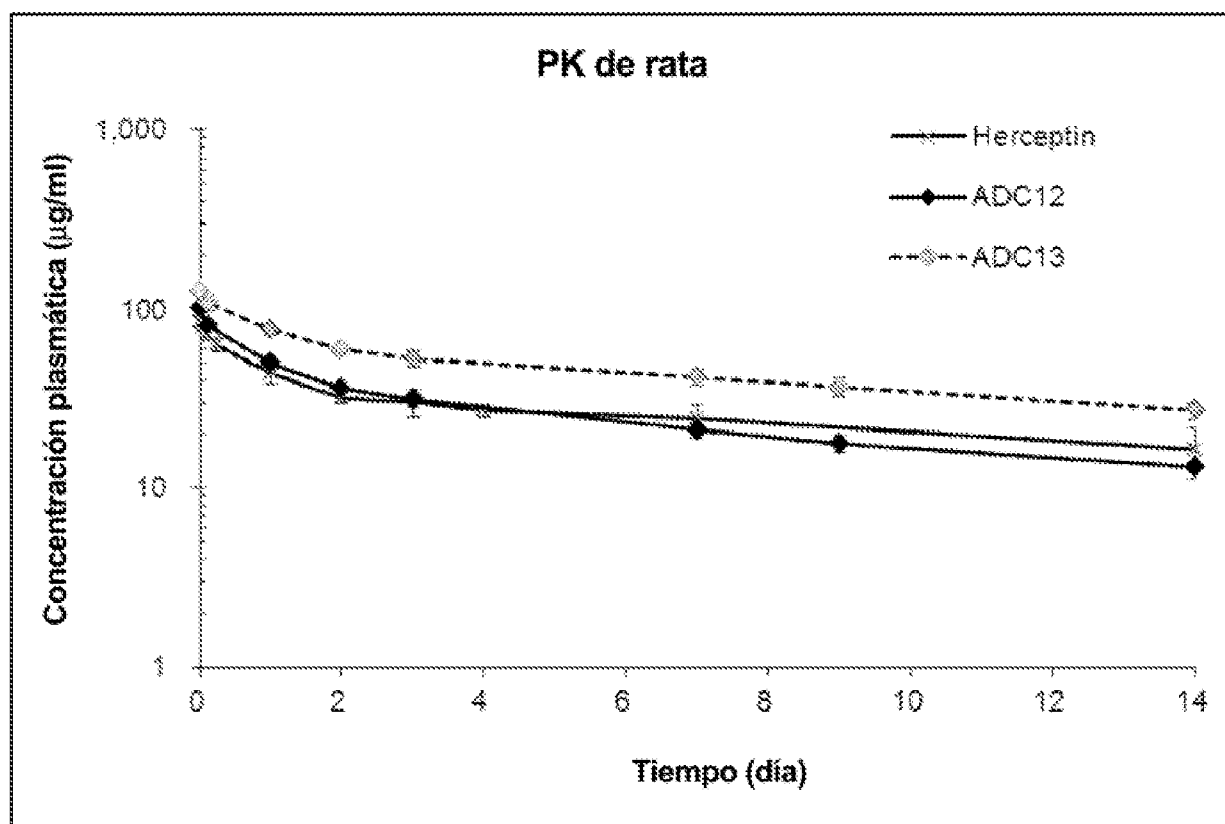


Figura 19

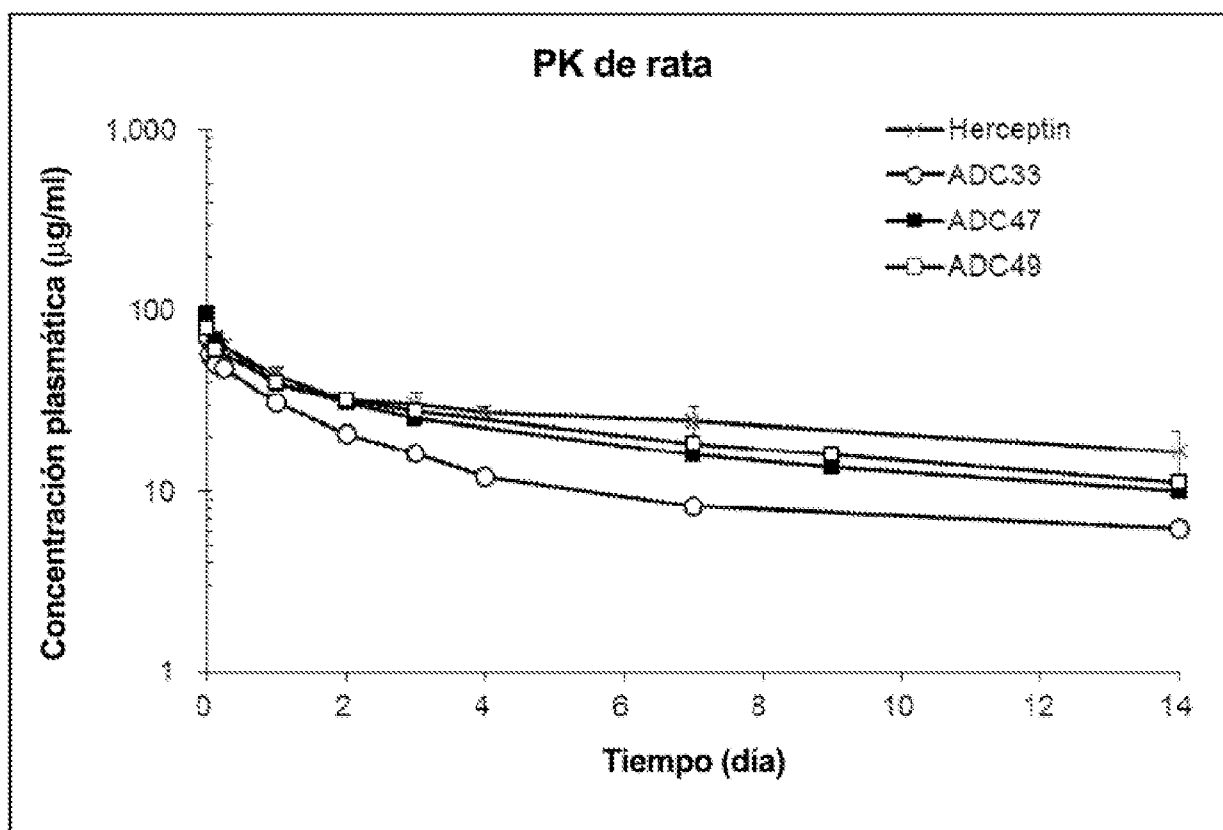


Figura 20

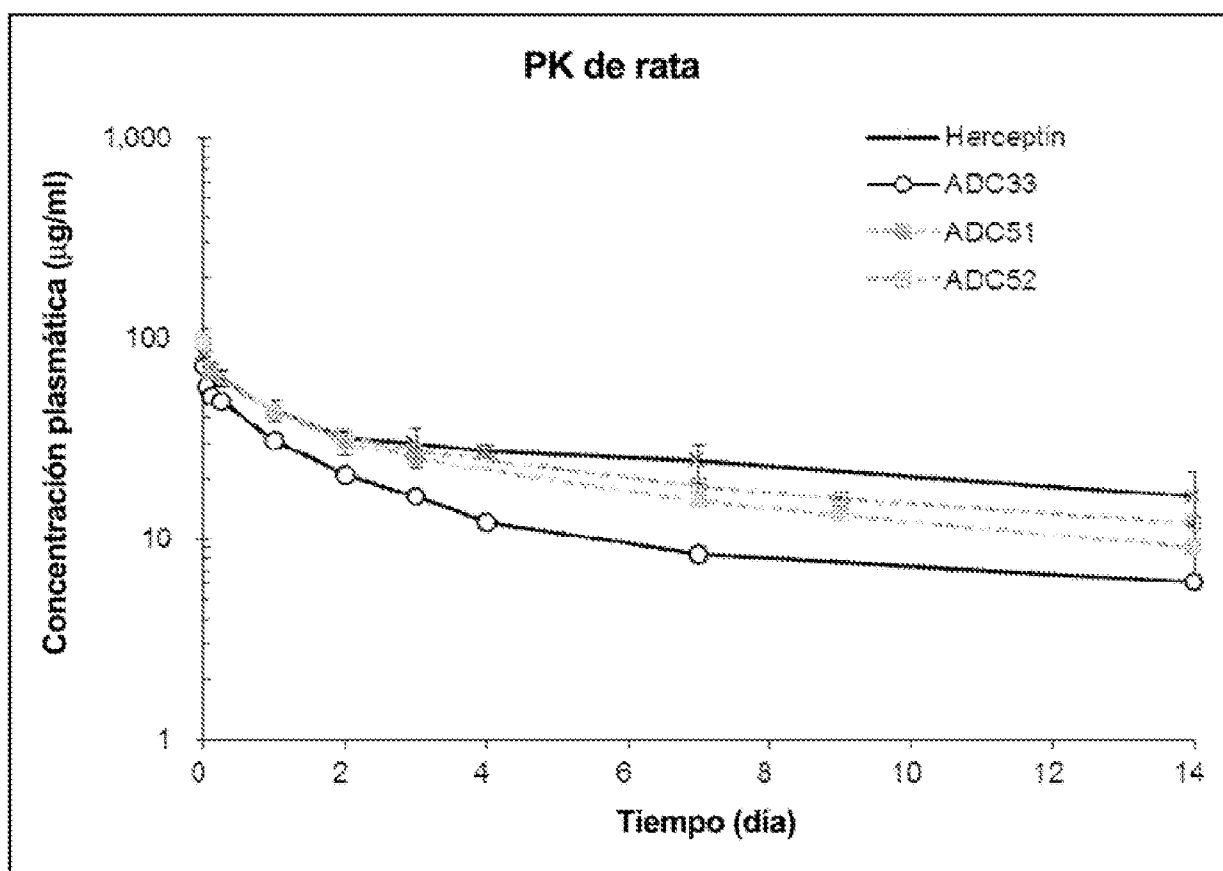


Figura 21

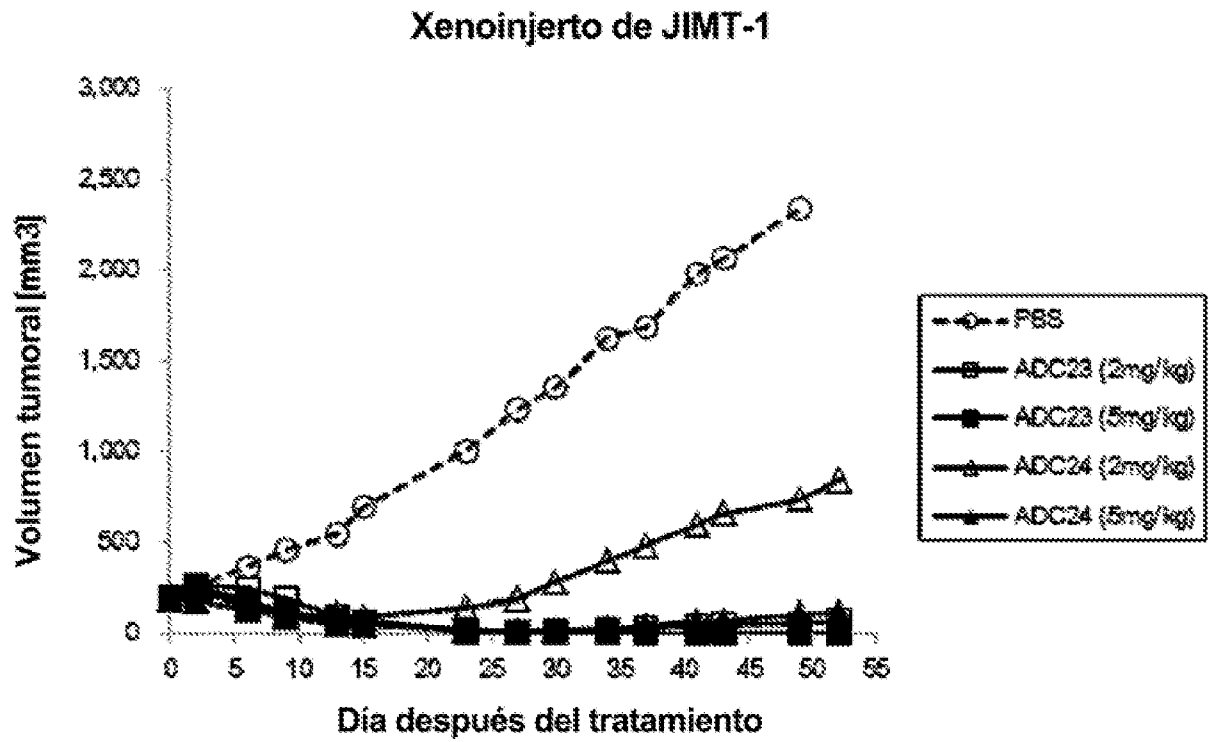
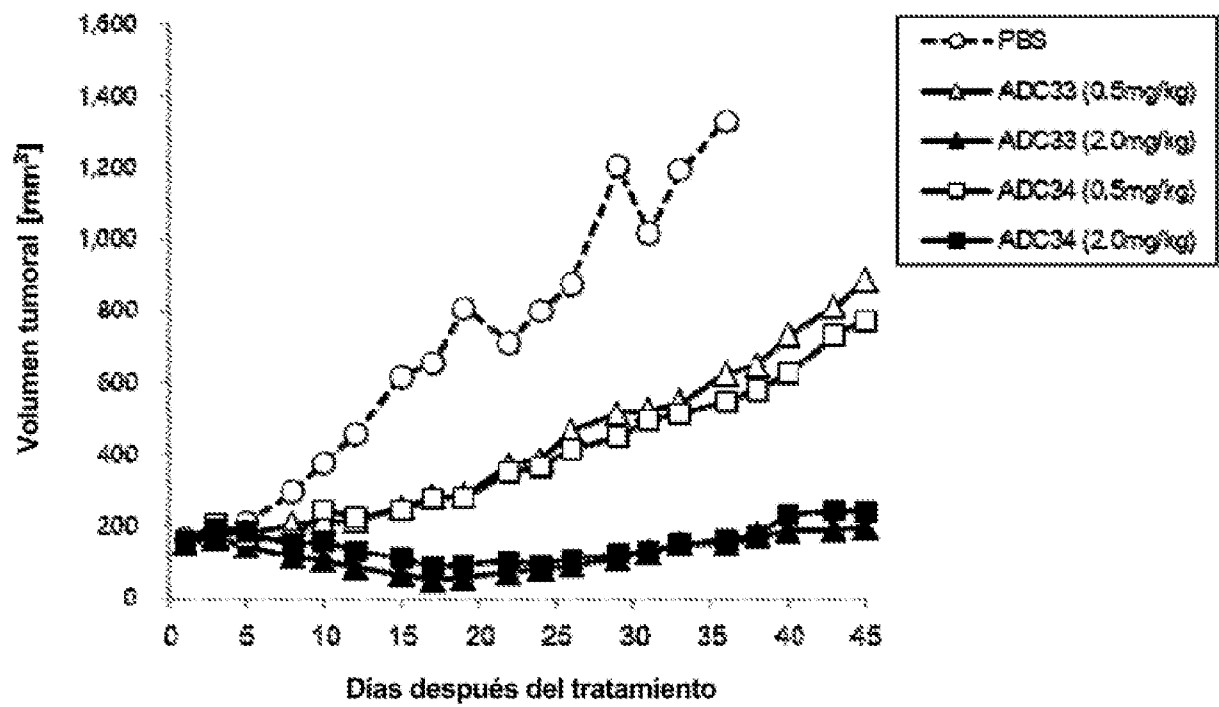


Figura 22

Xenoinjerto de JIMT-1



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- * US 20120308564 A [0005]
- * US 6225539 A [0076]
- * US 4816567 A [0081]
- * US 5514548 A [0081]
- * US 5546908 A [0081]
- * US 5589825 A [0081]
- * US 5591889 A [0081]
- * US 5545897 A [0081]
- * WO 9717852 A [0081]
- * EP 1291213 A [0090]
- * US 20080105481 A [0096]
- * US 5635483 A [0096]
- * WO 2004018466 A2 [0135]
- * KR 1020140035393 [0563] [0562]
- * WO 2013055867 A1 [0532]
- * US 8586728 B [0556] [0557]

Literatura no patente citada en la descripción

- * LEE et al. *Angewandte Chemie*, 2015, vol. 54 (41), 12020-12024 [0005]
- * HIA, RK et al. *Chem. Rev.*, 2009, vol. 109, 5620 [0046]
- * MELDAL, M.; TORNOE, CW. *Chem. Rev.*, 2008, vol. 108, 2852 [0046]
- * KOLB, HC et al. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 2001, vol. 40, 2004 [0046]
- * *Nature Rev. Cancer*, 2005, vol. 5 (5), 405-12 [0066]
- * *Nature Chemical Biology*, 2010, vol. 17, 498-508 [0066]
- * LANE KT; BEES LS. *J. Lipid Research*, 2009, vol. 47, 821-898 [0066]
- * KASEY PJ; SEABRA MC. *J. Biological Chemistry*, 1996, vol. 271 (10), 5269-5292 [0066]
- * DUCKWORTH, BP et al. *ChemBioChem*, 2007, vol. 8, 98 [0069]
- * UYEN TT et al. *ChemBioChem*, 2007, vol. 8, 408 [0069]
- * LABADIE, GR et al. *J. Org. Chem.*, 2007, vol. 72 (24), 9291 [0069]
- * WOLLACK, JW et al. *ChemBioChem*, 2009, vol. 10, 2934 [0069]
- * BELL, IM. *J. Med. Chem.*, 2004, vol. 47 (5), 1869 [0071]
- * JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0076]
- * RIECHMANN et al. *Nature*, 1986, vol. 322, 323-327 [0076]
- * VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0076]
- * MCCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0081]
- * CLACKSON et al. *Nature*, vol. 352, 624-626 [0081]
- * MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 561-567 [0081]
- * MARKS et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0081]
- * WATERHOUSE et al. *Nucleic Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2268 [0081]
- * MORIMOTO et al. *J. Biochemical & Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0081]
- * BRENNAN et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0081]
- * CARTER et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0081]
- * KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0081]
- * KILPATRICK et al. *Hybridoma*, 1997, vol. 16 (4), 381-389 [0081]
- * WRING et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, vol. 19 (5), 695-707 [0081]
- * BYNUM et al. *Hybridoma*, 1999, vol. 18 (5), 407-411 [0081]
- * JAKOBOVITS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0081]
- * JAKOBOVITS et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0081]
- * BRUGGEMANN et al. *Year Immunol.*, 1993, vol. 7, 33 [0081]
- * BARBAS et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0081]
- * SCHIER et al. *Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0081]
- * YELTON et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0081]
- * JACKSON. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-8 [0081]
- * HAWKINS et al. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-898 [0081]
- * KERR et al. *Bioconjugate Chem.*, 1997, vol. 8 (6), 781-784 [0090]
- * *ACR*, 2008, vol. 41, 95-107 [0090]
- * *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0090]
- * *Cancer Res.*, 2010, vol. 70 (17), 6949-6958 [0090]
- * *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Co. 1990 [0102]
- * *Curr. Med. Chem.*, 2009, vol. 16, 1192-1213 [0542]
- * *J. Chromatography B*, 2002, vol. 780, 451-457 [0559]