

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 351**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 5/02 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2010 E 10739817 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2461830**

54 Título: **Compuestos antiproliferativos, conjugados de los mismos, procedimientos para éstos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

03.08.2009 US 230932 P

11.08.2009 US 232883 P

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

22.12.2014

73 Titular/es:

**E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08540 , US**

72 Inventor/es:

**CHENG, HENG;
CONG, QIANG;
GANGWAR, SANJEEV y
ZHANG, QIAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 525 351 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

Compuestos antiproliferativos, conjugados de los mismos, procedimientos para éstos y usos de los mismos

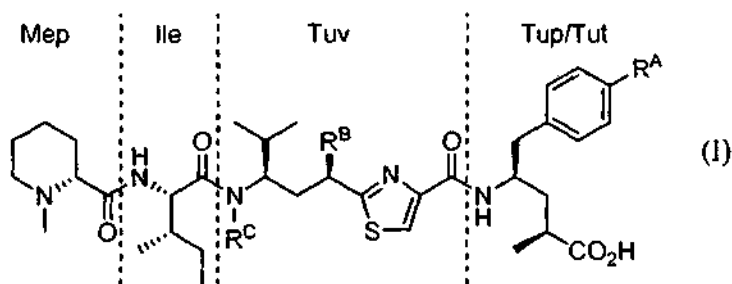
5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a compuestos estructuralmente relacionados con las tubulinas, conjugados de los mismos con un ligando, procedimientos para fabricar y usar tales compuestos y conjugados y composiciones que comprenden tales compuestos y conjugados.

Las tubulinas son citotoxinas originalmente aisladas de cultivos de las mixobacterias *Archangium gephyra* o *Angiococcus disciformis*, con cada organismo produciendo una mezcla de tubulinas diferente. (Sasse y col. 2000; Reichenbach y col. 1998). Su estructura cristalina y su ruta biosintética se han elucidado (Steinmetz y col. 2004) y sus genes de biosíntesis se han secuenciado (Hoeffle y col. 2006b). La propia pretubulina, un precursor biosintético de las tubulinas, también ha mostrado poseer actividad significativa (Ullrich y col. 2009). (Las citas íntegras de los documentos citados en el presente documento por el primer autor o inventor y el año se enumeran al final de la presente memoria descriptiva).

Las tubulinas pertenecen a un grupo de polipéptidos y depsipéptidos antimitóticos naturales que incluyen las fomopsinas, las dolastatinas y las criptoficinas (Hamel 2002). También existen agentes antimitóticos distintos de polipéptidos o depsipéptidos, por ejemplo paclitaxel, las maitansinas y las epotilonas. Durante la mitosis, los microtúbulos de la célula se reorganizan para formar el uso mitótico, un procedimiento que requiere el rápido ensamblaje y desensamblaje de las proteínas constituyentes del microtúbulo α - y β -tubulina. Los agentes antimitóticos bloquean el presente proceso y evitan que una célula sufra mitosis, aunque al nivel molecular el mecanismo de bloqueo exacto puede diferir de un agente a otro. Las tubulinas evitan el ensamblaje de las tubulinas en microtúbulos, causando que las células afectadas se acumulen en la fase G_2/M y sufran apoptosis (Khalil y col. 2006). En cambio, el paclitaxel efectúa el mismo resultado final por unión a microtúbulos y evitar su desensamblaje.

Las tubulinas tienen un armazón de tetrapeptidilo construido a partir de una subunidad aminoacídica proteinogénica y tres subunidades aminoacídicas no proteinogénicas: ácido N-metilpipercolínico (Mep), isoleucina (Ile), tubuvalina (Tuv) y bien tubufenilalanina (Tup, R^A equivale a H en la fórmula (I) más adelante) o tubutirosina (Tut, R^A equivale a OH). Se conocen aproximadamente una docena de tubulinas que se dan en la naturaleza (llamadas A, B, etc.), estando los sitios de variación estructural entre ellas en residuos R^A , R^B y R^C como se muestran en la Fórmula (I) y en la Tabla 1:



Tubulina	R^A	R^B	R^C
A	OH	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O) <i>i</i> -Bu
B	OH	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O) <i>n</i> -Pr
C	OH	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O)Et
D	H	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O) <i>i</i> -Bu
E	H	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O) <i>n</i> -Pr
F	H	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O)Et
G	OH	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O)CH=CH ₂
H	H	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O)Me
I	OH	OC(=O)Me	CH ₂ OC(=O)Me
U	H	OC(=O)Me	H
V	H	OH	H
Z	OH	OH	H
Pretubulina	H	H	Me

Kaur y col. 2006 estudiaron las propiedades antiproliferativas de la tubulina A y encontraron que era más potente que otros agentes antimitóticos tales como paclitaxel y vinblastina y era activa en ensayos de xenoinjertos contra diversas líneas celulares cancerosas. Adicionalmente, la tubulina A indujo apoptosis en células cancerosas pero no en células

normales y mostró propiedades antiangiogénicas significativas potenciales en ensayos *in vitro*. Las propiedades antimetóticas de otras tubulinas se han evaluado también y generalmente se ha encontrado que se comparan favorablemente contra aquellas de agentes antimetóticos no tubulinas (véanse, por ejemplo, Balasubramanian y col. 2009; Steinmetz y col. 2004; Wipf y col. 2004). Por las presentes razones, hay considerable interés en las tubulinas como agentes anticancerígenos (véase, por ejemplo, Domling y col. 2005c; Hamel 2002).

Numerosas publicaciones describen esfuerzos dirigidos a la síntesis de tubulinas, incluyendo: Balasubramanian y col. 2009; Domling y col. 2006; Hoefle y col. 2003; Neri y col. 2006; Peltier y col. 2006; Sani y col. 2007; Sasse y col. 2007; Shankar y col. 2009; Shibue y col. 2009; y Wipf y col. 2004. Otras publicaciones describen estudios de relación estructura-actividad (SAR), por medio de la preparación y evaluación de análogos o derivados de tubulina: Balasubramanian y col. 2008 y 2009; Domling 2006; Domling y col. 2005a; Ellman y col. 2009; Hoefle y col. 2001 & 2006a; Patterson y col. 2007 & 2008; Richter 2008; Vlahov y col. 2009; Wang y col. 2007; y Wipf y col. 2007 y 2010. Los estudios de SAR exploraron principalmente variaciones estructurales en el anillo de Mep, en los residuos R^B y R^C de la subunidad Tuv, y en el anillo aromático o en la cadena de carbonos alifática de la subunidad Tup/Tut.

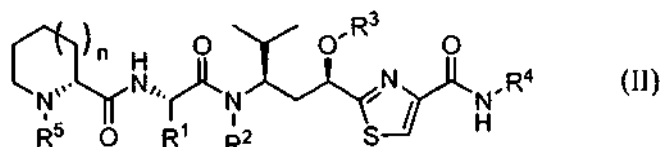
Domling y col. 2005 revela conjugados de tubulinas con una molécula compañera descrita genéricamente como un polímero o una biomolécula, pero con ejemplos reales limitados a polietilenglicol (PEG) como la molécula compañera. Otros documentos que describen los conjugados de tubulinas son Boyd y col. 2008 y 2010; Vlahov y col. 2008a, 2008b y 2010; Leamon y col. 2008 y 2009; Reddy y col. 2009; y Low y col. 2009. Leung y col. 2002 revela polipéptidos polianiónicos que pueden conjugarse a fármacos (incluyendo tubulinas) para incrementar su bioactividad y solubilidad en agua.

Davis y col. 2008 y Schluep y col. 2009 revela formulaciones basadas en ciclodextrina en las que las tubulinas están covalentemente unidas a una ciclodextrina por medio de un resto de engarce hidracida-disulfuro unido al grupo carboxilo Tup/Tut.

Breve resumen de la invención

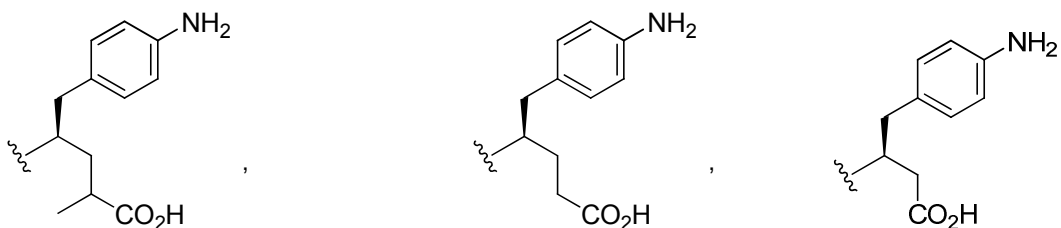
La presente invención revela compuestos antiproliferativos novedosos que están relacionados estructuralmente relacionados con las tubulinas, son citotóxicos o citostáticos contra muchas células cancerosas y se cree que actúan por un mecanismo antimetótico. Los presentes compuestos se pueden conjugar con ligandos tales como anticuerpos para administración dirigida contra células cancerosas.

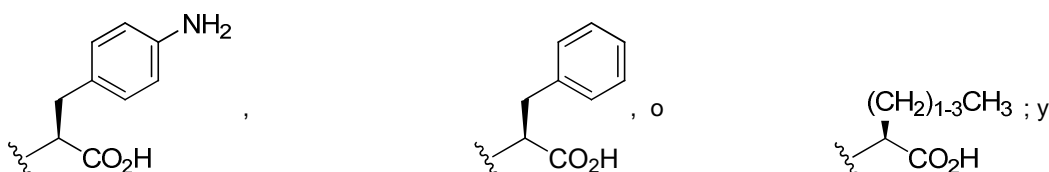
En una realización, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una estructura representada por fórmula (II)



en la que

n es 0, 1 o 2;
 R¹, R² y R³ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀ sin sustituir o sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sin sustituir o sustituido, alquino C₂-C₁₀ sin sustituir o sustituido, arilo sin sustituir o sustituido, heteroarilo sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alquilo C₁-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alquilo C₁-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquilo C₁-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, cicloalifático sin sustituir o sustituido, heterocicloalifático sin sustituir o sustituido, arilalquilo sin sustituir o sustituido, o alquilarilo sin sustituir o sustituido;
 R⁴ es

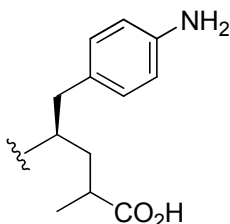




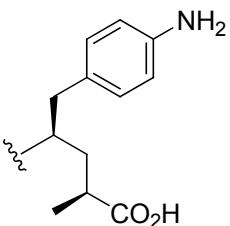
R⁵ es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, CO(alquilo C₁-C₅), CO(alquenilo C₂-C₅), o CO(alquinilo C₂-C₅);

5 o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo, una amida farmacéuticamente aceptable del mismo en el grupo carboxilo de R⁴ con el grupo α-amino de un α-aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un R⁴ preferido es



10 con la estereoquímica en el grupo metilo alfa con respecto al carboxilo siendo más preferente que la que corresponde a las tubulisininas naturales, es decir:



15 La presente invención proporciona también intermedios novedosos útiles para sintetizar compuestos de acuerdo con la fórmula (II).

20 En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención conjugado por medio de un resto de engarce a un ligando (preferentemente un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal, y lo más preferentemente un anticuerpo monoclonal humano) para su administración selectiva a una célula diana tal como una célula cancerosa.

25 En otra realización, se proporciona una composición de materia que comprende un compuesto de la presente invención y un resto de engarce, adecuado para conjugación a un ligando.

30 En otra realización, la presente invención proporciona compuestos para su uso en un procedimiento para inhibir la proliferación de células cancerosas en un sujeto que sufre de cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente invención o un conjugado del mismo con un ligando (particularmente un anticuerpo). En otra realización, se proporciona un compuesto para su uso en un procedimiento para inhibir la proliferación de células cancerígenas, comprendiendo poner en contacto tales células con un compuesto de la presente invención o un conjugado del mismo con un ligando (particularmente un anticuerpo), en condiciones suficientes para inhibir el crecimiento de tales células cancerosas. Las células cancerosas pueden ser células de cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de ovarios, mieloma múltiple, cáncer renal, leucemia, o linfoma. Donde el ligando es un anticuerpo se prefiere que el anticuerpo se una a un antígeno expresado por las células cancerosas.

40 En otra realización, se proporciona un compuesto para su uso en un procedimiento de tratar un cáncer en un sujeto que sufre de tal cáncer, comprendiendo administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de esta invención o un conjugado de la misma con un ligando (en particular un anticuerpo). En otra realización, se proporciona el uso de un compuesto de esta invención (o un conjugado del mismo con un ligando (particularmente un anticuerpo)) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. En estas realizaciones, el cáncer puede ser cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de ovarios, mieloma múltiple, cáncer renal, leucemia, o linfoma.

45 En otra realización, se proporciona el uso de un compuesto de esta invención o un conjugado del mismo con un

ligando (preferentemente un anticuerpo) para la preparación de un medicamento para tratar un cáncer en un sujeto que sufre de tal cáncer.

Breve descripción del/de los dibujo(s)

5 **Figs. 1a** y **1b** representan, en combinación, un Esquema 1 para fabricar compuestos de la presente invención.
Figs. 2 y **3** representan Esquemas 2 y 3, respectivamente, también usables para fabricar compuestos de la presente invención.
Fig. 4 representa un Esquema 4 adecuado para unir un engarce peptídico y un grupo reactivo de maleimida a compuestos de la presente invención.
10 **Figs. 5, 6, y 7** representan Esquemas 5, 6, y 7, respectivamente, usables para fabricar compuestos de la presente invención.
Figs. 8a, 8b, y 8c muestran Esquemas 8, 9 y 10, respectivamente, para fabricar intermedios útiles para preparar compuestos de la presente invención.
15 **Figs. 9 y 10** muestran Esquemas 11 y 12, respectivamente, ilustrando como intermedios tales como aquellos mostrados en **Figs. 8a-8c** se pueden elaborar en compuestos de la presente invención.
Figs. 11a y 11b muestran los trazados para ensayos de proliferación de ^3H -timidina para un primer grupo de compuestos de la presente invención, contra dos tipos diferentes de células cancerosas.
Figs. 12a y 12b muestran los trazados para ensayos de proliferación de luminiscencia de ATP para un segundo grupo de compuestos de la presente invención, contra dos tipos de células cancerosas. **Figs. 12c y 12d** muestran los trazados para ensayos de proliferación de ^3H -timidina para el mismo segundo grupo de compuestos y contra los mismos dos tipos de células cancerosas.
Fig. 13 muestra la actividad contra células cancerosas renales de conjugados de compuestos de la presente invención en ensayos de proliferación de ^3H -timidina.
20 **Fig. 14** muestra la actividad contra células cancerosas renales de conjugados de compuestos de la presente invención en estudios de xenotransplante.
Fig. 15 muestra un Esquema 13 para fabricar intermedios útiles para fabricar compuestos de esta invención.
Fig. 16 muestra un Esquema 14 para fabricar compuestos de esta invención a partir de intermedios de elaborados por el esquema 13.
30 **Figuras 17 y 18** muestran Esquemas 15 y 16, respectivamente, para fabricar compuestos listos para la conjugación de esta invención.
Figura 19 muestra el Esquema 17 para fabricar un intermedio útil para fabricar compuestos de esta invención.
Figuras 20a y 20b muestran el Esquema 18 para la preparación de compuestos de esta invención a partir del intermedio del Esquema 17.
35 **Fig. 21** muestra el Esquema 19 para fabricar un intermedio usado en el Esquema 18.
Fig. 22 muestra el Esquema 20 para la síntesis de un intermedio usado en fabricar compuestos de esta invención.
Fig. 23 muestra el Esquema 21 para fabricar compuestos de esta invención a partir del intermedio del Esquema 20.
Fig. 24 muestra el Esquema 22 para fabricar aún otro intermedio útil para fabricar compuestos de esta invención.
Fig. 25 muestra el Esquema 23 para fabricar compuestos de esta invención a partir del intermedio del Esquema 22.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

45 "Anticuerpo" quiere decir anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas individuales del mismo. Un anticuerpo completo es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (V_H) y una región constante de la cadena pesada que comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (V_L o V_k) y una región constante de la cadena ligera que comprende un dominio individual, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), interdispersas con regiones marco más conservadas (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo aminoterminal al extremo carboxiterminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las regiones variables contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes pueden mediar la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un antígeno X si el anticuerpo se une a un antígeno X con un K_D de 5×10^{-8} M o menos, más preferentemente 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente 6×10^{-9} M o menos, más preferentemente 3×10^{-9} M o menos, incluso más preferentemente 2×10^{-9} M o menos. El anticuerpo puede ser quimérico, humanizado, o, preferentemente, humano. La región constante de la cadena pesada puede manipularse para afectar al tipo o extensión de la glicosilación, para prolongar la semivida del anticuerpo, para mejorar o reducir interacciones con células efectoras o el sistema del complemento, o para modular alguna otra propiedad. La manipulación se puede llevar a cabo por reemplazo, adición, o delección de uno o más aminoácidos o por reemplazamiento de un dominio con un dominio de otro tipo de inmunoglobulina, o una combinación de lo precedente.

65 "Fragmento de anticuerpo" y "parte de unión al anticuerpo" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo")

quiere decir uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unir específicamente a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud total, tal como (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, por ejemplo, Abbas y col., *Cellular and Molecular Immunology*, 6ª edición, Saunders Elsevier 2007); (iv) un fragmento Fd constituido por los dominios V_H y C_{H1} ; (v) un fragmento Fv constituido por los dominios V_L y V_H de un brazo individual de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) *Nature* 341: 544-546), que consta de un dominio V_H ; (vii) una región de determinación de complementariedad aislada (CDR); y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un dominio variable individual y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando procedimientos recombinantes, por un engarce sintético que les permite hacerlo como una cadena de proteína individual en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple, o scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena individual están también comprendidos dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo.

Un "anticuerpo aislado" quiere decir un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a antígeno X está sustancialmente libre de anticuerpos que unen específicamente antígenos distintos de antígeno X). Un anticuerpo aislado que específicamente une antígeno X puede, sin embargo, tener reactividad cruzada a otros antígenos, tal como moléculas de antígeno X de otras especies. En ciertas realizaciones, un anticuerpo aislado une específicamente a antígeno X humano y no reacciona de forma cruzada con otros antígenos X de antígeno (no humanos). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

"Anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" quiere decir una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular individual, que presenta una especificidad y afinidad de unión individual para un epítipo particular.

"Anticuerpo humano" quiere decir un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR (y la región constante, si está presente) se derivan de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones posteriores, incluyendo modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos aminoacídicos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, "anticuerpos humanos" no incluyen anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, se han injertado en las secuencias marco humanas.

"Anticuerpo monoclonal humano" quiere decir un anticuerpo que presenta una especificidad de unión individual, que tiene regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En una realización, se producen anticuerpos monoclonales humanos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana condensados a una célula inmortalizada.

"Alifático" quiere decir una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada, sin restos de hidrocarburos aromáticos que tiene el número de átomos de carbono especificado (por ejemplo, como en "alifático C_3 ", "alifático C_1-C_5 ", o "alifático C_1 a C_5 ", siendo las últimas dos frases sinónimas para un resto alifático que tiene de 1 a 5 átomos de carbono) o, donde el número de átomos de carbono no se especifica explícitamente, desde 1 hasta 4 átomos de carbono (2 a 4 carbonos en el caso de restos alifáticos insaturados).

"Alquilo" quiere decir un resto alifático saturado, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono siendo aplicable. A modo de ejemplo, restos de alquilo C_1-C_4 incluyen, pero no se militan a metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, *t*-butilo, 1-butilo, 2-butilo y similares.

"Alqueno" quiere decir un resto alifático que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono siendo aplicable. A modo de ejemplo, restos de alqueno C_2-C_4 incluyen, pero no se limitan a, etenilo (vinilo), 2-propenilo (alilo o prop-2-enilo), cis-1-propenilo, *trans*-1-propenilo, *E*- (o *Z*-) 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo (but-1,3-dienilo) y similares.

"Alquino" quiere decir un resto alifático que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono siendo aplicable. A modo de ejemplo, grupos alquino C_2-C_4 incluyen etinilo (acetilenilo), propargilo (prop-2-inilo), 1-propinilo, but-2-inilo y similares.

"Cicloalifático" quiere decir un resto hidrocarburo saturado o no saturado, no aromático que tiene de 1 a 3 anillos, teniendo cada anillo desde 3 hasta 8 (preferentemente desde 3 hasta 6) átomos de carbono. "Cicloalquilo" quiere decir

un resto cicloalifático en el que cada anillo está saturado. "Cicloalqueno" quiere decir un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. "Cicloalquino" quiere decir un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. A modo de ejemplo, los restos cicloalifáticos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo y adamantilo. Los restos cicloalifáticos preferidos son cicloalquilos, especialmente ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

"Heterocicloalifático" quiere decir un resto cicloalifático en el que, en al menos un anillo del mismo, hasta tres (preferentemente 1 a 2) carbonos se han reemplazado con un heteroátomo independientemente seleccionado de N, O, o S, donde el N y el S opcionalmente pueden oxidarse y el N opcionalmente puede cuaternizarse. De forma similar, "heterocicloalqueno", "heterocicloalqueno" y "heterocicloalquino" quiere decir un resto cicloalquilo, cicloalqueno, o cicloalquino, respectivamente, en el que al menos un anillo del mismo se ha modificado así. Los restos heterocicloalifáticos ejemplares incluyen aziridinilo, azetidino, 1,3-dioxano, oxetano, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropirano, tetrahidrotiopirano, tetrahidrotiopiranosulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinilo sulfóxido, tiomorfolinilsulfona, 1,3-dioxolano, tetrahydro-1,1-dioxotieno, 1,4-dioxano, tiano y similares.

"Alcoxi", "ariloxi", "alquiltio", y "ariltio" quiere decir -O(alquilo), -O(arilo), -S(alquilo) y -S(arilo), respectivamente. Ejemplos son metoxi, fenoxi, metiltio y feniltio, respectivamente.

"Halógeno" o "halo" quiere decir flúor, cloro, bromo o yodo.

"Arilo" quiere decir un resto de hidrocarburo que tiene un sistema de anillos mono-, bi-, o tricíclicos en los que cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es aromático. Los anillos en el sistema de anillos pueden estar condensados unos a otros (como en naftilo) o enlazados unos a otros (como en bifenilo) y pueden estar condensados o enlazados a anillos no aromáticos (como en indanilo o ciclohexilfenilo). A modo de ejemplo adicional, los restos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antraceno y acenafilo.

"Heteroarilo" quiere decir un resto que tiene un sistema de anillo mono-, bi-, o tricíclico en el que cada anillo tiene desde 3 hasta 7 átomos de carbono y al menos un anillo es un anillo aromático que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O, o S, donde N y S pueden estar opcionalmente oxidados y N puede estar opcionalmente cuaternizado. Un anillo aromático tal que contenga al menos un heteroátomo puede estar condensado a otros tipos de anillos (como en benzofuranilo o tetrahidroisoquinolilo) o puede estar directamente enlazado a otros tipos de anillos (como en fenilpiridilo o en 2-ciclopentilpiridilo). A modo de ejemplo adicional, los restos heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tiofenilo (tienilo), imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, N-oxopiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiofenilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, fenotiazolilo, benzimidazolilo, benzotriazolilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, dibenzotiofenilo, acridinilo y similares.

Donde se indica que un resto puede estar sustituido, tal como por uso de expresión "sustituido o sin sustituir" u "opcionalmente sustituido" como en "alquilo C₁-C₅ sustituido o sin sustituir" o "heteroarilo opcionalmente sustituido", tal resto puede tener uno o más sustituyentes independientemente seleccionados, preferentemente uno a cinco en número, más preferentemente uno o dos en número. Los sustituyentes y los patrones de sustitución se pueden seleccionar por alguien de habilidad ordinaria en la técnica, teniendo en cuenta el resto por el que está unido el sustituyente, para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que se puedan sintetizar por técnicas conocidas en la técnica así como los por los procedimientos expuestos en el presente documento.

"Aralalquilo", (heterocicloalifático)alquilo, "arilalqueno", "arilalquino", "biarilalquilo" y similares quieren decir un alquilo, alqueno o alquino, como puede ser el caso, sustituidos con un resto arilo, heterocicloalifático, biarilo, etc., como puede ser el caso, con la valencia abierta (insatisfecha) en el resto alquilo, alqueno, o alquino, por ejemplo como en bencilo, fenetilo, N-imidazoliletilo, N-morfolinoetilo y similares. En cambio, "alquilarilo", "alquencilcualquilo" y similares quieren decir un resto arilo, cicloalquilo, etc., como puede ser el caso, sustituidos con un resto alquilo, alqueno, etc., como puede ser el caso, por ejemplo como en metilfenilo (tolilo) o alilciclohexilo. "Hidroalquilo", "haloalquilo", "alquilarilo", "cianoarilo", y similares quieren decir un resto alquilo, arilo, etc., como puede ser el caso, sustituido con uno o más de los sustituyentes identificados (hidroxilo, halo, etc., como puede ser el caso).

A modo de ejemplo, los sustituyentes permisibles incluyen, pero no se limitan a, alquilo (especialmente metilo o etilo), alqueno (especialmente alilo), alquino, arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo (especialmente fluoro), haloalquilo (especialmente trifluorometilo), hidroxilo, hidroalquilo (especialmente hidroxietilo), ciano, nitro, alcoxi -O(hidroalquilo), -O(haloalquilo) (especialmente -OCF₃), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH., -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroalquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroalquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroalquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH,

-S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo), -SO₂N(alquilo)₂, y similares.

5 Donde el resto que está sustituido es un resto alifático, los sustituyentes preferidos son arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroalquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo),
 -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -CO₂H, -C(=O)NHOH,
 -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroalquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo),
 -OC(=O)(hidroalquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroalquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo),
 -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroalquilo), -NHC(=O)(alquilo),
 10 -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH,
 -S(alquilo), -S(arilo), -S(=O)alquilo, -S(cicloalquilo), -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo) y -SO₂N(alquilo)₂. Son
 sustituyentes más preferidos halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(arilo), =O, =NOH, =NO(alquilo), -OC(=O)(alquilo),
 -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂,
 15 -NH(arilo), NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂ y
 -NHC(=NH)NH₂.

Donde el resto que está sustituido es un resto cicloalifático, heterocicloalifático, arilo, o heteroarilo, los sustituyentes
 preferidos son alquilo, alqueno, alquino, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroalquilo, ciano, nitro, alcoxi,
 -O(hidroalquilo), -O(haloalquilo), -O(arilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), alquiltio, ariltio, -C(=O)(alquilo),
 20 -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroalquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo),
 -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroalquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroalquilo),
 -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo),
 -NH(hidroalquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂,
 -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂,
 25 -SO₂NH(alquilo) y -SO₂N(alquilo)₂. Son sustituyentes más preferidos alquilo, alqueno, halo, haloalquilo, hidroxilo,
 hidroalquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroalquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo),
 -C(=O)O(hidroalquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroalquilo),
 -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroalquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, -NH₂,
 -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo),
 30 -NHC(=O)N(alquilo)₂ y -NHC(=NH)NH₂.

Donde está establecido un intervalo, como en "alquilo C₁-C₅" de "5 al 10 %", tal intervalo incluye los puntos finales del
 intervalo, como en C₁ y C₅ en el primer ejemplo y 5 % y 10 % en el segundo ejemplo.

35 A menos que los estereoisómeros particulares estén especialmente indicados (por ejemplo, por un enlace marcado o
 discontinuo en un centro estérico relevante en una fórmula estructural, por representación de un doble enlace como
 teniendo configuración E o Z en una fórmula estructural, o usando nomenclatura designada para estereoquímica),
 todos los estereoisómeros están incluidos dentro del alcance de la invención, como compuestos puros así como en
 forma de mezclas de los mismos. A menos que se indique otra cosa, los enantiómeros individuales, diastereómeros
 40 individuales, isómeros geométricos individuales y combinaciones y mezclas de los mismos están abarcados por la
 presente invención.

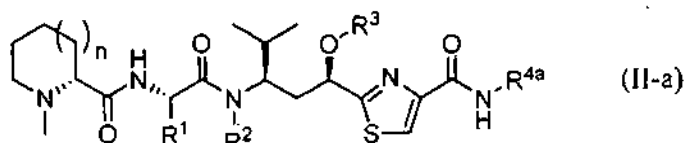
Aquellos expertos en la técnica apreciarán que los compuestos pueden tener formas tautómeras (por ejemplo, formas
 ceto y enol), formas de resonancia y formas híbridas que son equivalentes a aquellas representadas en las fórmulas
 45 estructurales usadas en el presente documento y que las fórmulas estructurales abarcan formas tautoméricas, de
 resonancia, o híbridas.

"Éster farmacéuticamente aceptable" quiere decir un éster que se hidroliza *in vivo* (por ejemplo en el cuerpo humano)
 para producir el compuesto parental o una sal de los mismos o que tiene por sí mismo actividad similar a aquella del
 50 compuesto parental. Los ésteres adecuados incluyen ésteres alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅ o alquino C₂-C₅,
 especialmente metilo, etilo o n-propilo.

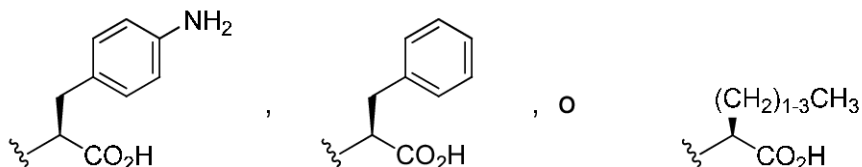
"Sal farmacéuticamente aceptable" quiere decir una sal de un compuesto adecuado para formulación farmacéutica.
 Donde un compuesto tiene uno o más grupos básicos, la sal puede ser una sal de adición ácida, tal como un sulfato,
 55 hidrobromuro, tartrato, mesilato, maleato, citrato, fosfato, acetato, pamoato (embonato), hidroyoduro, nitrato,
 clorhidrato, lactato, metilsulfato, fumarato, benzoato, succinato, mesilato, lactobionato, suberato, tosilato y similares.
 Donde un compuesto tiene uno o más grupos ácidos, la sal puede ser una sal tal como una sal de calcio, sal de
 potasio, sal de magnesio, sal de meglumina, sal de amonio, sal de cinc, sal de piperazina, sal de trometamina, sal de
 litio, sal de colina, sal de dietilamina, sal de 4-fenilciclohexilamina, sal de benzatina, sal de sodio, sal de
 60 tetrametilamonio y similares. Formas y solvatos cristalinos polimórficos están también comprendidos dentro del
 alcance de la presente invención.

Compuestos

65 Una realización preferida de compuestos de fórmula (II) está representada por la fórmula (II-a)



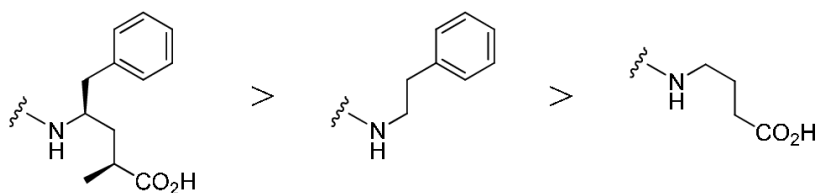
en la que n , R^1 , R^2 y R^3 son como se han definido anteriormente con respecto a la fórmula (II) y R^{4a} es



5 En los compuestos de fórmula (II-a), la subunidad que corresponde a Tup/Tut en las tubulinas que se dan en la naturaleza se ha reducido en tamaño y lipofilidad en al menos dos carbonos, por medio de deleción de los dos átomos de carbono alifáticos que siguen inmediatamente al grupo de ácido carboxílico -es decir, el grupo amino esta ahora α -con respecto al grupo ácido carboxílico, en lugar de estar γ - con respecto a él. En el caso en el que R^4 sea 4-aminofenilalanina, el grupo amina constituye un resto polar que reduce adicionalmente la lipofilidad. Los estudios de SAR muestran que la lipofilidad es un factor importante en la actividad biológica de las tubulinas y sus análogos o derivados. Steinmetz y col. 2004 y Neri y col. 2006 describen ambos que las tubulinas que se dan en la naturaleza más lipófilas -es decir, aquellas que tienen una subunidad Tup (R^A equivale a H en fórmula I) en vez de una subunidad Tut (R^A equivale a OH en fórmula I)- poseen mayor actividad biológica. Adicionalmente, las diferencias en actividades se retuvieron independientemente del tamaño y la lipofilidad del residuo 11-aciloxi (grupo R^C en fórmula (I)) en la subunidad Tuv (Steinmetz y col. 2004). Los presentes resultados indican que una subunidad Tup/Tutlipófila es un elemento de SAR particularmente importante.

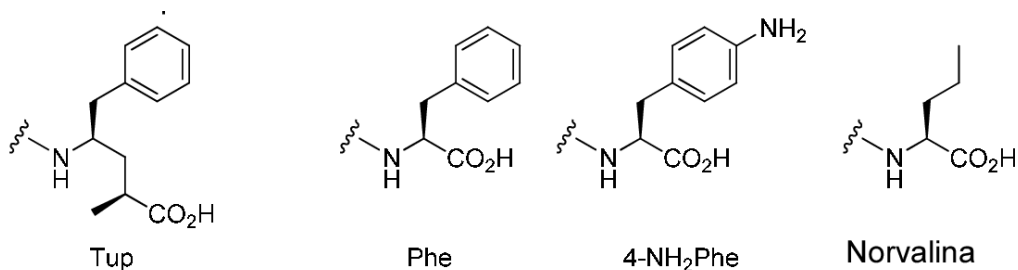
Las observaciones anteriores están parcialmente corroboradas en dos estudios por Balasubramanian y col. En el primero (Balasubramanian y col. 2008), se compararon análogos dimetilados en el carbono alfa para el grupo carboxilo en la subunidad Tup frente a análogos idénticos diferentes desmetilados en la misma posición. Los análogos dimetilados tienen actividad antiproliferativa mayor -aunque las Cl_{50} de inhibición de tubulina *in vitro* fueron comparables- que la que podría esperarse basándose en sus lipofidades relativas. Sin embargo, la presente tendencia no se siguió en el segundo estudio (Balasubramanian y col. 2009), en el que se compararon tres análogos (un carbono α desmetilado, uno monometilado, y uno dimetilado). Allí, el análogo más activo fue el desmetilado mientras que el monometilado -es decir, con la subunidad Tup natural- fue con mucho el menos activo. Sin embargo, el último análogo tenía modificaciones adicionales en otra parte en la molécula volviéndola esencialmente inactiva, haciendo que no esté claro que tales inferencias, si hay alguna, se pueden representar gráficamente.

30 Patterson y col. 2007 y Ellman y col. 2009 compararon las citotoxicidades de tubulicina D y análogos en los que bien solo el fenetilo o bien el grupo γ -carboxi se retuvo en la subunidad Tup. El análogo retenido en fenetilo fue de 3,6 a 13,6 veces menos activo que la tubulicina D frente a tres líneas celulares cancerígenas pero cuando el grupo γ -carboxilo menos lipófilo se retuvo hubo una pérdida de actividad incluso mayor, de 25,7 a 62,5 veces menos activo. Es decir, el orden de actividad fue:

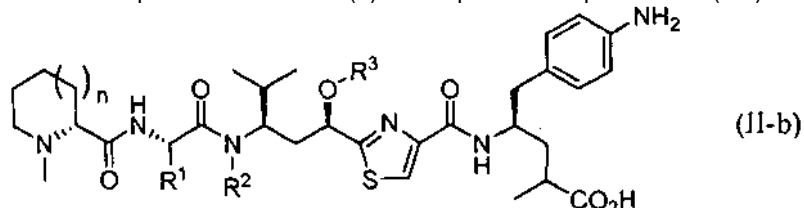


Tubulicina D

35 En documentos anteriores se sugiere individualmente y en combinación, que la lipofilidad en el locus de Tuf es especialmente importante para la actividad biológica de las tubulinas. Por lo tanto, la técnica anterior sugiere que el reemplazo de la subunidad Tup con fenilalanina (Phe), 4-aminofenilalanina (4-NH₂Phe), norvalina u otra subunidad R^4 de acuerdo con la fórmula (II-a) es indeseable, ya que cada una conduciría a la pérdida de al menos dos carbonos alifáticos y a una reducción consiguiente en lipofilidad en el locus de Tup/Tut.

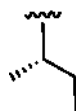


Otra realización preferida de compuestos de fórmula (II) está representada por fórmula (II-b):



5 en la que n, R¹, R², y R³ son según se definen anteriormente con respecto a la fórmula (II). Aunque la fórmula química se puede encontrar en la bibliografía abarcando un grupo -NH₂ en la posición 4 del anillo aromático de Tup (Domling 2005a y 2005b), no ha habido revelación sobre como un compuesto que tiene una característica tal podría fabricarse.

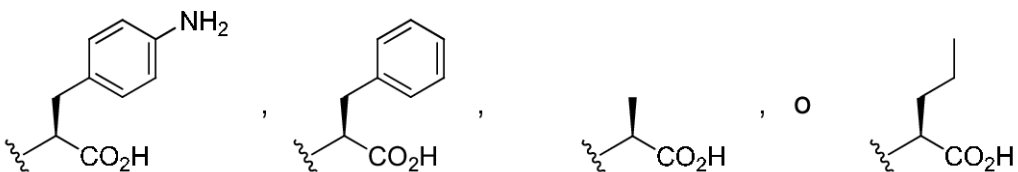
10 I En las fórmulas (II), (II-a) y (II-b), R¹ preferentemente es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, o alquenilo C₂-C₅ y es más preferentemente un residuo de isoleucilo, es decir:



15 En las fórmulas (II), (II-a) y (II-b), R² preferentemente es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, CH₂O(alquilo C₁-C₅), CH₂O(alquenilo C₂-C₅), CH₂O(C=O)(alquilo C₁-C₅), o CH₂OC(=O)(alquenilo C₂-C₅); y más preferentemente es H, Me, Et, n-Pr, CH₂OMe, CH₂OEt, CH₂OC(=O)*i*-Bu, CH₂OC(=O)*n*-Pr, CH₂OC(=O)CH=CH₂, o CH₂OC(=O)Me, con Me, n-Pr, CH₂OMe, CH₂OC(=O)*i*-Bu y CH₂O(*n*-Pr) siendo especialmente preferidos.

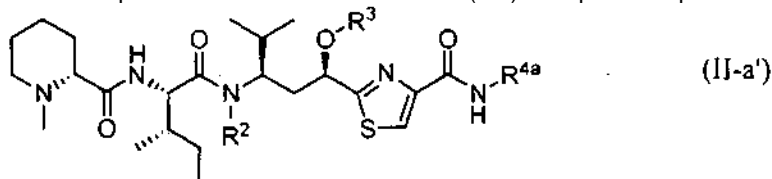
20 En las fórmulas (II), (II-a) y (II-b), R³ preferentemente es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, C(=O)alquilo C₁-C₅, o C(=O)alquenilo C₂-C₅; y más preferentemente es H, Me, Et, o C(=O)Me.

Preferentemente, en las fórmulas (II) y (II-a), R⁴ y R^{4a} son:



25 En las fórmulas (II), (II-a) y (II-b), n es preferentemente 1 y, en el caso de fórmula (II), R⁵ preferentemente es metilo; es decir, el anillo en la subunidad Mep preferentemente es una N-metilpiperidinilona.

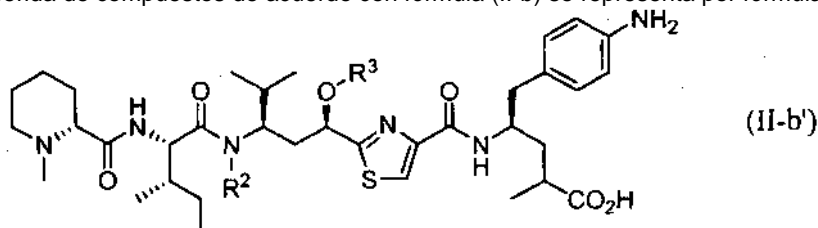
Una realización preferida de compuestos de acuerdo con fórmula (II-a) se representa por fórmula (II-a')



30 donde R^{4a} es según se define anteriormente con respecto a la fórmula (II-a), R² es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, CH₂O(alquilo C₁-C₅), CH₂O(alquenilo C₂-C₅), CH₂O(C=O)(alquilo C₁-C₅), o CH₂OC(=O)(alquenilo C₂-C₅); y R³ es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, C(=O)alquilo C₁-C₅, o C(=O)alquenilo C₂-C₅. preferentemente, R² es H, Me, Et, CH₂OMe, CH₂OEt, CH₂OC(=O)*i*-Bu, CH₂OC(=O)*n*-Pr, CH₂OC(=O)CH=CH₂, o CH₂OC(=O)Me; más preferentemente Me, n-Pr, CH₂OMe, CH₂OC(=O)*i*-Bu o CH₂O(*n*-Pr). Preferentemente, R³ es H, Me, Et, o C(=O)Me.

35

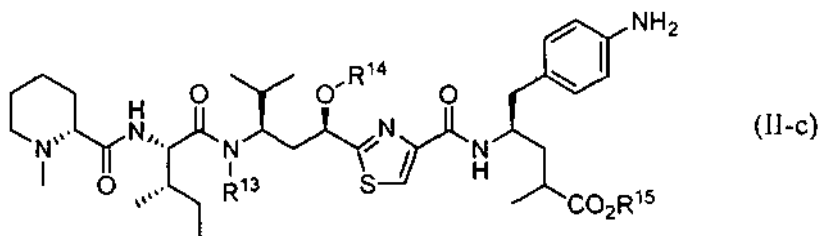
Una realización preferida de compuestos de acuerdo con fórmula (II-b) se representa por fórmula (II-b')



5 donde R² es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, CH₂O(alquilo C₁-C₅), CH₂O(alquenilo C₂-C₅), CH₂O(C=O)(alquilo C₁-C₅), o CH₂OC(=O)(alquenilo C₂-C₅); y R³ es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, C(=O)alquilo C₁-C₅, o C(=O)alquenilo C₂-C₅. preferentemente, R² es H, Me, Et, CH₂OMe, CH₂OEt, CH₂OC(=O)*i*-Bu, CH₂OC(=O)*n*-Pr, CH₂OC(=O)CH=CH₂, o CH₂OC(=O)Me y R³ es H, Me, Et, o C(=O)Me.

10 Donde un grupo carboxilo en R⁴ está esterificado, preferentemente el éster es un éster de alquilo C₁-C₅, tal como un éster de Me, Et, o Pr. Alternativamente, el grupo carboxilo se puede amidar con amoniaco o con una alquilamina.

En otra realización, esta invención proporciona un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (II-c)

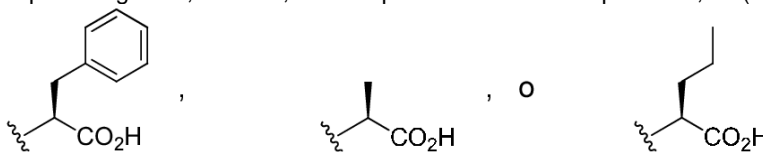


15 donde R¹³ es Me, *n*-Pr, CH₂OMe, o CH₂OC(=O)CH₂CH(Me)₂; R¹⁴ es Me o C(=O)Me; y R¹⁵ es H o alquilo C₁-C₅ (preferentemente H, Me o Et).

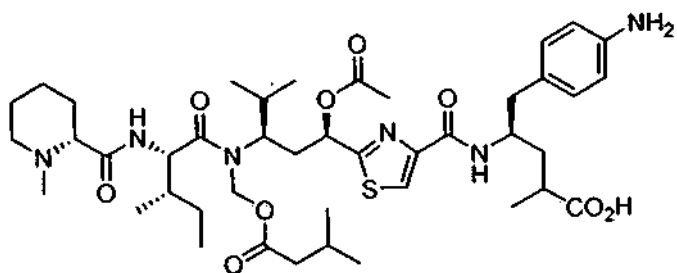
En las fórmulas (II-b), (II-b') y (II-c) la estereoquímica en el metilo en la posición alfa con respecto al carboxilo preferentemente es aquella correspondiente a las tubulisininas que se dan en la naturaleza, es decir:



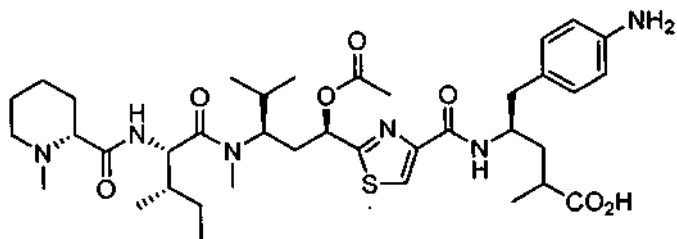
25 En una realización preferida, un compuesto de esta invención está en la forma de una amida del grupo carboxilo en R⁴ (o R^{4a}, como puede ser el caso) con el grupo α-amino de un α-aminoácido. El α-aminoácido se puede seleccionar del grupo constituido por un aminoácido proteínogénico, 4-aminofenilalanina, norvalina, norleucina y citrulina. Preferentemente, el α-aminoácido está seleccionado del grupo constituido por alanina, norvalina, glicina, lisina, arginina, citrulina, norleucina, 4-aminofenilalanina y fenilalanina. También preferentemente, la configuración absoluta del α-aminoácido es la proteínogénica, es decir, L. En la presente realización preferida, R⁴ (o R^{4a}) preferentemente es:



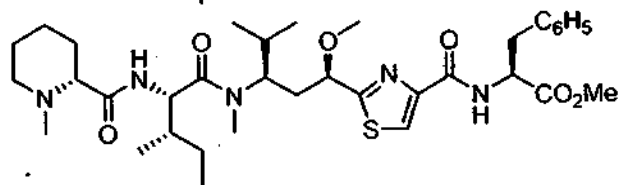
30 Ejemplos específicos de compuestos de la presente invención de acuerdo con la fórmula (II) incluyen compuestos (III-a) hasta (III-y). Algunos de los compuestos se representan como un éster farmacéuticamente aceptable o una amida farmacéuticamente aceptable del grupo carboxilo R⁴ con el grupo α-amino de un α-aminoácido o éster metílico de los mismos.



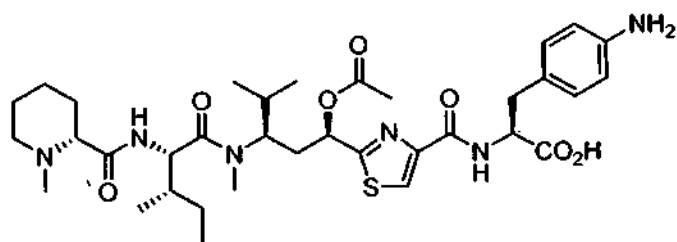
(III-a)



(III-b)

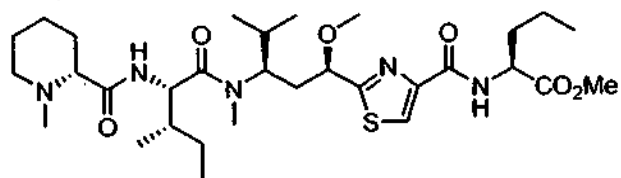


(III-c)

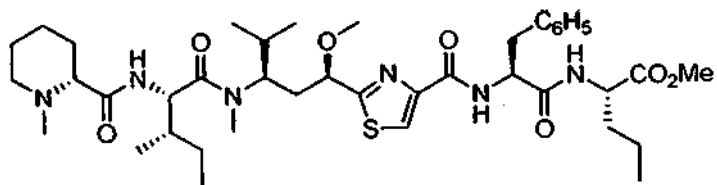


(III-d)

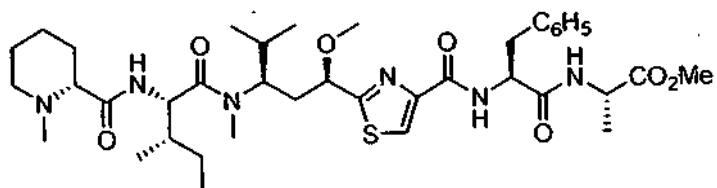
5



(III-e)

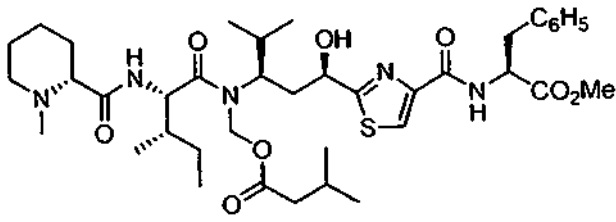


(III-f)

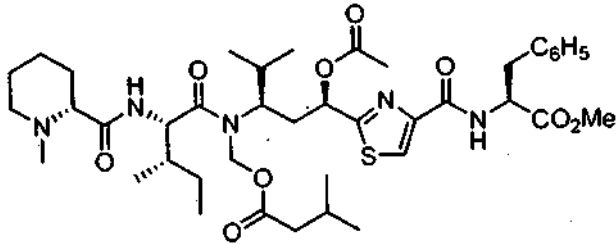


(III-g)

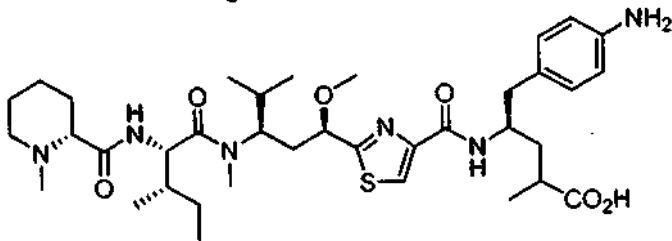
10



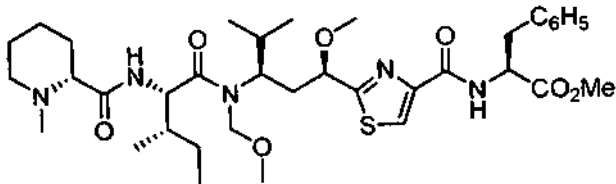
(III-h) ,



(III-i) ,

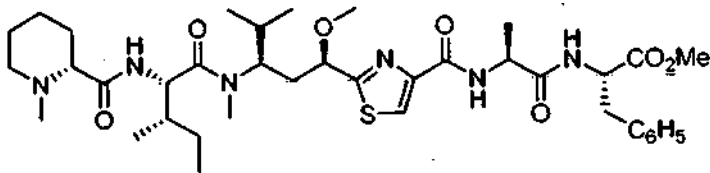


(III-j) ,

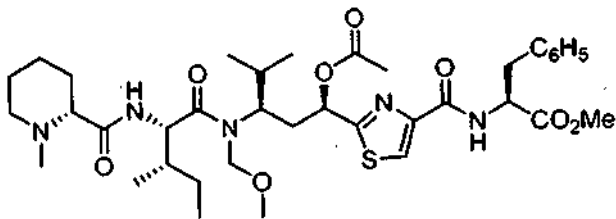


(III-k) ,

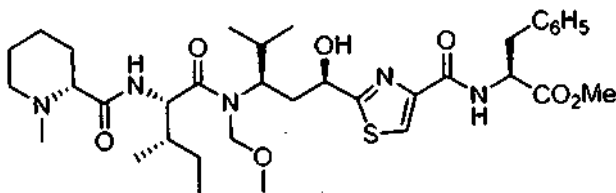
5



(III-l) ,

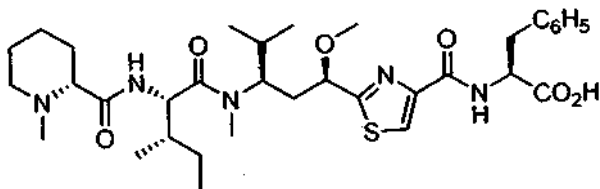


(III-m) ,

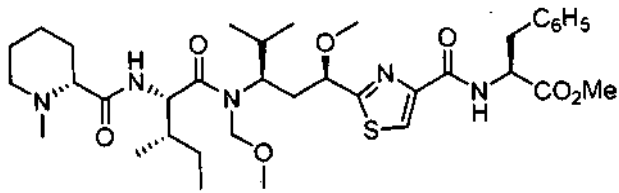


(III-n) ,

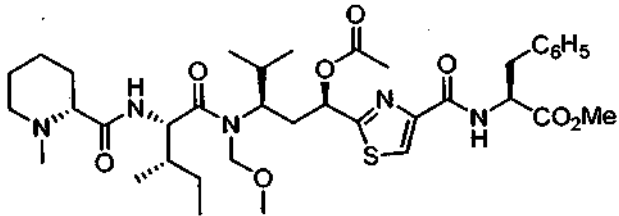
10



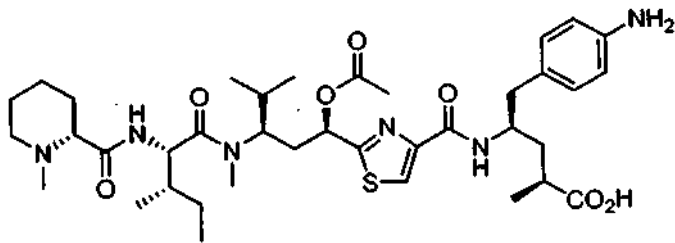
(III-o) ,



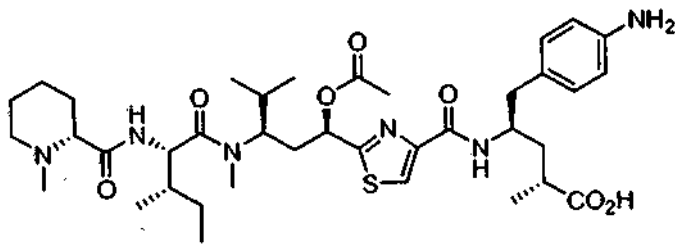
(III-p) ,



(III-q) ,

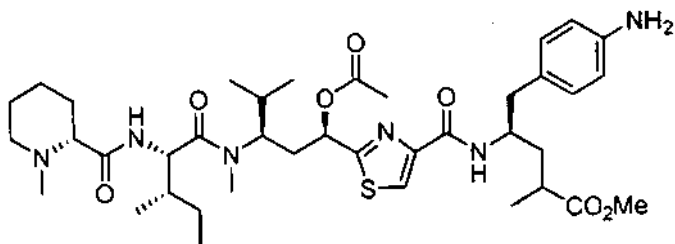


(III-r) ,

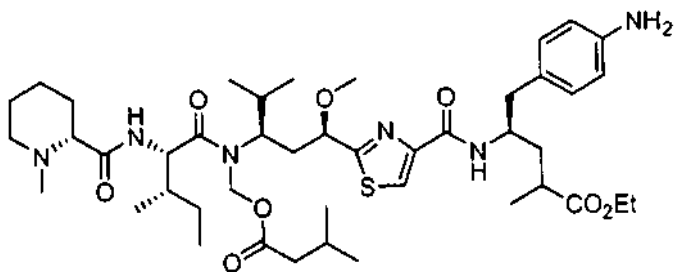


(III-s) ,

5

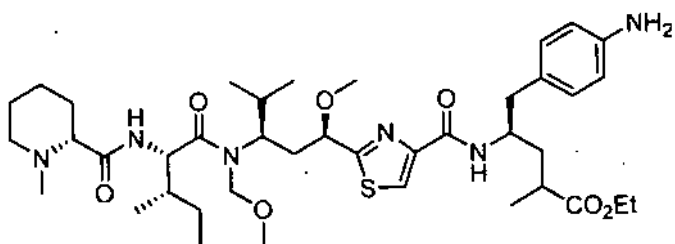


(III-t) ,

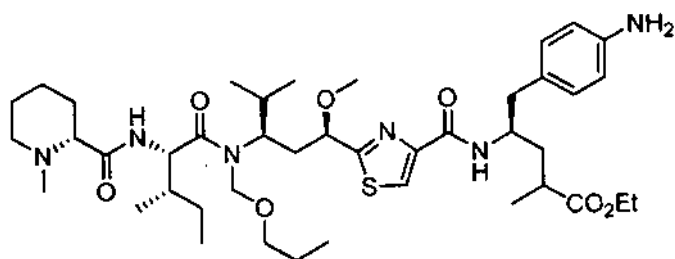


(III-u) ,

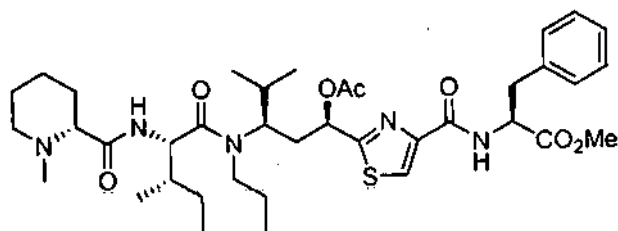
10



(III-v) ,

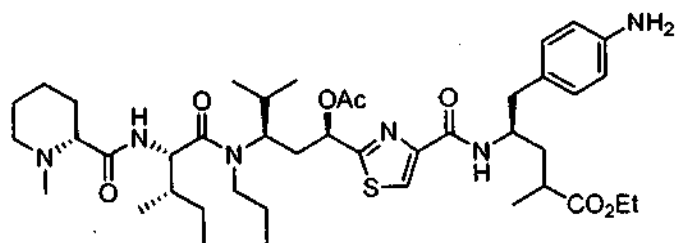


(III-w) ,



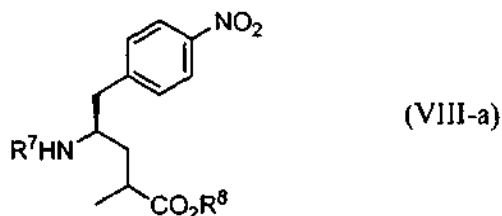
(III-x) ,

y



(III-y) .

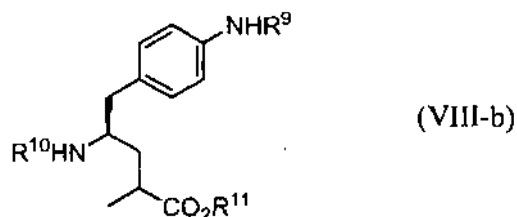
- 5 La presente invención proporciona también intermedios novedosos que pueden utilizarse para la síntesis de compuestos de la presente invención. Se pueden usar compuestos de acuerdo con la fórmula (VIII-a) para la fabricación de compuestos de acuerdo con la fórmula (II) o (II-b), como se enseña en las figuras y ejemplos en el presente documento:



(VIII-a)

- 10 En fórmula (VIII-a), R^7 es H o un grupo protector de amina y R^8 es H, alquilo C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , arilo, cicloalifático, alquilocicloalifático, arilalquilo, o alquilarilo. Preferentemente, R^7 es H, Boc (*t*-butoxicarbonilo), Troc (2,2,2-tricloroetoxicarbonilo), Bpoc ((1-metil-1-(4-bifenil)etoxicarbonilo)), Cbz (benciloxicarbonilo), Alloc (aliloxicarbonilo), metilamina, o Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Preferentemente, R^8 es H o alquilo C_1-C_5 (especialmente Me).

- 15 Otro intermedio novedoso útil para síntesis de compuestos de la presente invención tiene una estructura de acuerdo con fórmula (VIII-b). El uso de compuestos de fórmula (VIII-b) para fabricar compuestos de la presente invención se enseña en las figuras y ejemplos en el presente documento.



(VIII-b)

- 20 En fórmula (VIII-b), R^9 y R^{10} son independientemente H o un grupo protector de amina y R^{11} es H, alquilo C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , arilo, cicloalifático, alquilocicloalifático, arilalquilo, o alquilarilo. Preferentemente, R^9 y R^{10} están independientemente seleccionados de H, Boc, Troc, Bpoc, Cbz, Alloc, metilamina, y Fmoc. Preferentemente, R^{11} es H o alquilo C_1-C_5 (especialmente Me). Preferentemente, donde R^9 y R^{10} son cada uno un grupo protector de

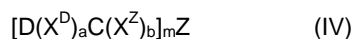
- 25

amina, hay diferentes grupos protectores de amina.

Se describen grupos protectores de amina adecuados adicionales para los compuestos de fórmula (VIII-a) y (VIII-b) en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, páginas 464-653 (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999).

CONJUGADOS

En otro aspecto, se proporciona un conjugado que comprende compuesto citotóxico de acuerdo con la presente invención y un ligando, representado por fórmula (IV)



donde Z es ligando; D es un compuesto citotóxico de acuerdo con la presente invención; y $-(X^D)_aC(X^Z)_b-$ se refieren colectivamente como un "resto de engarce" o "engarce" debido a que unen Z y D. Dentro del engarce, C es un grupo escindible diseñado para escindirse en el sitio de acción biológica deseada de compuesto D; X^D y X^Z se refieren como restos espaciadores (o "espaciadores") debido a que ellos espacian aparte D y C y C y Z, respectivamente; los subíndices a y b son independientemente 0 o 1 (es decir, la presencia de X^D y/o X^Z es opcional); y el subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 (preferentemente 1, 2, 3, o 4). D, X^D , C, X^Z y Z se definen más plenamente más adelante.

Ligando Z – por ejemplo un anticuerpo – sirve para una función de marcar como diana. Uniéndose a un tejido o célula diana donde está localizado su antígeno o receptor, el ligando Z dirige el conjugado allí. Preferentemente, el tejido diana o la célula diana es un tejido canceroso o una célula cancerosa y el antígeno o receptor es un antígeno asociado a tumor, es decir, un antígeno que se expresa únicamente por células cancerosas o que se sobreexpresa por células de cáncer, comparadas con células no cancerosas. La escisión del grupo C en el tejido o célula diana libera compuesto D para ejercer localmente su efecto citotóxico. En algunos casos, el conjugado se internaliza dentro de una célula diana por endocitosis y la escisión tiene lugar dentro de la célula diana. De esta manera, la administración precisa del compuesto D se logra en el sitio de acción deseado, reduciendo la dosificación necesitada. Además, el compuesto D está normalmente biológicamente inactivo (o es significativamente menos activo) en su estado conjugado, reduciendo de este modo la toxicidad indeseada contra tejidos o células que no son dianas. Como los fármacos anticancerígenos son a menudo altamente tóxicos para las células en general, ésta es una importante consideración.

Como se refleja por el subíndice m, cada molécula de ligando Z puede conjugarse con un compuesto D, dependiendo del número de sitios D que tenga disponibles para conjugación y de las condiciones experimentales empleadas. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que, mientras que cada molécula individual de ligando Z está conjugada a un número entero de compuestos D, una preparación del conjugado puede analizarse para una proporción no entera de compuestos D frente a ligando Z, reflejando un promedio estadístico.

Ligando Z y Conjugación del Mismo

Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo. Por conveniencia y brevedad y no por limitación, la discusión subsiguiente en el presente documento sobre la conjugación del ligando Z está escrita en el contexto de que el ligando es un anticuerpo. Por la misma razón, la discusión detallada más adelante se escribe sobre todo en términos de proporción 1:1 de anticuerpo Z a compuesto D.

Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo contra un antígeno asociado a tumor, permitiendo un conjugado que comprende a un ligando Z tal marcar selectivamente células cancerosas. Ejemplos de tales antígenos incluyen: mesotelina, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H4 (también conocido como O8E), proteína tirosina quinasa 7 (PTK7), RG1, CTLA-4 y CD44. El anticuerpo puede ser animal (por ejemplo, murino), quimérico, humanizado, o, preferentemente, humano. El anticuerpo preferentemente es monoclonal, especialmente un anticuerpo monoclonal humano. La preparación de anticuerpos monoclonales humanos contra algunos de los antígenos anteriormente mencionados se revela en Korman y col., US 2009/0074660 A1 (B7H4); Rao-Naik y col., US 2009/01423490 A1 A2 (CD19); King y col., WO 2008/070569 A2 (CD22); Keler y col., US 7.387.776 B2 (2008) (CD30); Terrett y col., US 2009/0028872 A1 (CD70); Korman y col., US 6.984.720 B1 (2006) (CTLA-4); Korman y col., US 2009/0217401 A1 (PD-1); Huang y col., US 2008/0279868 A1 (PSMA); Lu y col., US 2010/0034826 A1 (PTK7); Harkins y col., US 7.335.748 B2(2008) (RG1); Terrett y col., WO 2009/045957 A1 (mesotelina); y Xu y col., US 2010/0092484 A1 (CD44).

El ligando Z puede ser también un fragmento de anticuerpo o un mimetizador de anticuerpos, tal como un affibody, un anticuerpo de dominio (dAb), un nanocuerpo, un unibody, a DARPin, una anticalina, un versabody, una duocalina, una lipocalina, o un avímero.

Pueden usarse grupos sulfhidrilo en el ligando Z como un sitio de conjugación, incluyendo grupos ε-amino en residuos de lisina, restos de carbohidratos pendientes, grupos de ácidos carboxílicos, grupos disulfuro, y grupos tiol. Cada tipo de grupo reactivo representa una solución de compromiso, teniendo algunas ventajas y algunas desventajas. Para revisiones en grupos reactivos de anticuerpos adecuados para conjugación, véase, por ejemplo Garnett, *Adv. Drug*

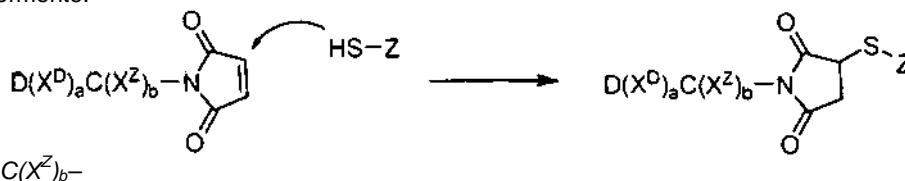
Delivery Rev. 53 (2001), 171-216 y Dubowchik y Walker, *Pharmacology & Therapeutics* 83 (1999), 67-123.

En aún otra realización, el anticuerpo Z puede estar conjugado por medio de un grupo disulfuro que forma un puente con un resto de cisteína en el anticuerpo Z y un azufre en la otra parte del conjugado. Algunos anticuerpos carecen de tiol libre (sulfhidrilo) pero tienen grupos disulfuro, por ejemplo en la región de bisagra. En tal caso, se pueden generar grupos tiol libres por reducción de grupos disulfuro nativos. Los grupos tiol así generados pueden usarse después para conjugación. Véanse, por ejemplo, Packard y col., *Biochemistry* **1986**, 25, 3548-3552; King y col., *Cancer Res.* 54, 6176-6185 (1994); y Doronina y col., *Nature Biotechnol.* 21(7), 778-784 (2003). De nuevo, hay asuntos respecto a la localización de sitio de conjugación y estequiometría y el posible rompimiento de la conformación nativa del anticuerpo.

Se conoce un número de procedimientos para introducir grupos de tiol libres en anticuerpos sin romper enlaces disulfuro nativos, procedimientos que se pueden practicar con un ligando Z de la presente invención. Dependiendo del procedimiento empleado, puede ser posible introducir un número predecible de sulfhidrilos libres en localizaciones predeterminadas. En una aproximación, se prepararon anticuerpos mutados en los que una cisteína está sustituida por otro aminoácido. Véanse, por ejemplo, Eigenbrot y col., US 2007/0092940 A1; Chilkoiti y col., *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 504-507; Urnovitz y col., US 4.698.420 (1987); Stimmel y col., *J. Biol. Chem.*, 275 (39), 30445-30450 (2000); Bam y col., US 7.311.902 B2 (2007); Kuan y col., *J. Biol. Chem.*, 269 (10), 7610-7618 (1994); Poon y col., *J. Biol. Chem.*, 270 (15), 8571-8577 (1995). En otra aproximación, se añadió una cisteína extra al extremo C-terminal. Véase, por ejemplo Cumber y col., *J. Immunol.*, 149, 120-126 (1992); King y col., *Cancer Res.*, 54, 6176-6185 (1994); Li y col., *Bioconjugate Chem.*, 13, 985-995 (2002); Yang y col., *Protein Engineering*, 16, 761-770 (2003); y Olafson y col., *Protein Engineering Design & Selection*, 17, 21-27 (2004). Un procedimiento preferido para introducir cisteínas libres se enseña por Liu y col., WO 2009/026274 A1, en el que una secuencia de aminoácidos que lleva cisteína se añade al extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo. El presente procedimiento introduce un número conocido de residuos de cisteína (uno por cadena pesada) en una localización conocida alejada del sitio de unión a antígenos.

En aún otra realización, los grupos ϵ -amino se pueden modificar con reactivos heterobifuncionales tales como 2-iminotiolano o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), convirtiendo un grupo ϵ -amino en un grupo tiol o disulfuro – creando un sustituto de cisteína, por así decirlo. Sin embargo, el presente procedimiento sufre de la misma localización de conjugación y limitaciones de estequiometría asociadas con grupos ϵ -amino apropiados.

En aún otra realización preferida, el ligando Z está conjugado por medio del producto de adición nucleófila de un grupo tiol a un resto aceptor. Un resto aceptor preferido es un grupo maleimida, cuya reacción con un grupo tiol de un anticuerpo está genéricamente ilustrada más abajo. El grupo tiol puede ser un nativo, o uno introducido como se describe anteriormente.



Engarce $-(X^D)_aC(X^Z)_b-$

Como se destaca anteriormente, la parte de engarce de un conjugado de la presente invención comprende hasta tres elementos: un grupo C escindible y espaciadores opcionales X^Z y X^D .

El grupo escindible C es un grupo escindible en condiciones fisiológicas, preferentemente está seleccionado de tal forma que sea relativamente estable mientras que el conjugado está en la circulación general en el plasma sanguíneo, pero se escinde fácilmente una vez que el conjugado alcanza su sitio de acción deseado, es decir, cerca, en, o dentro de la célula diana. Preferentemente, el conjugado se internaliza por endocitosis por una célula diana tras la unión del anticuerpo Z a un antígeno presentado en la superficie de la célula. Subsiguientemente, la escisión del grupo C tiene lugar en un cuerpo vesicular de la célula diana (un endosoma temprano, un endosoma tardío, o, especialmente, un lisosoma).

En una realización, el grupo C es un grupo sensible a pH. El pH en plasma sanguíneo está ligeramente por encima del neutral, mientras que el pH dentro de un lisosoma es ácido, de alrededor de 5. Así, un grupo C cuya escisión está catalizada por ácido se escindirán a una velocidad varios órdenes de magnitud más rápido dentro de un lisosoma que a la velocidad en plasma sanguíneo. Ejemplos de grupos sensibles a ácidos adecuados incluyen cis-aconitil-amidas e hidrazonas, como se describe en Shen y col., US 4.631.190 (1986); Shen y col., US 5.144.011 (1992); Shen y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1048-1054 (1981) y Yang y col., *Proc. Natl Acad. Sci (USA)*, 85, 1189-1193 (1988).

En otra realización, el grupo C es un disulfuro. Los disulfuros se pueden escindir por un mecanismo de intercambio, a una velocidad dependiente de la concentración de tiol en el ambiente. Como la concentración intracelular de glutatión y otros tioles es más alta que sus concentraciones de suero, la velocidad de escisión de un disulfuro será más alta intracelularmente. Adicionalmente, la velocidad de intercambio de tiol-disulfuro puede modularse por ajuste de las características estéricas y electrónicas del disulfuro (por ejemplo, un disulfuro aril-aquilo frente a un disulfuro

alquil-alquilo; sustitución del anillo arilo, etc.) permitiendo el diseño de vínculos disulfuro que han potenciado la estabilidad sérica de una velocidad de escisión particular. Para revelaciones adicionales relativas a grupos escindibles disulfuro en conjugados, véanse, por ejemplo, Thorpe y col., *Cancer Res.* 48, 6396-6403 (1988); Santi y col., US 2005/0287155 A1; Ng y col., US 6.989.452 B2 (2006); Ng y col., WO 2002/096910 A1; Boyd y col., US 7.691.962 B2; y Sufi y col., WO 2008/083312 A2.

Un grupo C preferido comprende un enlace peptídico que se escinde, de preferencia por una proteasa, en el sitio deseado de acción, como opuesto a por una proteasa en el suero. Normalmente, el grupo C comprende desde 1 hasta 20 aminoácidos, preferentemente desde 1 hasta 6 aminoácidos, más preferentemente desde 1 hasta 3 aminoácidos. El/los aminoácido(s) pueden ser α -aminoácidos naturales y/o no naturales. Los aminoácidos naturales con aquellos codificados por el código genético, así como aminoácidos derivados de ahí, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, citrulina y O-fosfoserina. El término aminoácido también incluye análogos de aminoácidos y mimetizadores de aminoácidos. Los análogos son compuestos que tienen la misma estructura de $H_2N(R)CHCO_2H$ general de un aminoácido natural, salvo porque el grupo R no es uno encontrado entre los aminoácidos naturales. Los ejemplos de análogos incluyen homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido, y metilsulfonio de metionina. Un imitador de aminoácidos es un compuesto que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un α -aminoácido pero que funciona en una manera similar a uno. El término "aminoácido no natural" se desea para representar la forma estereoquímica "D", siendo los aminoácidos naturales de la forma "L".

Preferentemente, el grupo C contiene una secuencia aminoacídica que es una secuencia de reconocimiento de escisión para una proteasa. Se conocen en la técnica muchas secuencias de reconocimiento de escisión. Véanse, por ejemplo, Matayoshi y col. *Science* 247: 954 (1990); Dunn y col. *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah y col. *Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber y col. *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith y col. *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); y Bouvier y col. *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995).

Para conjugados que no se desee que sean internalizados por una célula, se puede elegir un grupo C tal que se escinda por una proteasa presente en la matriz extracelular en la vecindad de un tejido diana, por ejemplo, una proteasa liberada por células cercanas a la muerte o una proteasa asociada a tumor. Las proteasas asociadas a tumores extracelulares ejemplares son metaloproteasas de matriz (MMP), oligopeptidasa thimet (TOP) y CD10.

Para conjugados que están diseñados para internalizarse por una célula, el grupo C preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada para escisión por una proteasa endosomal o lisosomal, especialmente la última. Ejemplos no limitantes de tales proteasas incluyen catepsinas B, C, D, H, L y S, especialmente catepsina B. La catepsina B de preferencia escinde péptidos en una secuencia $-AA^2-AA^1-$ donde AA^1 es un aminoácido básico o fuertemente formador de puentes de hidrógeno (tales como lisina, arginina, o citrulina) y AA^2 es un aminoácido hidrófobo (tal como fenilalanina, valina, alanina, leucina, o isoleucina), por ejemplo Val-Cit (donde Cit designa citrulina) o Val-Lys. (En el presente documento, las secuencias de aminoácidos se escriben en la dirección N-a-C, como en $H_2N-AA^2-AA^1-CO_2H$, a menos que el contexto claramente indique otra cosa). Para información adicional con respecto a grupos escindibles por catepsina, véanse Dubowchik y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 3341-3346 (1998); Dubowchik y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 3347-3352 (1998); y Dubowchik y col., *Bioconjugate Chem.* 13, 855-869 (2002). Otra enzima que se pueden utilizar para escindir engarces peptídicos es la legumaina, una proteasa de cisteína lisosomal que se escinde de preferencia en Ala-Ala-Asn.

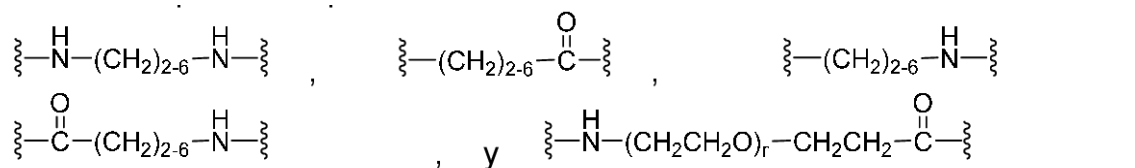
En una realización, el Grupo C es un péptido que comprende la secuencia de dos aminoácidos $-AA^2-AA^1-$ en la que AA^1 es lisina, arginina, o citrulina y AA^2 es fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina. En otra realización, C consta de una secuencia de uno a cinco aminoácidos, seleccionados del grupo constituido por Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser y Glu.

La preparación y el diseño de grupos C escindibles constituidos por un aminoácido individual se describe en Chen y col., US 2010/0113476 A1.

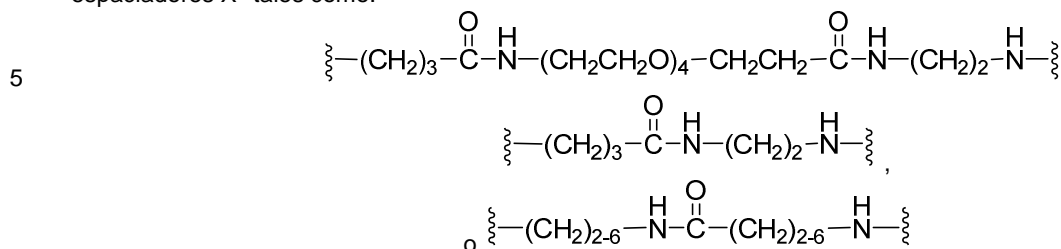
El Grupo C puede ser también un grupo fotoescindible, por ejemplo un éter nitrobenzílico que se escinde tras exposición a la luz.

El Grupo C puede estar unido directamente a anticuerpo Z o a compuesto D; es decir, los espaciadores X^Z y X^D , como puede ser el caso, están ausentes. Por ejemplo, si el grupo C es un disulfuro, uno de los dos azufres puede ser un residuo de cisteína o su sustituto en anticuerpo Z. O, el grupo C puede ser una hidrazona unida a un aldehído en una cadena lateral de carbohidratos del anticuerpo. En una realización preferida, el compuesto D está unido directamente al grupo C por medio de un enlace peptídico a un grupo carboxílico o a un grupo amina en el compuesto D.

Cuando está presente, el espaciador X^Z proporciona separación espacial entre grupo C y anticuerpo Z, para que el primero no interfiera estéricamente con la unión a antígeno por el segundo o para que el segundo no interfiera estéricamente con la escisión del primero. Adicionalmente, el espaciador X^Z se puede usar para conferir solubilidad incrementada o propiedades de agregación disminuidas a los conjugados. Un espaciador X^Z puede comprender uno o más segmentos modulares, que se pueden ensamblar en cualquier número de combinaciones. Ejemplos de segmentos adecuados para un espaciador X^Z son:



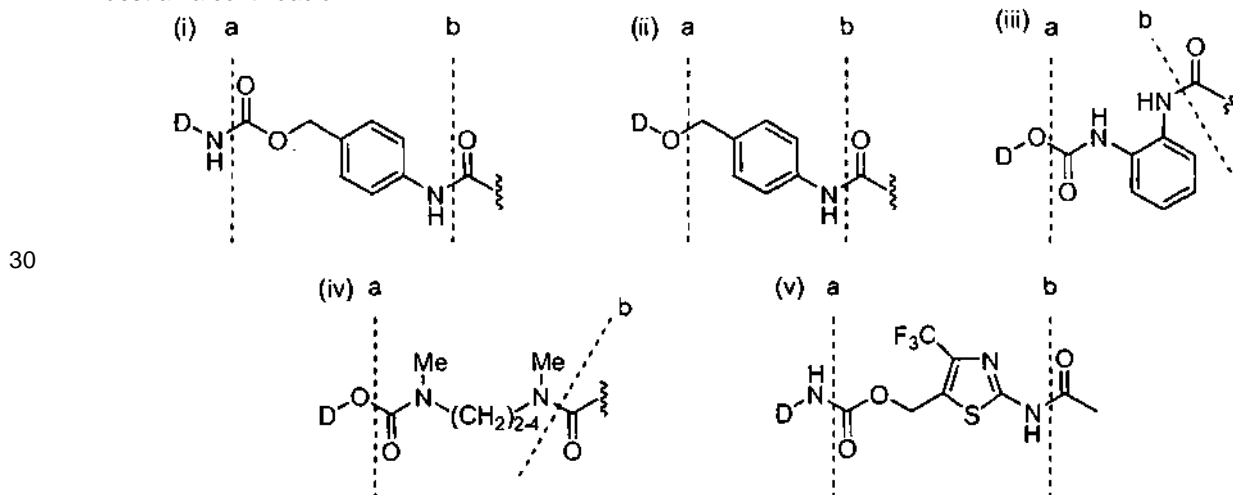
en la que el subíndice r es 1 a 24, preferentemente 2 a 4. Los presentes segmentos se pueden combinar para fabricar espaciadores X^Z tales como:



10 El espaciador X^D, si está presente, proporciona separación espacial entre grupo C y compuesto D, para que el último no interfiera estéricamente o electrónicamente con la escisión del primero. El espaciador X^D también puede servir para introducir masa molecular adicional y funcionalidad química en un conjugado. Generalmente, la masa y la funcionalidad adicionales afectarán a la semivida sérica y a otras propiedades del conjugado. Así, por selección juiciosa de grupos espaciadores, la semivida sérica de un conjugado se puede modular. El espaciador X^D también puede ensamblarse a partir de segmentos modulares, como se describe anteriormente en el contexto del espaciador X^Z.

15 Bien el espaciador X^Z o bien el X^D, o bien ambos, pueden comprender un resto autoinmolador. Un resto autoinmolador es un resto que (1) está unido al grupo C y bien al anticuerpo Z o bien a la citotoxina D y (2) tiene una estructura tal que la escisión a partir del grupo C inicia una secuencia de reacciones que da como resultado que el resto autoinmolador rompa los enlaces de sí mismo a partir del anticuerpo Z o a partir de la citotoxina D, como puede ser el caso. En otras palabras, una reacción en un sitio distal de anticuerpo Z o de citotoxina D (escindible de grupo C) causa que se rompan igual el enlace X^Z-Z o el enlace X^D-D. La presencia de un resto autoinmolador es deseable en el caso del espaciador X^D porque, si, después de escisión del conjugado, el espaciador X^D o una parte del mismo estuvieron permaneciendo unidos a la citotoxina D, la actividad biológica del último puede estar dañada. El uso de un resto autoinmolador es especialmente deseable donde el grupo escindible C es un polipéptido.

20 Restos autoinmoladores ejemplares (i)-(v) unidos a un grupo hidroxilo o amino en una molécula D compañera se muestran a continuación:



35 El resto autoinmolador es la estructura entre líneas discontinuas a y b, con características estructurales adyacentes mostradas para proporcionar contexto. Los restos autoinmoladores (i) y (v) están unidos a un compuesto D-NH₂ (es decir, el compuesto D está conjugado por medio de un grupo amino), mientras que los restos autoinmoladores (ii), (iii), y (iv) están unidos a un compuesto D-OH (es decir, el compuesto D está conjugado por medio de un grupo hidroxilo o carboxilo). La escisión del enlace amida en la línea discontinua b libera el nitrógeno de amida como un nitrógeno de amina, iniciando una secuencia de reacciones que da como resultado la escisión del enlace en la línea discontinua a y la liberación consecuente de D-OH o D-NH₂, como puede ser el caso. Para discusiones adicionales con respecto a

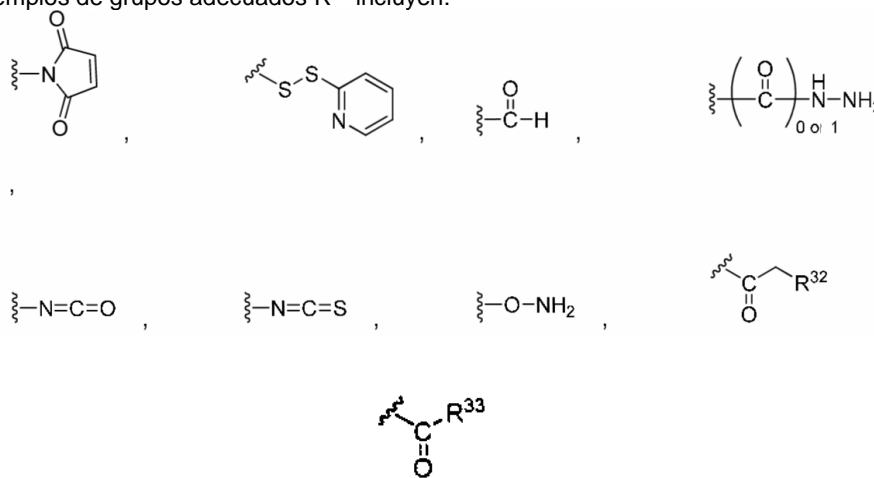
restos autoinmoladores, véanse Carl y col., *J. Med. Chem.*, 24 (3), 479-480 (1981); Carl y col., WO 81/01145 (1981); Dubowchik y col., *Pharmacology & Therapeutics*, 83, 67-123 (1999); Firestone y col., US 6.214.345 B1 (2001); Toki y col., *J. Org. Chem.* 67, 1866-1872 (2002); Doronina y col., *Nature Biotechnology* 21 (7), 778-784 (2003) (*erratum*, p. 941); Boyd y col., US 7.691.962 B2; Boyd y col., US 2008/0279868 A1; Sufi y col., WO 2008/083312 A2; Feng, US 7.375.078 B2; y Senter y col., US 2003/0096743 A1;

Compuesto D - Composiciones de Engarce

Los conjugados de la presente invención se preparan preferentemente uniendo primero un compuesto D y engarce $(X^D)_aC(X^Z)_b$ para formar una composición de engarce a fármacos representada por fórmula (V-a):



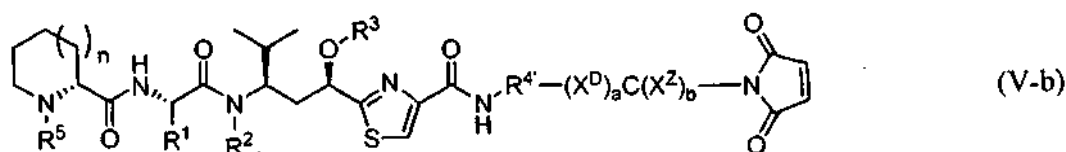
donde R^{31} es un grupo funcional adecuado para hacerlo reaccionar con un grupo funcional en anticuerpo Z para formar el conjugado. Ejemplos de grupos adecuados R^{31} incluyen:



y

donde R^{32} es Cl, Br, F, mesilato, o tosilato y R^{33} es Cl, Br, I, F, OH, -O-N-succinimido, -O-(4-nitrofenilo), -O-pentafluorofenilo o -O-tetrafluorofenilo. La química generalmente usable para la preparación de restos adecuados $D-(X^D)_aC(X^Z)_b-R^{31}$ se revela en Ng y col., US 7.087.600 B2 (2006); Ng y col., US 6.989.452 B2 (2006); Ng y col., US 7.129.261 B2 (2006); Ng y col., WO 02/096910 A1; Boyd y col., US 7.691.962 B2; Chen y col., US 2006/0004081 A1; Gangwar y col., US 2006/0247295 A1; Boyd y col., US 2008/0279868 A1; Gangwar y col., US 2008/0281102 A1; Gangwar y col., US 2008/0293800 A1; Sufi y col., WO 2008/083312 A2; y Chen y col., US 2010/0113476 A1.

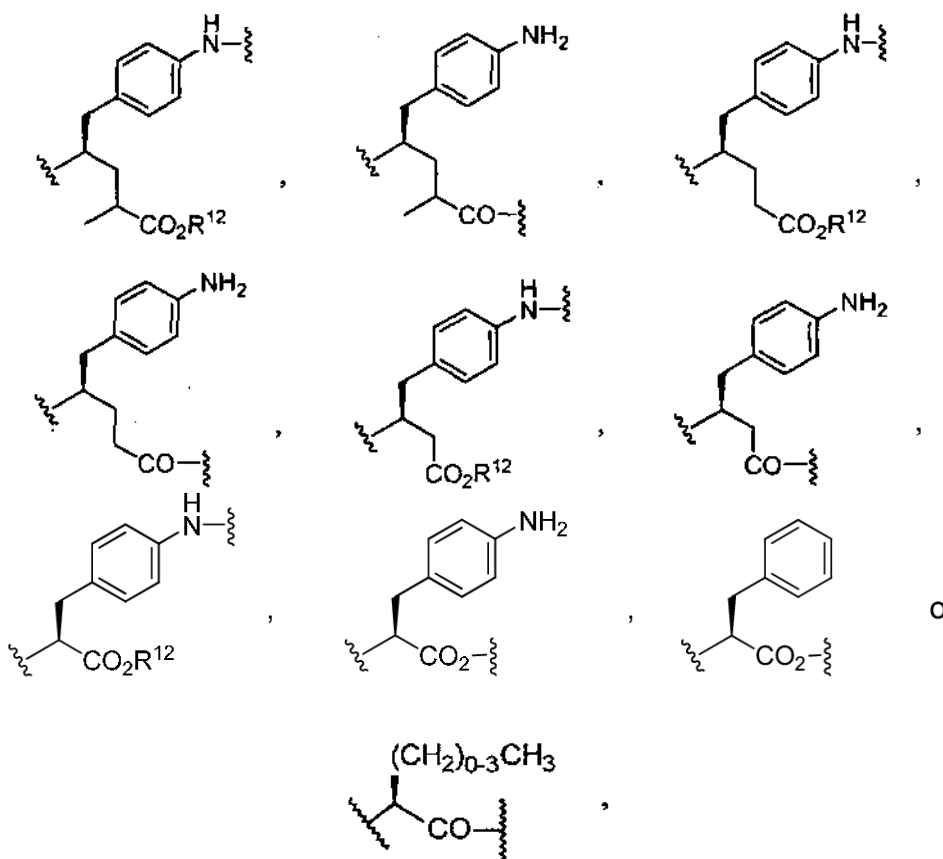
En una realización preferida, R^{31} es un grupo maleimida y la molécula de compuesto-engarce citotóxica puede estar representada por fórmula (V-b):



en los que

n es 0, 1 o 2;
 R^1 , R^2 y R^3 son independientemente H, alquilo C_1-C_{10} sin sustituir o sustituido, alqueno C_2-C_{10} sin sustituir o sustituido, alquino C_2-C_{10} sin sustituir o sustituido, arilo sin sustituir o sustituido, heteroarilo sin sustituir o sustituido, $(CH_2)_{1-2}O$ (alquilo C_1-C_{10}) sin sustituir o sustituido, $(CH_2)_{1-2}O$ (alqueno C_2-C_{10}) sin sustituir o sustituido, $(CH_2)_{1-2}O$ (alquino C_2-C_{10}) sin sustituir o sustituido, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)$ (alquilo C_1-C_{10}) sin sustituir o sustituido, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)$ (alqueno C_2-C_{10}) sin sustituir o sustituido, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)$ (alquino C_2-C_{10}) sin sustituir o sustituido, $C(=O)$ (alquilo C_1-C_{10}) sin sustituir o sustituido, $C(=O)$ (alqueno C_2-C_{10}) sin sustituir o sustituido, $C(=O)$ (alquino C_2-C_{10}) sin sustituir o sustituido, cicloalifático sin sustituir o sustituido, heterocicloalifático sin sustituir o sustituido, arilalquilo sin sustituir o sustituido o alquilarilo sin sustituir o sustituido;

R^4 es



5

en la que R^{12} es H, alquilo C_1-C_5 , alquenilo C_2-C_5 , o alquinilo C_2-C_5 ; y R^5 es H, alquilo C_1-C_5 , alquenilo C_2-C_5 , alquinilo C_2-C_5 , CO(alquilo C_1-C_5), CO(alquenilo C_2-C_5), o CO(alquinilo C_2-C_5); X^D y X^Z son grupos espaciadores; C es un grupo escindible; y a y b son independientemente 0 o 1;

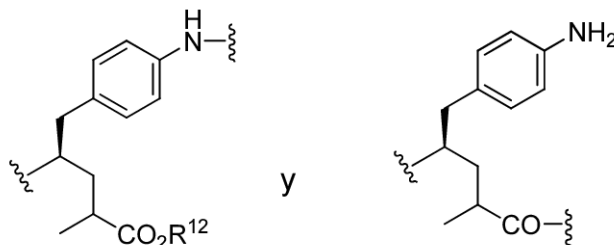
10

en la que el grupo R^4 está unido por medio de un grupo carbonilo o amina en lo mencionado bien a grupo X^D en el caso de que a sea 1 o bien al grupo C en el caso de que a sea 0.

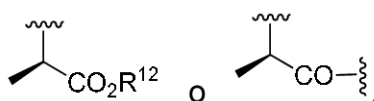
15

Preferentemente, el enlace entre el grupo carboxilo o amina en R^4 y el grupo X^D o C, como puede ser el caso, es por medio de un enlace amida.

20 En las estructuras

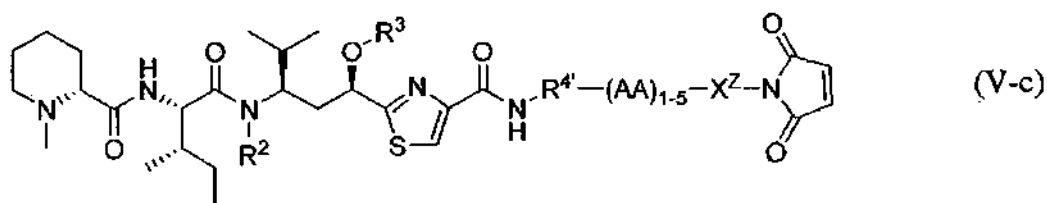


la estereoquímica en el grupo metilo en posición alfa con respecto al grupo carboxilo preferentemente corresponde a aquella de las tubulisinas que se dan en la naturaleza, es decir:



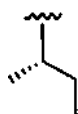
25

Preferentemente, en fórmula (V-b) n es 1, R^1 es un residuo de isoleucilo, a es 0, b es 1, y C comprende uno a cinco aminoácidos (preferentemente uno a dos), y R^4 está unido a C por un enlace peptídico que es escindible enzimáticamente, y R^5 es Me. La presente realización preferida está representada por fórmula (V-c):



5 donde R^2 , R^3 , y R^4 son según se definen con respecto a fórmula (V-b), cada AA es independientemente un aminoácido natural, y X^Z es $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_{2-5}$ o $\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_{2-5}$. Los aminoácidos AA preferidos son lisina, citrulina, alanina, valina, glicina y fenilalanina.

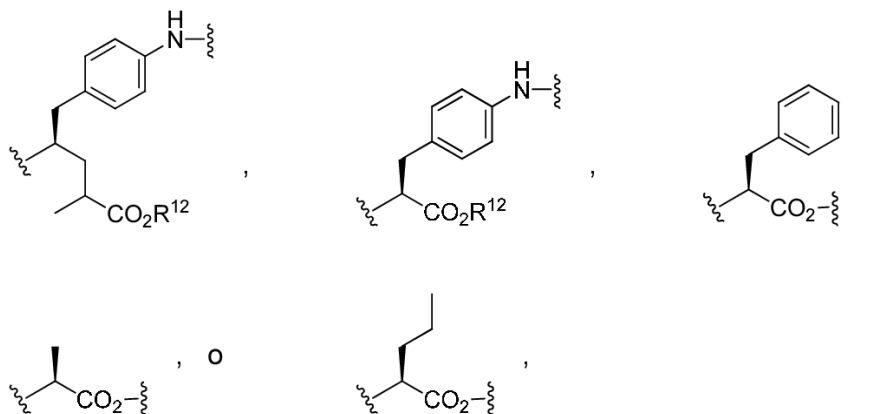
En la fórmula (V-b), R^1 preferentemente es H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_5$, o alqueno $\text{C}_2\text{-C}_5$ y es más preferentemente un residuo de isoleucilo, es decir:



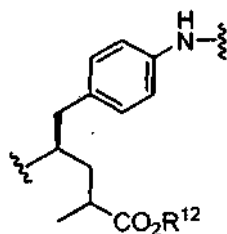
10 En las fórmulas (V-b) y (V-c), R^2 preferentemente es H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_5$, CH_2O (alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$), CH_2O (alqueno $\text{C}_2\text{-C}_5$), $\text{CH}_2\text{O}(\text{C}=\text{O})$ (alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$), o $\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})$ (alqueno $\text{C}_2\text{-C}_5$); y más preferentemente es H, Me, Et, CH_2OMe , CH_2OEt , $\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})i\text{-Bu}$, $\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})n\text{-Pr}$, $\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, o $\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{Me}$.

15 En las fórmulas (V-b) y (V-c), R^3 preferentemente es H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_5$, $\text{C}(=\text{O})$ alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, o $\text{C}(=\text{O})$ alqueno $\text{C}_2\text{-C}_5$; y más preferentemente es H, Me, Et, o $\text{C}(=\text{O})\text{Me}$.

20 En las fórmulas (V-b) y (V-c), R^4 preferentemente es



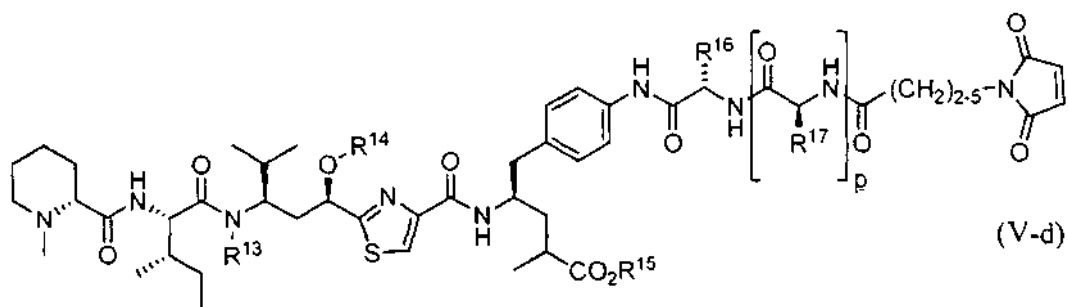
con R^{41} equivaliendo a



25 y R^{12} equivaliendo a H, prefiriéndose especialmente Me o Et.

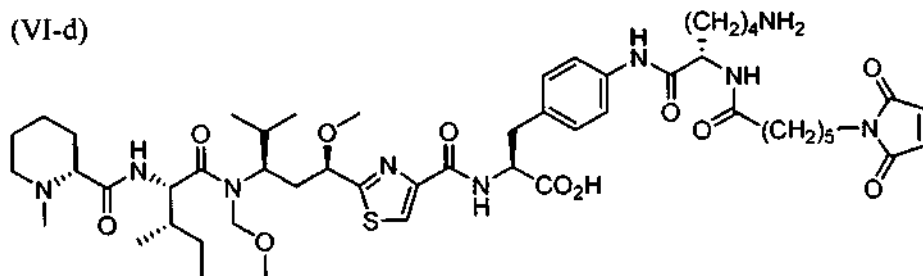
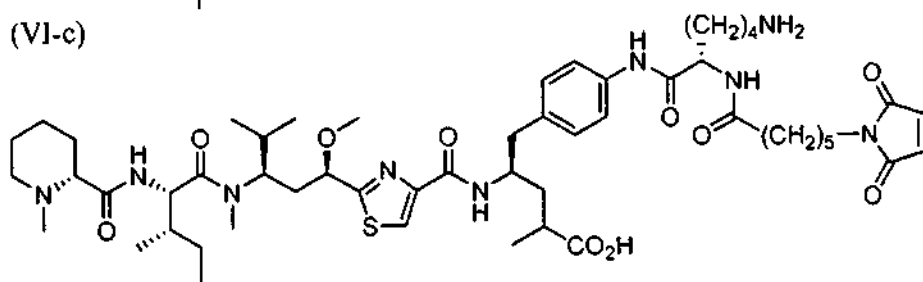
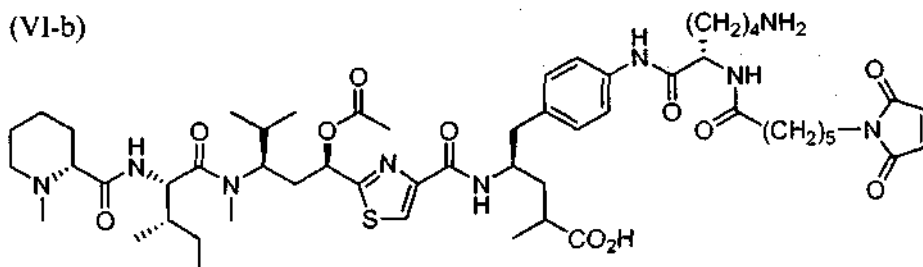
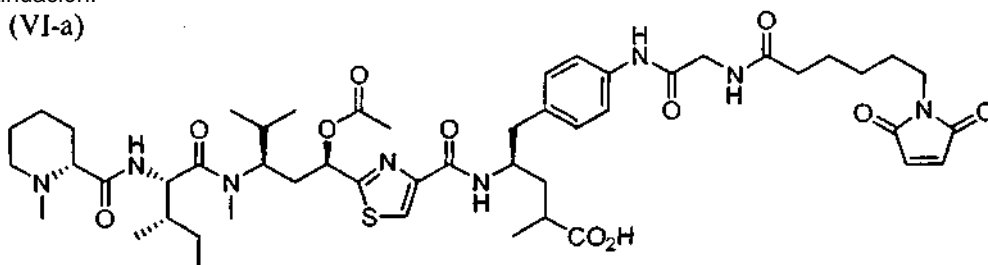
En la fórmula (V-b), n preferentemente es 1 y R^5 preferentemente es metilo; es decir, el anillo en la subunidad Mep es preferentemente una N-metilpiperidinilona.

30 En otra realización, esta invención proporciona un compuesto que tiene una estructura representada por fórmula (V-d)

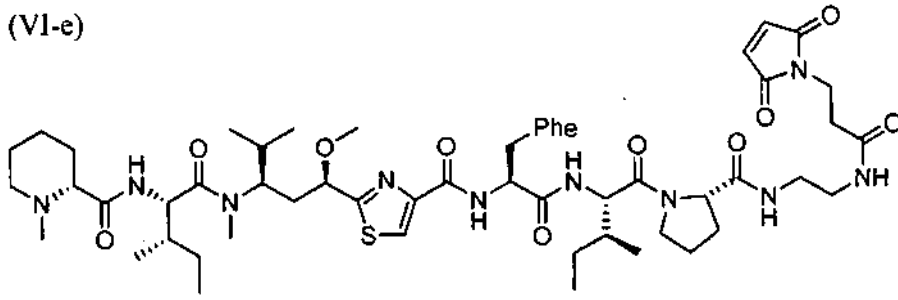


5 donde R^{13} es Me, n-Pr, CH_2OMe , o CH_2OCMe , o $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$; R^{14} es Me o $C(=O)Me$; y R^{15} es H o alquilo C_1-C_5 (preferentemente H, Me o Et); R^{16} es un grupo de cadena lateral de lisina $((CH_2)_4NH_2)$ o citrulina $((CH_2)_3NHC(=O)NH_2)$; R^{17} es un grupo de cadena lateral de valina $(C(Me)_2)$ o alanina (Me); y p es 0 o 1.

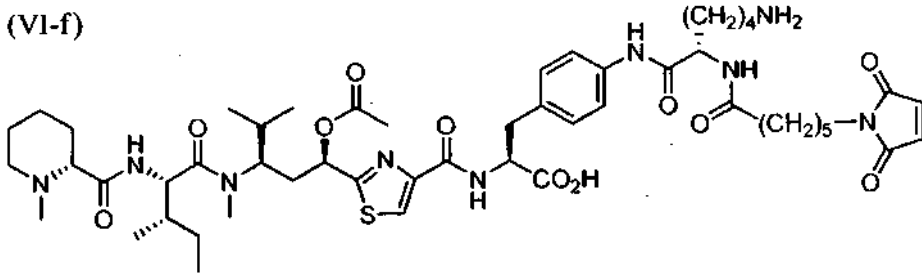
10 Ejemplos de construcciones compuesto-enganche citotóxicas específicas se muestran en fórmulas de la (VI-a) a la (VI-t). El compuesto-enganche (VI-n) se prefiere especialmente. Ellos tienen un grupo maleimida y están listos para conjugación a un anticuerpo por medio de un grupo sulfhidrilo en ellos, por un procedimiento tal como aquel descrito a continuación.



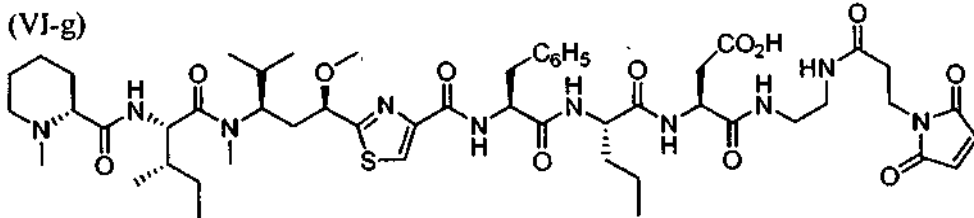
(VI-e)



(VI-f)

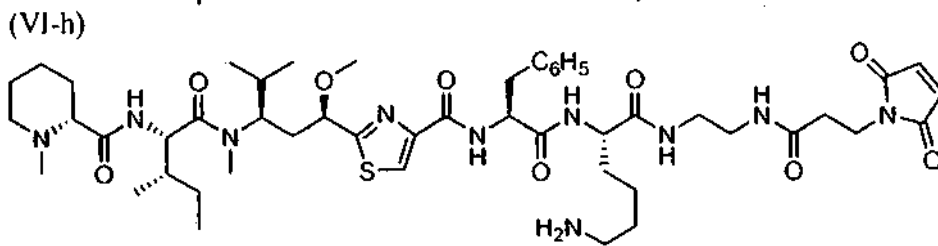


(VI-g)

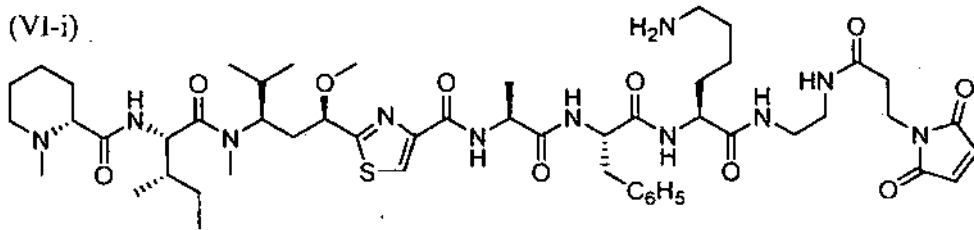


5

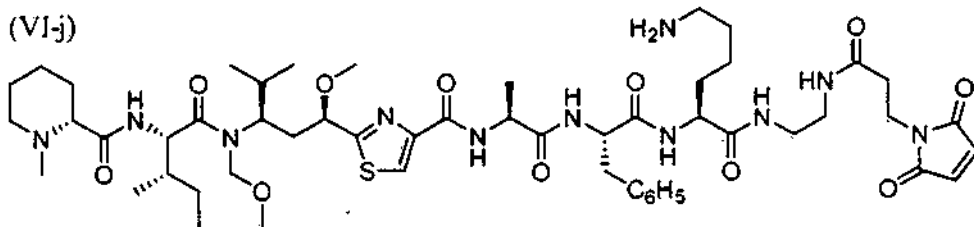
(VI-h)



(VI-i)

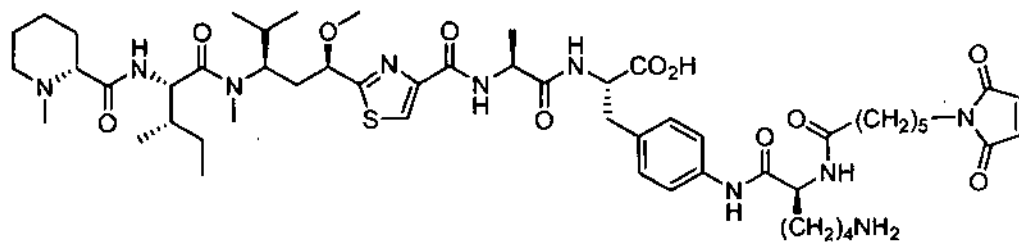


(VI-j)

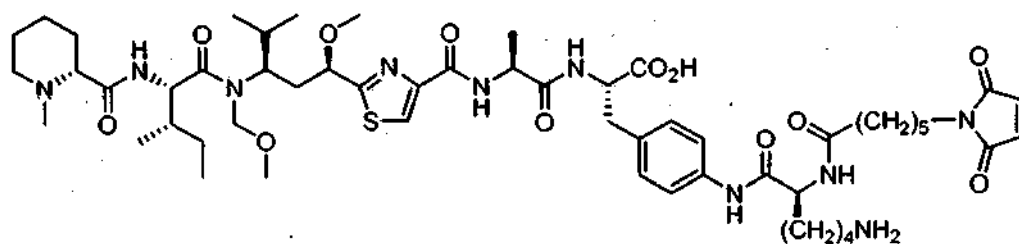


10

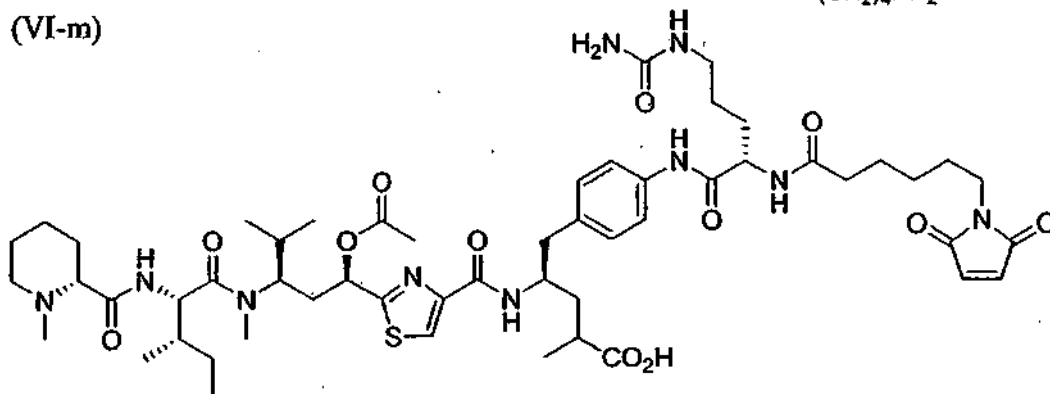
(VI-k)



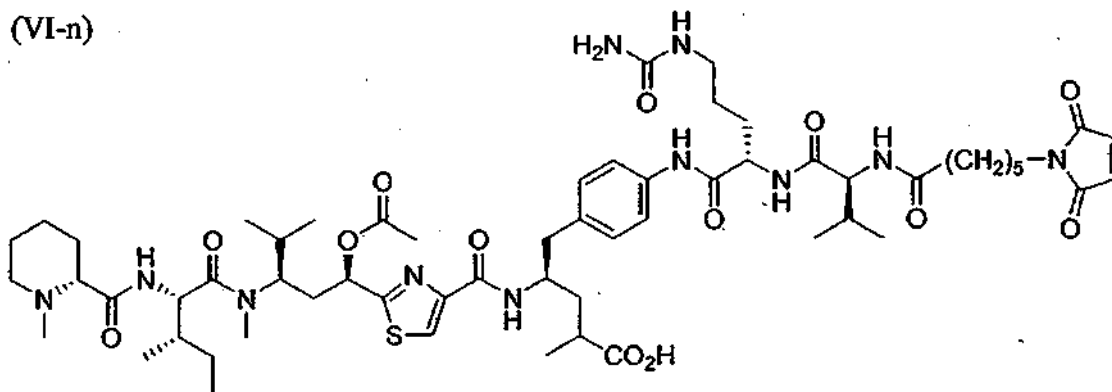
(VI-l)



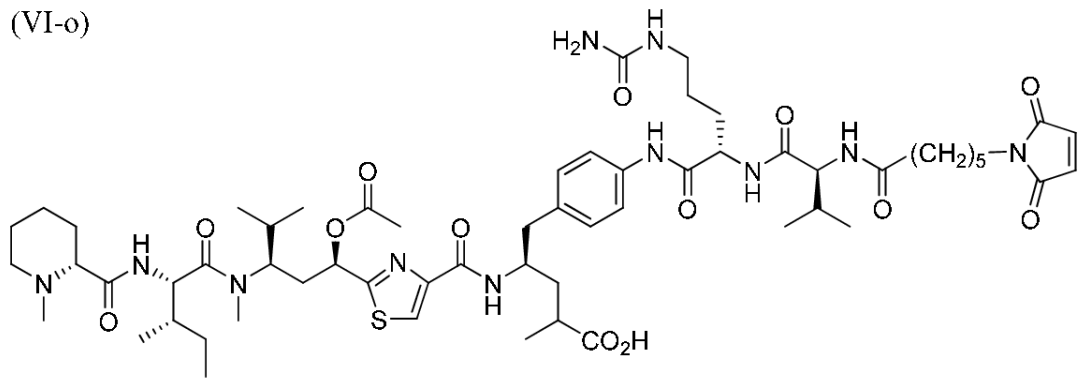
(VI-m)



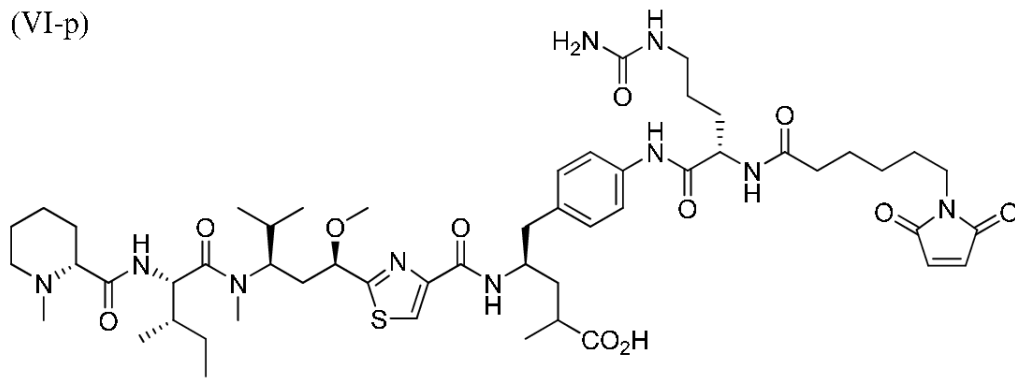
(VI-n)



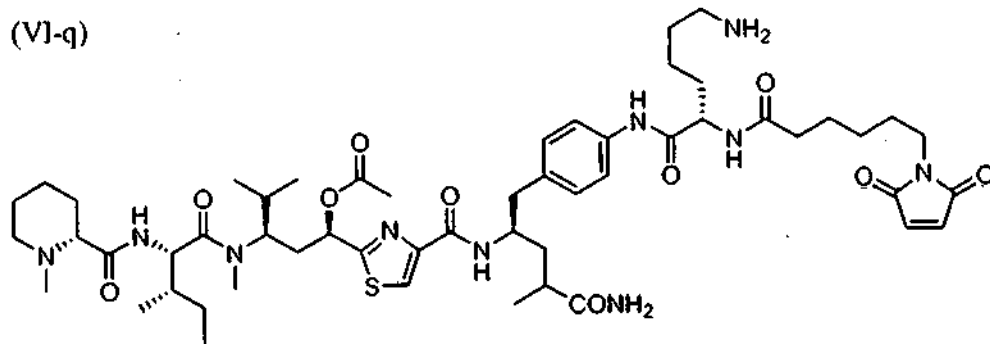
(VI-o)



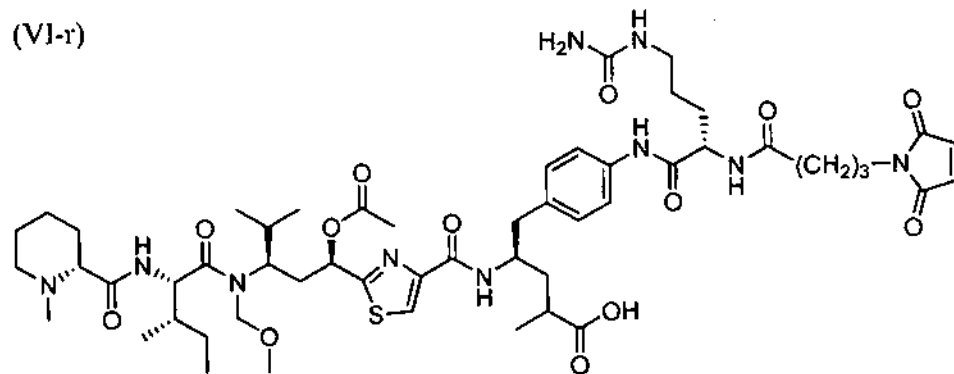
(VI-p)



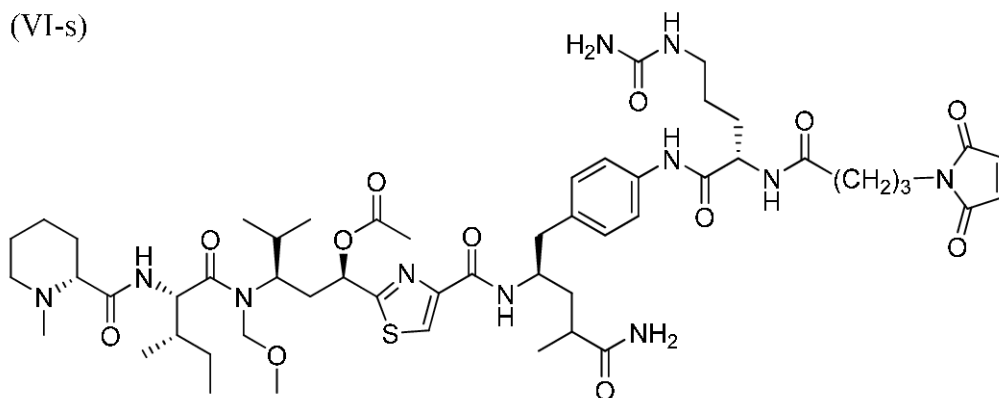
(VI-q)



(VI-r)

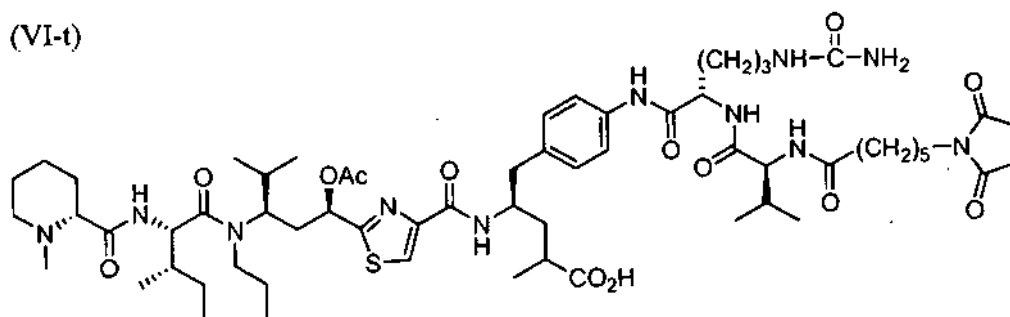


(VI-s)



y

(VI-t)



5 Preparación de Conjugados

Lo siguiente es un procedimiento ilustrativo, basado en la introducción de grupos tioles libres en un anticuerpo mediante una reacción de grupos ϵ -amino con 2-iminotiolano, seguida por reacción con un resto de engarce a fármacos que contiene maleimida tal como se describe anteriormente. Inicialmente el anticuerpo sufre intercambio de tampón en tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM y ácido dietileno triamina pentaacético 2 mM (DTPA) y se concentra a 5-10 mg/ml. Se logra tiolación por adición de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano a añadirse puede determinarse por un experimento preliminar y varía de anticuerpo a anticuerpo. En el experimento preliminar, se añade una valoración de cantidades incrementantes de 2-iminotiolano al anticuerpo, y tras incubación con el anticuerpo durante 1 hora a TA (temperatura ambiente, alrededor de 25 °C), el anticuerpo sufre desalación en tampón HEPES de pH 6,0 50 mM usando una columna SEPHADEX™ G-25 y el número de grupos de tiol introducidos se determinó rápidamente por reacción con ditiopiridina (DTDP). La reacción de los grupos de tioles con DTDP da como resultado liberación de tiopiridina, que puede monitorizarse espectrofotométricamente a 324 nm. Se usan normalmente las muestras a una concentración de proteínas de 0,5-1,0 mg/ml. La absorbancia a 280 nm se puede usar para determinar con seguridad la concentración de proteínas en las muestras, y después se incuba una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución de reserva a 5 mM en etanol) durante 10 minutos a TA. Las muestras de blanco de sólo tampón más DTDP se incuban también al lado. Después de 10 minutos, se mide la absorbancia a 324 nm y el número de grupos de tiol se cuantifica usando un coeficiente de extinción para tiopiridina de 19.800 M⁻¹.

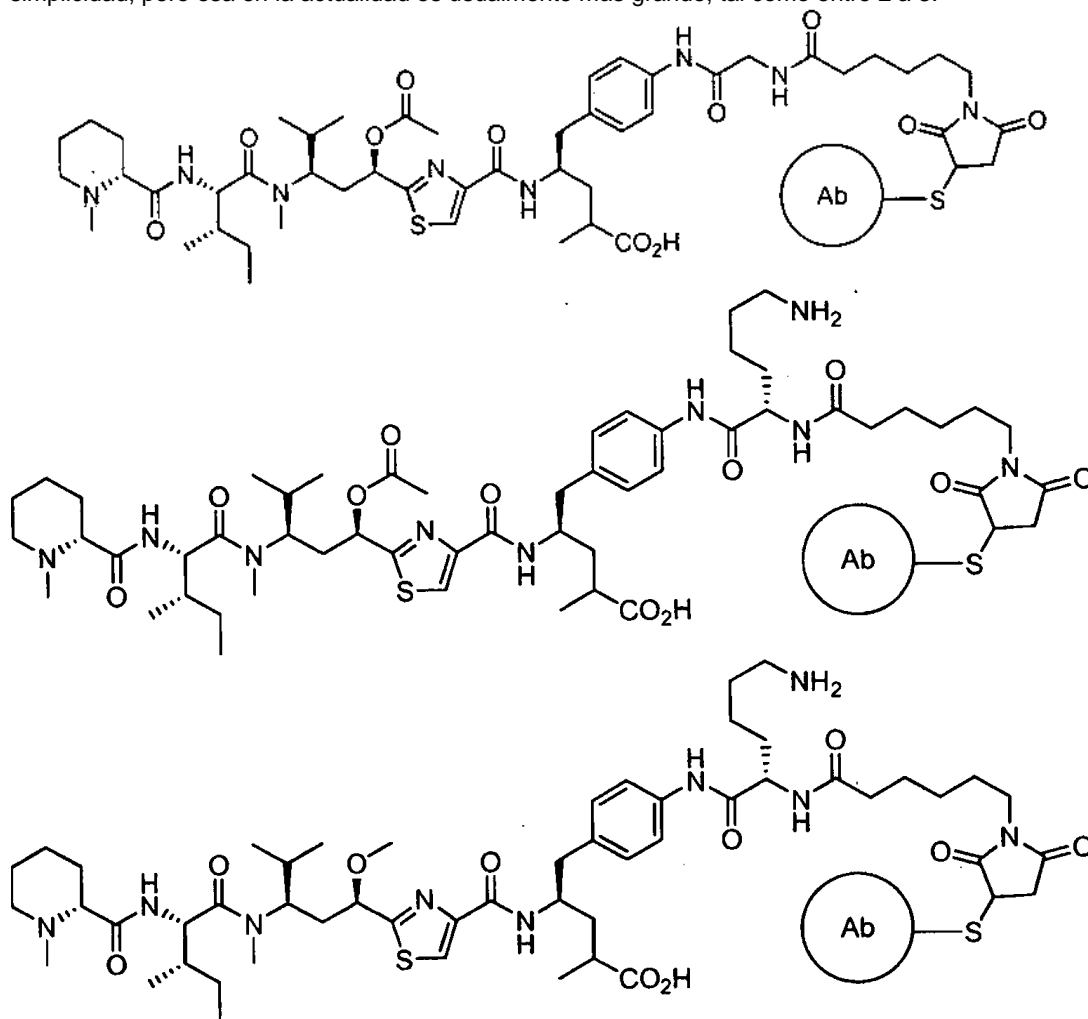
Normalmente es deseable un nivel de tiolación de aproximadamente tres grupos tiol por anticuerpo. Por ejemplo, con algunos anticuerpos esto puede lograrse añadiendo un exceso molar de 15 veces de 2-iminotiolano seguido por incubación a TA durante 1 hora. El anticuerpo se incuba después con 2-iminotiolano a la proporción molar deseada y después sufre desalación en tampón de conjugación (tampón HEPES de pH 6,0 50 mM que contiene glicina 5 mM y DTPA 2 mM). El material tiolado se mantiene sobre hielo mientras que el número de tioles introducido se cuantifica como se describe anteriormente.

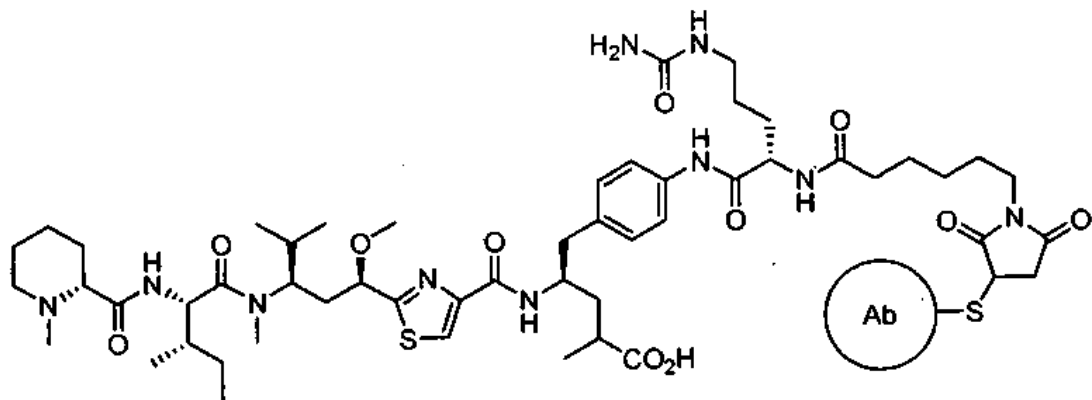
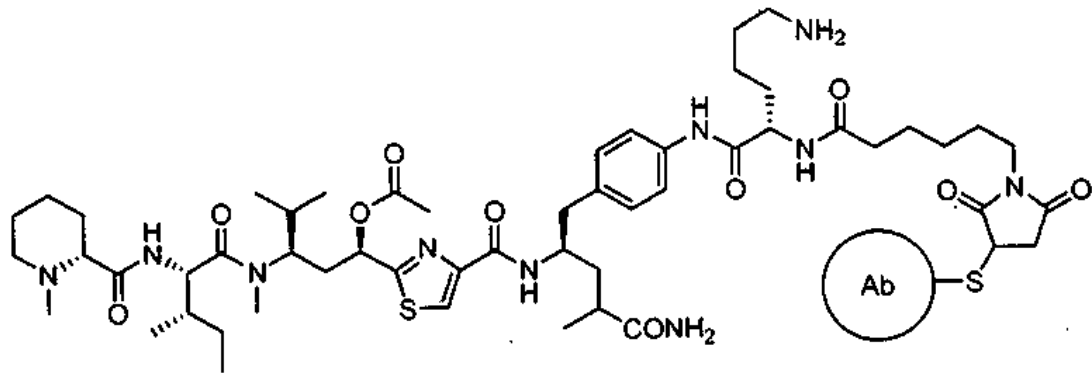
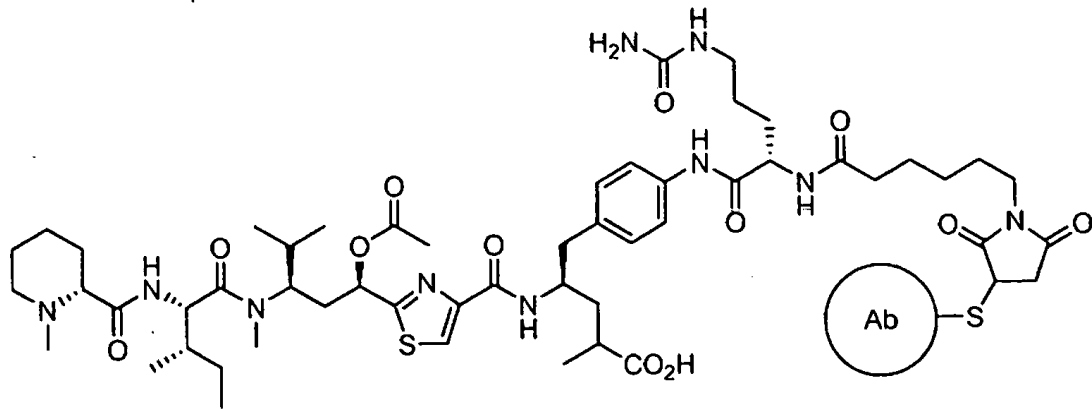
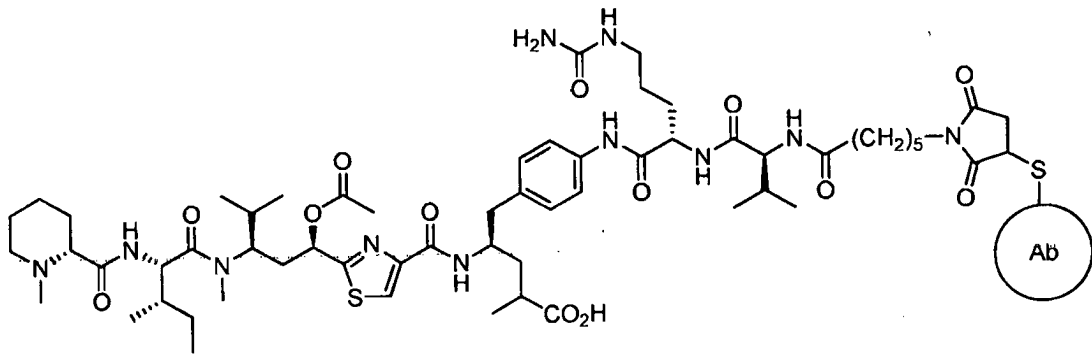
Después de verificación del número de tioles introducidos, se añade el resto de engarce a fármacos a un exceso molar de 3 veces por tiol. La reacción de conjugación se deja avanzar en tampón de conjugación que contiene también una concentración final de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 %, o disolvente alternativo similar. Comúnmente, la solución de reserva de engarce a fármaco se disuelve en DMSO al 100 %. La solución de reacción se añade directamente al anticuerpo tiolado, que tiene suficiente DMSA añadido para llevar la concentración final al 10 %, o se pre-diluye en tampón de conjugación que contiene una concentración final de DMSO al 10 %, seguida por adición a un volumen igual de anticuerpo tiolado.

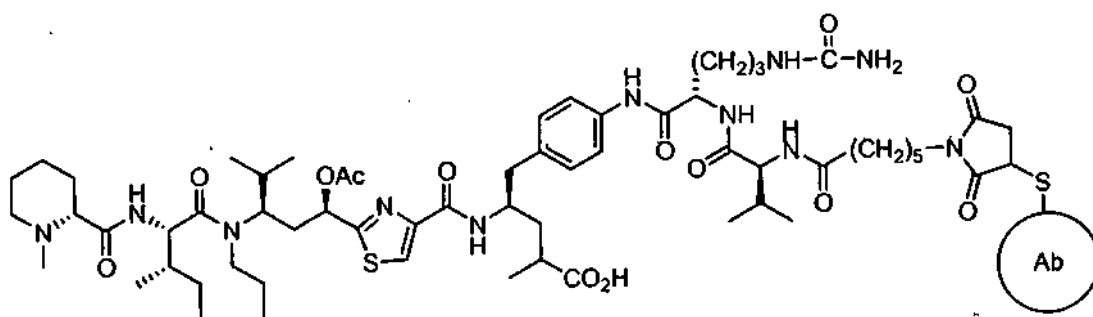
La mezcla de reacción de conjugación se incubaba a TA durante 2 h con agitación. Tras la incubación, la mezcla de reacción de conjugación se centrifugó y se filtró a través de un filtro de 0,2 μm . La purificación del conjugado se puede lograr por cromatografía usando un número de procedimientos. En un procedimiento, el conjugado se purifica usando cromatografía de exclusión de tamaño en una columna de SEPHACRYL™ S200 pre-equilibrada con tampón de HEPES a pH 7,2 50 mM que contiene glicina 5 mM y NaCl 50 mM. La cromatografía se lleva a cabo a una velocidad de flujo lineal de 28 cm/h. Las fracciones que tienen conjugados se recogen, se almacenan y se concentran. En un procedimiento alternativo, la purificación se puede llevar a cabo por cromatografía de intercambio iónico. Las condiciones varían de anticuerpo a anticuerpo y se deberían optimizar en cada caso. Por ejemplo, se aplica mezcla de reacción de conjugado anticuerpo-fármaco a una columna de SP-SEFAROSA™ pre-equilibrada en HEPES de pH 5,5 50 mM que contiene glicina 5 mM. El conjugado de anticuerpo se eluye usando un gradiente de NaCl 0-1 M en tampón de equilibración a pH 5,5. Las fracciones relevantes que contienen el conjugado se almacenan y dializan frente a tampón de formulación (tampón de HEPES a pH 7,2 50 mM conteniendo glicina 5 mM y NaCl 100 mM).

Aquellos expertos en la técnica entenderán que las condiciones y la metodología anteriormente descritas son ejemplares y no limitantes y que otras aproximaciones para conjugación se conocen en la técnica y son usables en la presente invención.

Usando las técnicas anteriores, se conjugaron los compuestos de esta invención usando anticuerpos 2A10, un anticuerpo anti-PSMA (Huang y col., documento US 2009/0297438); 2H5, un anticuerpo anti-CD70 (Coccia y col., WO 2008/074004 A2); o 6A4, un anticuerpo antimetastelina (Terrett y col., WO 2009/04957). Los conjugados resultantes se pueden representar por las siguientes fórmulas, donde Ab representa un anticuerpo. Aquellos expertos en la técnica entenderán que en estas fórmulas la proporción del compuesto citotóxino-anticuerpo se muestra como 1:1 por simplicidad, pero esa en la actualidad es usualmente más grande, tal como entre 2 a 3.







COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

5 En otro aspecto, la presente revelación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente revelación formulado conjuntamente con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Puede contener opcionalmente uno o más ingredientes farmacéuticamente activos adicionales, tales como un anticuerpo u otro fármaco. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una terapia de combinación con otro agente terapéutico, especialmente otro agente anticancerígeno.

10 La composición farmacéutica puede comprender uno o más excipientes. Los excipientes que se pueden usar incluyen vehículos, agentes activos de superficie, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, coadyuvantes de dispersión o solución, solubilizadores, colorantes, agentes aromatizantes, revestimientos, agentes disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos y combinaciones de los mismos. La selección y uso de excipientes adecuados se enseña en Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición (Lippincott Williams & Wilkins 2003).

15 Preferentemente, una composición farmacéutica es adecuada para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede estar revestido de un material para protegerlo de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivarlo. La frase "administración parenteral" quiere decir modos de administración distintos de la administración enteral o tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Alternativamente, la composición farmacéutica puede administrarse por medio de una vía no parenteral, tal como vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles. Se pueden formular también en una microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para lograr concentración de fármaco elevada.

25 La cantidad del ingrediente activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo de administración particular y será generalmente aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, fuera de un cien por ciento, la presente cantidad variará desde aproximadamente el 0,01 por ciento hasta aproximadamente el noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento hasta aproximadamente el 70 por ciento, más preferentemente desde aproximadamente el 1 por ciento hasta aproximadamente el 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Los regímenes de dosificación están ajustados para proporcionar una respuesta terapéutica. Por ejemplo, se puede administrar una inyección intravenosa rápida individual, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. "Forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir la respuesta terapéutica deseada, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

35 La dosificación varía desde aproximadamente 0,0001 hasta 100 mg/kg, y más usualmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o pueden estar dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Los regímenes de tratamiento ejemplares son de administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3

meses, o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por medio de administración intravenosa, usando uno de los siguientes programas de administración de dosis: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguidos por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos procedimientos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto de la invención da como resultado preferentemente un decrecimiento en gravedad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y duración de periodos libres de los síntomas de la enfermedad, o una prevención de alteración o discapacidad debida a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos portadores de tumores, una "cantidad terapéuticamente efectiva" inhibe preferentemente crecimiento tumoral en al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente el 60 %, y hasta más preferentemente en al menos aproximadamente el 80 % en relación a sujetos no tratados. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otra forma síntomas en un sujeto, que es normalmente un ser humano pero puede ser otro mamífero.

La composición farmacéutica puede ser una formulación controlada o mantenida, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar por medio de dispositivos médicos tales como (1) dispositivos de inyección hipodérmica sin agujas (por ejemplo, documentos US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; y 4.596.556); (2) bombas de microinfusión (documento US 4.487.603); (3) dispositivos transdérmicos (documento US 4.486.194); (4) aparatos de infusión (documentos US 4.447.233 y 4.447.224); y (5) dispositivos osmóticos (documentos US 4.439.196 y 4.475.196).

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se puede formular para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la barrera hematoencefálica, se pueden formular en liposomas, que pueden comprender adicionalmente restos marcados como objetivo para potenciar transporte selectivo a células u órganos específicos. Véanse, por ejemplo, los documentos US 4.522.811; 5.374.548; 5.416.016; y 5.399.331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685; Umezawa y col., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038; Bloeman y col. (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais y col. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180; Briscoe y col. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134; Schreier y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090; Keinanen y Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; y Killion y Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273.

USOS

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados se pueden usar para tratar enfermedades tales como, pero no limitadas a, enfermedades hiperproliferativas, incluyendo: cánceres de la cabeza y el cuello que incluyen tumores de la cabeza, el cuello, la cavidad nasal, los senos paranasales, la nasofaringe, la cavidad oral, la orofaringe, la laringe, la hipofaringe, las glándulas salivares, y los paragangliomas; cánceres del hígado y del árbol biliar, particularmente carcinoma hepatocelular; cánceres intestinales, particularmente cáncer colorrectal; cáncer ovárico; cáncer de pulmón de células pequeñas y no de células pequeñas (SCLC y NSCLC); sarcomas de cáncer de mama, tales como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, rhabdomyosarcoma embrionario, leiomyosarcoma, neurofibrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial, liposarcoma y sarcoma de parte blanda alveolar; leucemias tales como leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y leucemia mielógena crónica (CML); neoplasmas de los sistemas nerviosos centrales, particularmente cáncer cerebral; mieloma múltiple (MM), linfomas tales como linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma folicular, linfoma de tejidos linfoides asociados a mucosas, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes del linaje B, linfoma de Burkitt y linfoma de células grandes anaplásicas de células T. Clínicamente, la práctica de los procedimientos y el uso de las composiciones descritas en el presente documento darán como resultado una reducción en tamaño o número del crecimiento canceroso y/o una reducción en síntomas asociados (donde sea aplicable). Patológicamente, la práctica del procedimiento y el uso de las composiciones descritas en el presente documento producirán una respuesta patológicamente relevante, tal como: inhibición de proliferación de células cancerosas, reducción en el tamaño del cáncer o del tumor, prevención de metástasis adicionales e inhibición de angiogénesis tumorales. El procedimiento de tratar tales enfermedades comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de la invención a un sujeto. El procedimiento se puede repetir tantas veces como sea necesario. Especialmente, el cáncer puede ser cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer ovárico, mieloma múltiple, cáncer renal, leucemia (especialmente ALL, APL, o AML), o linfoma.

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados se pueden administrar en combinación con otros agentes anticancerígenos o citotóxicos, incluyendo anticuerpos, agentes alquilantes, inhibidores de angiogénesis;

antimetabolitos, escindidores de ADN, reticuladores de ADN, intercalantes de ADN, ligandos del surco menor del ADN, enediinas, inhibidores de la proteína de choque término 90, inhibidores de la deacetilasa de histonas, inmunomoduladores, estabilizadores de microtúbulos, análogos de nucleósidos (de purinas o de pirimidinas), inhibidores de exportación nuclear, inhibidores de proteosomas, inhibidores de topoisomerasa (I o II), inhibidores de

5 tirosina quinasas e inhibidores de serina/treonina quinasas. Los agentes anticancerígenos o citotóxicos específicos incluyen β -lapachona, ansamitocina P3, auristatina, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, busulfán, calistatina A, camptotecina, capecitabina, CC-1065, cisplatina, criptoficinas, daunorrubicina, disorazol, docetaxel, doxorubicina, duocarmicina, dinemicina A, epotilonas, etopósido, floxuridina, floxuridina, fludarabina, fluoruracilo, gefitinib, geldanamicina,

10 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG), 17-(2-dimetilaminoetil)amino-17-demetoxigeldanamicina (17-DMAG), gemcitabina, hidroxiurea, imatinib, interferones, interleucinas, irinotecán, maitansina, metotrexato, mitomicina C, oxaliplatina, paclitaxel, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), tiotepa, topotecán, tricostatina A, vinblastina, vincristina, vindesina, lenalidomida (REVLIMID®), bevacizumab (AVASTINA®), trastuzumab (HERCEPTINA®) y cetuximab (ERBITUX®).

15 Ejemplos

La práctica de la presente invención puede entenderse por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ejemplo y no de limitación.

20 Ejemplo 1 – Esquema 1

Esquema 1 (Figs. 1a y 1b) representan un procedimiento para fabricar compuestos de la presente invención.

25 *Tioamida 2*. Se mezcló 2,2-dietoxiacetonitrilo **1** (25 g, 193 mmol) con $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (40 ml, 265 mmol, solución al 45 % en agua) en 300 ml de metanol (MeOH) a temperatura ambiente (TA). Después de guardar la mezcla de reacción durante toda una noche, se concentró a vacío y el residuo se llevó en acetato de etilo (EtOAc). La solución de EtOAc se lavó después con solución de NaHCO_3 saturada, salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El EtOAc se evaporó dando tioamida **2** (26 g, 159 mmol, 82 %) como un sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,01 (s, 1H), 3,67 (m, 4H), 1,22 (t, J = 7,2 Hz, 6H).

30 *2-(dietoximetil)tiazol-4-carboxilato de metilo 3*. Se añadieron 100 g de tamices moleculares (3A) a una mezcla de reacción de tioamida **2** (25 g, 153 mmol) y bromopiruvato de metilo (20 ml, 163 mmol) en 300 ml de MeOH. Después de que la mezcla se sometiera a reflujo durante 1,5 h, se enfrió y se filtró a través de CELITE™. El filtrado se concentró y se hizo pasar a través de una columna (diclorometano (DCM):EtOAc, 8:1) dando carboxilato de tiazol **3** (34,5 g, 140 mmol, 91 %) como un sólido, que se usó para la etapa siguiente sin purificación adicional.

35 *2-formiltiazol-4-carboxilato de metilo 4*. Se disolvió tiazol-4-carboxilato **3** (30 g, 122 mmol) en 300 ml de acetona, a la que se añadió HCl acuoso (21 ml, 2 M). Después de guardar la mezcla de reacción a TA durante toda una noche, la mezcla de reacción se calentó y se mantuvo a 60 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió y evaporó después dando un residuo que se llevó en 200 ml de DCM. La solución de DCM se lavó después con solución de NaHCO_3 saturada, y después salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La solución de DCM se filtró y se concentró a vacío dando la solución concentrada que se trituró con éter dando 2-formiltiazol-4-carboxilato de metilo **4** (14 g, 82 mmol, 54 % para las dos etapas) como un sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, CDCl_3) δ 133-8-p110,16 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 8,53 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H).

40 *Sulfiminina 7*. Se disolvió (S)-2-metilpropano-2-sulfonamida **5** (7,3 ml, 68 mmol) en 100 ml de tetrahidrofurano (THF), a lo que se añadió $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ (27 ml, 130 mmol) y 3-metil-2-butanona **6** (8 g, 41 mmol) a TA. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante toda una noche y después se enfrió y se añadió a una solución de salmuera. La mezcla resultante se filtró, y la torta se lavó con EtOAc. La fase orgánica se concentró dando un residuo que se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (DCM:EtOAc, 4:1) dando sulfiminina **7** (9,5 g, 37 mmol, 75 %) como un aceite. RMN-¹H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,53 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 1,22 (s, 9H), 1,12 (d, J = 4,2 Hz, 3H), 1,10 (d, J = 4,2 Hz, 3H). EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 190,12, hallada, 190.

45 *Compuesto 8*. Se añadió diisopropilamida de litio ("LDA", 60 ml, 108 mmol, 1,8 M) a 200 ml de éter a -78 °C seguidos por la adición de sulfiminina **7** (18,9 g, 100 mmol) en 200 ml de éter y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 40 min. Se añadió $\text{CITi}(\text{O}i\text{Pr})_3$ (203 mmol, 48,4 ml) a la mezcla de reacción y la solución se agitó durante 60 min. Una solución de 2-formiltiazol-4-carboxilato de metilo **4** (12,5 g, 72,6 mmol) en 180 ml de THF se añadió lentamente a la mezcla de reacción. Después de otras 2 horas a -78 °C, se añadió una mezcla de ácido acético y THF (1/5 v/v, 4,9 ml). La mezcla se calentó a 5 °C durante 1 hora y después se vertió en una solución de salmuera. El producto deseado se extrajo después a partir de la solución de salmuera con éter y solución de EtOAc. La fase orgánica se secó después sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo se hizo pasar a través de 2 columnas (DCM:EtOAc y Hexano:EtOAc) dando compuesto **8** (19,6 g, 54 mmol, 75 %) como un aceite. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 361,12, hallada, 361.

60 *Compuesto 9*. Una solución de compuesto **8** (19 g, 52,7 mmol) en 200 ml de THF se enfrió a -78 °C, después de lo cual se añadió lentamente $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ (21,7 ml, 105 mmol). Después de 60 minutos, cuando la solución llega a ser

transparente, se añadió NaBH₄ (31 mmol, 1,17 g), después de 2 h (tiempo de reacción más largo causó reducción del éster) se añadieron 10 ml de MeOH. La mezcla se calentó después a 0 °C, se vertió en 1 ml de HOAc en un lote de hielo. La mezcla se filtró y la torta se lavó con EtOAc. Después de la separación, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo final se hizo pasar a través de una columna (DCM:EtOAc, 1:4) dando compuesto **9** (19 g, 52 mmol, 99 %) como un aceite. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,1 (s, 1H), 5,54 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 5,16 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,42 (m, 1H), 3,32 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 2,25 (m, 1H), 1,88 (m, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,26 (s, 9H), 0,91 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,87 (d, J = 6,7 Hz, 3H). RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 177,9, 162,1, 146,6, 127,7, 67,9, 58,6, 56,4, 52,5, 40,8, 33,9, 23,1, 19,8, 17,4. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 363,13, hallada, 363.

Compuesto dimetilado 10. Se añadió hidruro de sodio (9,69 mmol, 60 %, 387 mg) a una solución de compuesto **9** en 6 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) a 5 °C seguido por yoduro de metilo (607 ul, 9,7 mmol) después de 60 minutos. Después de agitar la mezcla de reacción durante 3 h, la mezcla se vertió en solución de NH₄Cl saturada enfrida en hielo. Se añadió éter etílico y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró dando un residuo. El residuo se hizo pasar a través de una columna (hexano:EtOAc 1:4) dando el compuesto dimetilado **10** (314 mg, 0,805 mmol, 33 %) como un líquido. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,17 (s, 1H), 4,87 (dd, J = 11,0 Hz, J = 2,5 Hz, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,50 (s, 3H), 3,40 (m, 1H), 2,58 (s, 3H), 1,99 (m, 1H), 1,83 (m, 2H), 1,25 (s, 9H), 0,98 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,95 (d, J = 6,7 Hz, 3H). EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 391,16, hallada, 391.

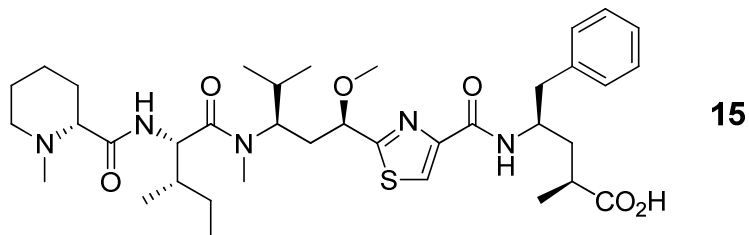
Monometilamina 11. Se añadió HCl acuoso (4 N, en dioxano, 0,5 ml) a una solución de un compuesto dimetilado **10** (370 mg, 0,95 mmol) en 5 ml de MeOH. Después de agitar la mezcla de reacción durante 60 minutos, se evaporó en agitación dando monometilamina **11** (362 mg) como su sal de HCl, que se puede usar para la etapa siguiente sin purificación adicional. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 287,14, hallada, 287.

Amida 12. Se mezclaron monometilamina **11** (362 mg, 1,12 mmol), compuesto de Fmoc **22** (preparado por Wipf y col., 2007; 1,2 g, 3,38 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA, 976 ul, 5,6 mmol) en 5 ml de DMF a TA. Después de agitar durante 24 horas, la mezcla se concentró y el residuo se disolvió en EtOAc. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃, salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró dando un residuo. El residuo se hizo pasar a través de una columna (hexano:EtOAc:MeOH 7:3:0,6) dando amida **12** (466 mg, 0,75 mmol, 67 %) como un aceite. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 622,2, hallada, 622.

Compuesto 13. Se disolvió amida **12** (466 mg, 0,75 mmol) en 8 ml de DCM que contienen piperidina al 5 % a TA. Después de 1 hora, la mezcla se evaporó a vacío y el residuo se hizo pasar a través de una columna dando un aceite (150 mg) que se mezcló después con ácido (D)-N-metilpípecólico **23** ("D-Mep," preparado por Peltier y col., 2006; 50 mg, 0,35 mmol), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio ("HATU," 126 mg, 0,33 mmol), DIEA (152 ul, 0,84 mmol) en 2 ml de DCM. Después de agitar a 2,5 h, el disolvente se evaporó dando un residuo que se disolvió en EtOAc. La fase orgánica se lavó después con NaHCO₃ saturado, salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró dando un residuo. El residuo se hizo pasar a través de una columna (DCM al 0-10 %:MeOH) dando compuesto **13** (99 mg, 0,188 mmol, 25 %) como un aceite. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 525,3, hallada, 525.

Ácido 14. El compuesto **13** (99 mg, 0,18 mmol) se disolvió en una mezcla de 3 ml de MeOH y agua (3:1 v:v), a la que se añadió NaOH (370 ul, 0,37 mmol, 1 M). Después de agitar durante dos horas, la mezcla de reacción se neutralizó y se concentró dando un residuo. El residuo se hizo pasar a través de una columna C-18 (agua (ácido trifluoroacético al 1 % ("TFA")):acetonitrilo (ACN) (TFA al 1 %), 0-100 %) dando ácido **14** (78 mg, 0,125 mmol, 69 %) como una sal de TFA. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 511,29, hallada, 511.

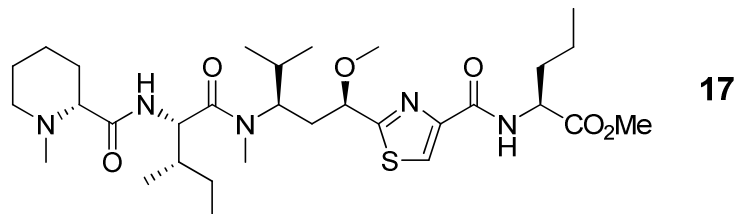
Compuesto 15. DIEA (24 ul, 137 umol) se añadió a una solución de ácido **14** (9 mg, 14,4 umol, sal de TFA) y HATU (6 mg, 15 umol) en DMF (0,5 ml) a TA. Después de que se activó todo el ácido **14** (monitoreado por HPLC), se añadió tubufenilalanina (preparada por Peltier y col. 2006; 6,5 mg, 27 umol, sal de HCl). Después de agitar durante 20 minutos, la mezcla de reacción se hizo pasar a través de una columna C-18 (agua (TFA al 1 %):ACN (TFA al 1 %), 0-100 %) dando compuesto **15** (2,5 mg, 3 umol, 21 %) como una sal blanca de TFA. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 700,4, hallada, 700.



Compuesto 16. Se añadió DIEA (20 ul, 0,11 mmol) a una solución de ácido **14** (12 mg, 0,019 mmol, sal de TFA), éster metílico de fenilalanina (5,3 mg, 0,024 mmol, como sal de HCl) y HATU (11,4 mg, 0,03 mmol) en 0,5 ml de DMF. Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se hizo pasar a través de una columna C-18 (agua (TFA al 1 %):ACN (TFA al 1 %), 0-100 %) dando compuesto **16** (4,2 mg, 0,005 umol, 26 %) como una sal blanca de TFA. EM (ES+) m/z,

calculada: m+1, 672,89, hallada, 672,5. El compuesto **16** se refiere también como compuesto (III-c) anteriormente en el presente documento.

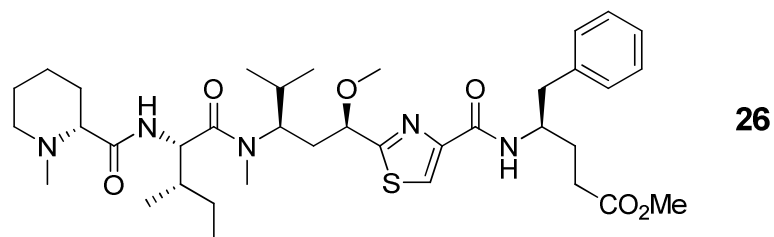
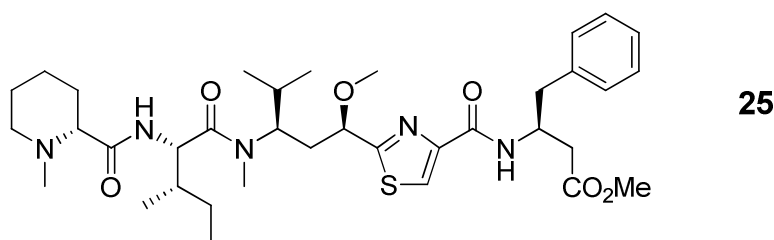
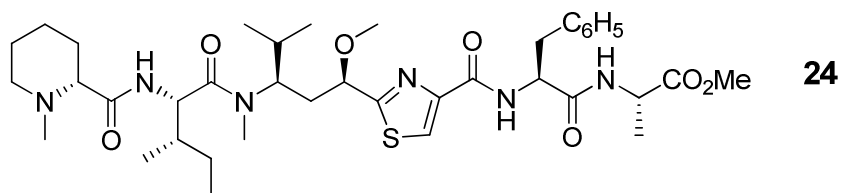
5 **Compuesto 17.** Se añadió DIEA (7 μ l, 0,04 mmol) a una solución de ácido **14** (5 mg, 0,008 mmol), éster de metilnorvalina ("NVaM," 2 mg, 0,012 mmol) y HATU (4,5 mg, 0,012 mmol) en DMF. Después de agitar la mezcla de reacción durante 30 minutos la mezcla en bruto se hizo pasar a través de una columna C-18 (agua (TFA al 1 %):ACN (TFA al 1 %), 0-100 %) dando compuesto **17** (1,3 mg, 0,0017 mmol, 21 %) como una sal blanca de TFA. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 624,85, hallada, 624,5. El compuesto **17** se refiere también como compuesto (III-e) anteriormente en el presente documento.



15 **Ácido 18.** Se añadió NaOH acuoso (75 μ l, 0,75 mmol, 10 M) a una solución de compuesto **16** (168 mg, 0,25 mmol) en una mezcla de MeOH y THF. Después de agitar durante toda una noche, la mezcla se neutralizó y se liofilizó a sequedad. El sólido se usó para la etapa siguiente sin purificación adicional. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 658,36, hallada, 658,4. El compuesto **18** se refiere también como compuesto (III-o) anteriormente en el presente documento.

20 **Norvalilamida 19.** Se añadió DIEA (5 μ l, 0,04 mmol) a una solución de ácido **18** (5 mg, 0,006 mmol), HATU (3,5 mg, 0,009 mmol) y NVaM (4,5 mg, 0,009 mmol) en DMF. Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla de reacción se hizo pasar a través de una columna C-18 (agua (TFA al 1 %):ACN (TFA al 1 %), 0-100 %) dando norvalilamida **19** (2,5 mg, 0,0025 μ mol, 40 %) como una sal blanca de TFA. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 772,02, hallada, 771,5. El compuesto **19** se refiere también como compuesto (III-f) anteriormente en el presente documento.

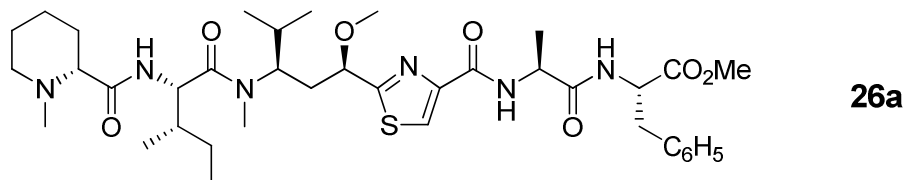
25 **Compuestos 24, 25 y 26.** Estos tres compuestos se sintetizaron a partir de ácido **14** o **18** usando procedimientos análogos a aquellos descritos anteriormente. Los productos se purificaron todos por una columna C-18 (agua (TFA al 1 %): ACN (TFA al 1 %) 0-100 %). Los rendimientos variaron desde 25-50 %. Compuesto **24**: EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 743,4, hallada, 743. Compuesto **25**: EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 686,39, hallada, 686,5. Compuesto **26**: EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 700,40, hallada, 700,5.



35 El compuesto **24** se refiere también como compuesto (III-g) anteriormente en el presente documento.

Compuesto 26a. El compuesto **14** se acopló con Ala-Phe OMe siguiendo el mismo procedimiento como se describe para el compuesto **16**. El producto se purificó por una columna C-18 (agua (TFA al 1 %): ACN (TFA al 1 %) 0-100 %). EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 743, hallada 743,4. El compuesto **26a** se refiere también como compuesto (III-l) anteriormente en el presente documento.

5



Ejemplo 2 – Esquema 2

10 El presente ejemplo describe la síntesis de compuestos mostrada en el Esquema 2 (**Fig. 2**).

Compuesto 28. Se añadieron éster metílico de fenilalanina (10 mg, 46,5 μ mol) y HATU (14,7 mg, 38,6 μ mol) a una solución de compuesto **27** (preparado por Peltier y col., 2006; 10 mg, 15,5 μ mol, sal de formiato) en 0,5 ml de DMF seguido por DIEA a TA. Después de agitar durante 30 minutos, se añadió DMSO (2 ml) y la mezcla de reacción se sometió directamente a una columna C-18 (agua (formiato de amonio 5 mM, pH 7,2):ACN 0-100 %), dando compuesto **28** (3,2 mg, 25 %) como un sólido blanco (sal de formiato). EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 758,41, hallada, 758,4. El compuesto **28** se refiere también como compuesto (III-h) anteriormente en el presente documento.

15

Compuesto 29. Se añadió anhídrido acético (30 μ l, 290 μ mol) a una solución de compuesto **28** (3,2 mg, 3 μ mol, sal de formiato) en 0,5 ml de piridina a 0 °C. Después de agitar durante 24 h, se evaporó el disolvente a partir de la mezcla de reacción y el residuo se hizo pasar a través de una columna de sílice regular (DCM al 0-10 %:MeOH) dando compuesto **29** (2,0 mg, 83 %) como un aceite. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 800,42, hallada, 800,4. El compuesto **29** se refiere también como compuesto (III-i) anteriormente en el presente documento.

20

O-acetilo, N,O-acetal 29a. Se disolvió compuesto **29** (2 mg, 2,4 μ mol) en 0,5 ml de MeOH, a lo que se añadió una gota de HCl 4N en dioxano. Después de agitar la mezcla de reacción durante toda una noche a TA, la mezcla se concentró y el residuo se disolvió en DMSO, que se hizo pasar a través de una columna C-18 (agua (formiato de amonio 20 mM, pH 6,1): ACN (0-100 %) dando O-acetilo, N,O-acetal **29a** (1,38 mg, 75 %) como un sólido blanco (sal de formiato) después de liofilización. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 730, hallada, 730,4. O-Acetilo, N,O-acetal **29a** se refiere también como un compuesto (III-m) anteriormente en el presente documento.

25

30

N,O-Acetal 29b. El compuesto **28** (5 mg, 6 μ mol) se disolvió en MeOH, a lo que se añadió 1 gota de HCl 4N en dioxano. Después de agitar la mezcla de reacción durante 24 horas, la solución se concentró y se usó para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 687, hallada, 688,4. N,O-Acetal **29b** se refiere también como compuesto (III-n) anteriormente en el presente documento.

35

O-metilo, N,O-acetal 29c. Se disolvió N,O-acetal **29b** (aproximadamente 5 mg, 7,2 μ mol) en DMF, a lo que se añadió dimetilsulfato (3 μ l, 37 μ mol) y NaH (2 mg, 50 μ mol, al 60 % en aceite mineral) a 0 °C. Después de 1 h, la mezcla se llevó en DMSO y se hizo pasar a través de una columna C-18 (agua (formiato de amonio 20 mM, pH 6,1): ACN (0-100 %) dando O-metilo, N,O-acetal **29c** como un semisólido (0,31 mg, 5 %; mezcla que contiene un compuesto no identificado del mismo peso molecular). EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 702, hallada, 702,4. O-metilo, N,O-acetal **29c** se refiere también como un compuesto (III-k) anteriormente en el presente documento.

40

Ejemplo 3 – Esquema 3

45

Esquema 3 (**Fig. 3**) muestra un procedimiento para fabricar compuestos de acuerdo con la fórmula (II-b).

50

55

Alcohol 30. Se añadió TFA (171 ml) a una solución de (S)-*tert*-butil-1-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propan-2-ilcarbamato **20** (Erlanson y col., US 7.214.487 B2; 13,9 g, 46,9 mmol) en DCM (272 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se ca lentó a TA, y la reacción se dejó avanzar durante 25 minutos. La solución se concentró proporcionando 9,2 g de (S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propan-1-ol en bruto como un sólido blanco. A una solución de este producto en bruto y carbonato de sodio (12,4 g, 117,3 mmol) en THF (87 ml) y agua (87 ml) se añadió N-carboxitfalimida ("CEPT," 12,3 g, 56,3 mmol). Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 horas, se añadió EtOAc (150 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío dando un residuo en bruto que se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOAc al 0-100 % en hexanos dando 12,3 g de alcohol **30**. EM: (+) m/z 327,0 (M+1).

60

Triflato 31. Se añadió piridina a una solución de alcohol **30** (1 g, 3,06 mmol) en DCM anhidro (18 ml) (0,274 ml, 3,36 mmol) a -78 °C. Después de que la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 5 min, se añadió anhídrido

60

trifluorometanosulfónico (0,568 ml, 3,36 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 45 min, y después a TA durante 45 min. Después de que se filtró el precipitado, el filtrado se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con DCM produciendo 0,84 g de triflato **31**. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,10 (2H, d, J = 8,8 Hz), 7,81 (2H, m), 7,74 (2H, m), 7,36 (2H, J = 8,8 Hz), 5,13 (1H, t, J = 10,0 Hz), 4,99 (1H, m), 4,80 (1H, dd, J = 4,8, 5,6 Hz), 3,52 (1H, dd, J = 3,2, 11,2 Hz), y 3,27 (1H, dd, J = 5,6, 8,8 Hz).

Diéster 32. Se añadió metilmalonato de dietilo (0,71 ml, 4,12 mmol) gota a gota a una suspensión de hidruro de sodio (0,161 g, 60 % de dispersión en aceite mineral, 4,03 mmol) en THF anhidro (4,7 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 min, y después a TA durante 10 min. La solución resultante se añadió lentamente a una solución de triflato **31** (0,84 g, 1,83 mmol), en THF anhidro (9,4 ml) a 0 °C. Después la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante toda una noche, se añadió solución de NH₄Cl acuosa saturada (20 ml). La solución acuosa se extrajo con EtOAc y las fases combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a vacío dando un residuo. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOAc al 0-50 % en hexanos proporcionando 0,57 g de diéster **32**. EM: (+) m/z 483,3 (M+1).

Monoéster 33. Una solución de diéster **32** en HCl 6 N (10 ml) y ácido acético (10 ml) se calentó a 145 °C durante 2 días. La solución orgánica se concentró proporcionando 0,41 g de la sal clorhidrato del ácido (R)-4-amino-2-metil-5-(4-nitrofenil)pentanoico en bruto como un sólido blanco.

Se añadió 2,2-dimetoxipropano (4 ml, 32,6 mmol) a una solución de la sal clorhidrato del producto en bruto y HCl concentrado (1 ml) en MeOH anhidro (20 ml). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante toda una noche. La solución orgánica se concentró proporcionando 0,43 g de la sal clorhidrato del 4-amino-2-metil-5-(4-nitrofenil)pentanoato de (R)-metilo como un sólido blanco.

Se añadió trietilamina (0,44 ml, 3,1 mmol) a una solución de la sal clorhidrato del (R)-metil-4-amino-2-metil-5-(4-nitrofenil)pentanoato de (R)-metilo y de dicarbonato de di-*tert*-butilo (0,369 g, 1,69 mmol) en ACN (10 ml) a TA. Después de que la mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 horas, el disolvente se evaporó. Se añadió agua (20 ml), y la solución acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOAc del 0-30 % EtOAc en hexanos proporcionando 0,31 g de monoéster **33** como un sólido incoloro. EM: (+) m/z 267,3 (M-99).

Ácido carboxílico 34. Una solución de monoéster **33** (0,31 g, 0,846 mmol) en HCl 6 N se calentó a 130 °C durante 1,5 h. La solución orgánica se concentró proporcionando 0,244 g de ácido carboxílico **34** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 253,1 (M+1).

Ácido de nitro 35. El compuesto **34a** (80,4 mg, 0,149 mmol, preparado por Patterson y col. 2008) se añadió a una solución 0,2 M de pentafluorofenol (41,1 mg, 0,224 mmol) y *N, N*-diisopropilcarbodiimida ("DIC", 0,0255 ml, 0,164 mmol) en DCM (0,76 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a TA y se agitó a TA durante toda una noche. El disolvente se evaporó. Se añadió EtOAc (18 ml) y se filtró el producto en bruto, con enjuague del recipiente de reacción con EtOAc. El filtrado se concentró a presión reducida y la materia prima se usó sin purificación adicional. Se añadió DMF (0,6 ml) al producto en bruto, seguido por ácido carboxílico **34** (0,129 g, 0,448 mmol) y DIEA, (0,13 ml, 0,745 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante toda una noche y el disolvente se eliminó por evaporación. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 10-20 % en DCM conteniendo NH₄OH al 1 % proporcionando 0,11 g de ácido nítrico **35** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 773,4 (M+1).

Aminoácido 36. Una solución de ácido de nitro **35** (0,11 g, 0,142 mmol) y paladio en carbono (10 %, 15 mg) en MeOH (5 ml) se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 4 h. El catalizador se eliminó por filtración, y el filtrado se concentró proporcionando 91 mg de aminoácido **36** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 743,5 (M+1). El aminoácido **36** se refiere también como compuesto (III-b) anteriormente en el presente documento.

Éster metílico 36a. Se añadió HCl (1 gota, 37 %) a una solución de aminoácido **36** (1,9 mg, 2,5 mmol) y 2,2-dimetoxipropano ("DMP", 0,05 ml, 0,41 mol) en MeOH (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 horas y después se concentró. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 1,7 mg de éster metílico **36a** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 757,5 (M+1). El éster **36a** se representa también en esta memoria descriptiva por fórmula (III-t).

Ejemplo 4 – Esquema 4

El Esquema 4 (**Fig. 4**) muestra un procedimiento para unir engarces de peptidilo y grupos funcionales reactivos a compuestos de la presente invención, lista para conjugación.

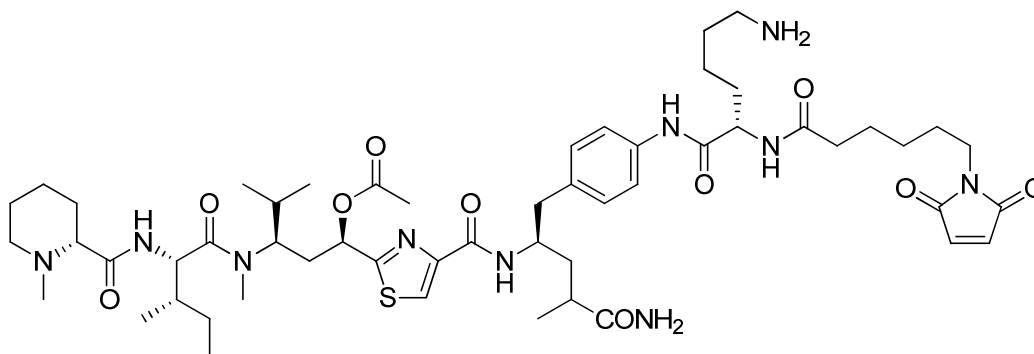
Compuesto 37. Una solución de DIEA, Fmoc-Lys(Boc)-OH (17,3 mg, 0,037 mmol), y HATU (12,8 mg, 0,0336 mmol) en DMF (0,3 ml) se agitó a TA durante 5 min. El pH de la solución se mantuvo entre 8 y 9. Después se añadió una solución de aminoácido **36** (25 mg, 0,0336 mmol) en DMF (2 ml) y se añadió DIEA a la mezcla de reacción, manteniendo el pH

entre 8 y 9. Después de agitar a TA durante 15 min, se añadió solución de NH_4Cl saturada (5 ml) desactivando la reacción. La solución acuosa se extrajo con EtOAc, y las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-20 % en DCM proporcionando 36,1 mg de compuesto **37**. EM: (+) m/z 1193,6 (M+1).

Compuesto 38. Se añadió piperidina a una solución de compuesto **37** (36,1 mg, 0,0302 mmol) en DMF (2 ml), manteniendo el pH entre 9 y 10. Después de agitar a TA durante 20 min, la solución orgánica se concentró proporcionando 29,3 mg del compuesto α -amino libre en bruto.

Se añadió DIEA a una solución de ácido 6-maleimidohexanoico (7,0 mg, 0,0332 mmol) y HATU (11,5 mg, 0,0302 mmol) en DMF (0,3 ml) manteniendo el pH entre 8 y 9. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Después se añadieron DIEA y el compuesto amino libre en bruto en DMF (2 ml), manteniendo el pH entre 8 y 9. Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 9,1 mg de compuesto **38** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 1164,6 (M+1).

Compuesto 39. Se añadió TFA (1,5 ml) a una solución de compuesto **38** (9,1 mg, 0,0078 mmol) en DCM (1,5 ml). Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 5,0 mg de la sal TFA del compuesto deseado **39** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 1064,8 (M+1). La estructura de base libre de compuesto **39** se muestra también anteriormente en el presente documento, como compuesto (VI-b). Alguna amida del compuesto 39 se aisló después como un subproducto en su preparación. EM (+) m/z 1036,6 (M+1). La amida se representa también en esta memoria descriptiva por fórmula (VI-q).



Amida del compuesto **39**

Ejemplo 5 – Esquema 5

Esquema 5 (**Fig. 5**) muestra un procedimiento para fabricar compuestos de acuerdo con la fórmula (II-b).

Aminoéster 42. Se añadió HCl 4,0 N en 1,4-dioxano (6,7 ml) a una solución de compuesto **41** (preparada por Patterson y col. 2008; 1 g, 2,66 mmol) en etanol (17 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 horas, y después se concentró proporcionando 0,82 g de aminoéster **42** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 273,3 (M+1).

Éster azido 43. Se añadieron cloruro de oxalilo (1,71 ml, 19,95 mmol) y DMF (0,33 ml, 4,26 mmol) a una solución de azido isoleucina (Lundquist y col., *Org. Lett.* **2001**, 3, 781; 0,669 g, 4,26 mmol) en hexanos (176 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h, se filtró y se concentró proporcionando el cloruro de ácido. El cloruro de ácido y DIEA (2,32 ml, 13,3 mmol) reañadieron a una solución de aminoéster **42** (0,82 g, 2,66 mmol) en DCM (26,7 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y se agitó a TA durante toda una noche. Se añadió salmuera desactivando la reacción, y la solución acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOH al 0-50 % en hexanos proporcionando 0,86 g de éster azido **43** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 412,3 (M+1).

Compuesto de trietilsililo 44. Se añadieron 2,6-lutidina (1,22 ml, 10,45 mmol) y trifluorometilsulfonato de trietilsililo (1,14 ml, 5,02 mmol) a una solución de éster azido **43** (0,86 g, 2,09 mmol) en DCM (11 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a TA durante 1 h, y después se agitó a TA durante una hora adicional. Se añadió salmuera desactivando la reacción, y la solución acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice eluyendo con un gradiente de EtOAc al 0-30 % en hexanos proporcionando 1,1 g de compuesto de trietilsililo **44**. EM: (+) m/z 526,4 (M+1).

Compuesto de N-metilo 45. Una solución de compuesto de trietilsililo **44** (1,04 g, 1,98 mmol) en THF (6,5 ml) se enfrió a -45 °C, y se añadió hexametildisilazida de potasio (0,5 M en tolueno, 4,75 ml, 2,37 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 20 minutos a -45 °C. Se añadió yoduro de metilo (0,37 ml, 5,94 mmol), y la mezcla de reacción se dejó

calentar a TA durante 4 horas tiempo al cual la reacción se desactivó con etanol (10 ml). El producto en bruto se diluyó con EtOAc y se lavó con salmuera, y la fase acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOAc al 0-30 % en hexanos proporcionando 0,91 g de compuesto de N-metilo **45**. EM: (+) m/z 540,4 (M+1).

Compuesto 46. Una solución de compuesto de N-metilo **45** (1,0 g, 1,85 mmol) en AcOH deoxigenado/H₂O/THF (65 ml, 3:1:1, v/v/v) se agitó a TA durante 36 h. Se añadió tolueno (250 ml) y la solución se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOAc al 0-100 % en hexanos proporcionando 0,46 g de compuesto **46** como aceite. EM: (+) m/z 426,3 (M+1).

Éster metílico 47. Se añadió hexametildisilazida de potasio ("KHMDS," 0,5 M en tolueno, 2,54 ml, 1,27 mmol) a una solución de compuesto **46** (0,45 g, 1,06 mmol) en THF (5 ml) a -78 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a -78 °C. Se añadió yoduro de metilo (0,2 ml, 3,18 mmol), y la mezcla de reacción se dejó calentar a -20 °C durante 2 horas tiempo al cual la reacción se desactivó con solución de NH₄Cl saturada. La fase acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOAc al 0-50 % en hexanos proporcionando 0,41 g de compuesto **47** como un aceite incoloro. EM: (+) m/z 440,3 (M+1).

Compuesto 48. A una solución de D-Mep (0,45 g, 3,14 mmol) en EtOAc (10 ml) se añadieron pentafluorofenol (0,64 g, 3,47 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida ("DCC", 0,72 g, 3,47 mmol). Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante toda una noche, el precipitado se filtró, y se lavó con EtOAc. Al filtrado resultante se añadió compuesto **47** (0,46 g, 1,05 mmol) y paladio en carbono (10 %, 0,36 g). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante toda una noche. El catalizador se filtró aparte, y después el filtrado se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-5 % en EtOAc proporcionando 0,43 g de compuesto **48** como un aceite incoloro. EM: (+) m/z 539,4 (M+1).

Ácido carboxílico 49. A una solución de compuesto **48** (0,43 g, 0,80 mmol) en 1,4-dioxano deoxigenado (8 ml) se añadió solución acuosa de hidróxido de litio deoxigenada (0,6 M, 4 ml) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 horas, y después se concentró a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 10-30 % en DCM conteniendo NH₄OH al 1 % proporcionando 0,3 g de ácido carboxílico **49** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 511,4 (M+1).

Ácido de nitro 50. Se añadió ácido carboxílico **49** (80 mg, 0,157 mmol) a una solución 0,2 M de pentafluorofenol (43,3 mg, 0,235 mmol) y DIC (0,0269 ml, 0,173 mmol) en DCM (0,8 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a TA, y se agitó a tal temperatura durante toda una noche. El disolvente se evaporó. Se añadió acetato de etilo (18 ml), y el producto en bruto se filtró, con enjuague de EtOAc del recipiente de reacción. El filtrado se concentró a presión reducida, y la materia prima se usó sin purificación adicional. Se añadió DMF (0,6 ml) al producto en bruto, seguido por ácido carboxílico **34** (0,136 g, 0,47 mmol) y DIEA (0,137 ml, 0,785 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante toda una noche, y el disolvente se evaporó después a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH 10-20 % en DCM conteniendo NH₄OH al 1 % proporcionando 0,1 g de ácido de nitro **50** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 745,4 (M+1).

Aminoácido 51. Una mezcla de ácido de nitro **50** (0,1 g, 0,134 mmol) y paladio en carbono (10 %, 14 mg) en MeOH (5 ml) se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 4 horas. El catalizador se filtró aparte, y el filtrado se concentró a vacío proporcionando 87,3 mg de aminoácido **51** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 715,5 (M+1). El aminoácido **51** se refiere también como compuesto (III-j) anteriormente en el presente documento.

Ejemplo 6 – Esquema 6

El Esquema 6 (**Fig. 6**) muestra un procedimiento para fabricar compuestos de acuerdo con la fórmula (II-b).

Compuesto de nitro hidroxilo 52. El compuesto **27** (Esquema 2) (16,4 mg, 0,0275 mmol), se añadió a una solución 0,2 M de pentafluorofenol (7,6 mg, 0,0413 mmol) y DIC (0,0094 ml, 0,0606 mmol) en DCM (0,2 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a TA, y se agitó a TA durante toda una noche. El disolvente se evaporó. Se añadió EtOAc (3 ml) y el producto en bruto se filtró, con aclarado del recipiente de reacción con EtOAc. El filtrado se concentró a presión reducida, y el producto en bruto se usó sin purificación adicional. Se añadió DMF (0,1 ml) al producto en bruto, seguido por ácido carboxílico **34** (Esquema 3) (20,8 mg, 0,083 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,024 ml, 0,138 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante toda una noche, y el disolvente se evaporó después. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-10 % en DCM proporcionando 14,9 mg de compuesto de nitro hidroxilo **52** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 831,5 (M+1).

Compuesto de nitro acetilo 53. Una solución 0,1 M de compuesto de nitro hidroxilo **52** (14,9 mg, 0,018 mmol) en piridina (0,23 ml) se enfrió a 0 °C y se añadió anhídrido acético (0,054 ml, 0,57 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a TA durante 2 h y se agitó a TA durante 24 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió la mezcla 1:1 de 1,4-dioxano y agua. La mezcla de reacción se dejó calentarse a TA, seguido por agitación a esta temperatura durante

12 horas. El disolvente se evaporó, y el residuo se purificó por HPLC preparativa proporcionando 2,2 mg de compuesto de nitro acetilo **53** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 873,2 (M+1).

5 *Compuesto de acetilamino 54.* Una mezcla de compuesto de nitro acetilo **53** (2,2 mg, 0,0025 mmol) y paladio en carbono (10 %, 1 mg) en metanol (0,2 ml) se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 4 h. El catalizador se eliminó por filtración y el filtrado se concentró. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 0,1 mg de compuesto nitro acetilo **54** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 843,2 (M+1). El compuesto acetilamino **54** se refiere también como compuesto (III-a) anteriormente en el presente documento.

10 *Ejemplo 7 – Esquema 7*

El Esquema 7 (**Fig. 7**) muestra aún otro procedimiento para fabricar compuestos de la presente invención.

15 *Compuesto 55.* El compuesto **34a** (Esquema 3) (70 mg, 0,13 mmol) se añadió a una solución 0,2 M de pentafluorofenol (35,9 mg, 0,195 mmol) y DIC (0,0223 ml, 0,143 mmol) en DCM (0,66 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a TA y se agitó a TA durante toda una noche. El disolvente se evaporó. Se añadió EtOAc (16 ml) y el producto en bruto se filtró, con enjuague del recipiente de reacción con EtOAc. El filtrado se concentró a presión reducida, y la materia prima se usó sin purificación adicional. Se añadió DMF (0,5 ml) al producto en bruto, seguido por p-nitrofenilalanina (82,0 mg, 0,9 mmol) y DIEA (0,114 ml, 0,65 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante toda una noche, y el disolvente se evaporó después. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 10-20 % en DCM conteniendo NH₄OH al 1 % proporcionando 65,2 mg de compuesto **55** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 731,0 (M+1).

20 *Compuesto 56.* Una mezcla de compuesto **55** (65,2 mg, 0,089 mmol) y paladio en carbono (10 %, 9,4 mg) en MeOH (3 ml) se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 4 h. El catalizador se filtró aparte y el filtrado se concentró proporcionando 33,8 mg de compuesto **56** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 701,2 (M+1). El compuesto **56** se refiere también como compuesto (III-d) anteriormente en el presente documento.

25 *Ejemplo 8 – Esquema 8*

30 El Esquema 8 (**Fig. 8a**) muestra un procedimiento para fabricar un compuesto de acuerdo con la fórmula (VIII-b), útil como un intermedio para fabricar compuestos de la presente invención.

35 *Éster de Boc 58.* A una solución de éster de amino **57** (Chem-Impex, 5 g, 19,18 mmol) y dicarbonato de di-*tert*-butilo ("Boc)₂O," Aldrich, 4,6 g, 21,10 mmol) en DMF (Acros, anhidro, 50 ml), se añadió trietilamina ("TEA," Aldrich, 8,36 ml, 60 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h. El análisis de HPLC mostró que la reacción se completó. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (500 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (200 ml) y después salmuera (200 ml), se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró. El producto en bruto se purificó en columna CombiFlash de 120 g con MeOH al 0-5 % en DCM proporcionando éster de Boc de sólido blanco **58** (5,6 g, 81 %). RMN-¹H (DMSO) δ 8,18 (d, 2 H), 7,47 (d, 2 H), 7,38 (d, 1 H), 4,23 (m, 1 H), 3,60 (s, 3 H), 3,15 (m, 1 H), 2,95 (m, 1 H), 1,23 (s, 9 H).

40 *Alqueno 59.* Una solución de éster de Boc **58** (230 mg, 0,68 mmol) en DCM (Acros, anhidro, 2 ml) se enfrió a -78 °C en hielo seco-acetona, se añadió DIBAL (Aldrich, 1 M en DCM, 1 ml) lentamente. La mezcla de reacción se agitó y se calentó hasta -20 °C durante 3 h. Se añadió (1-etoxi carbonilethiliden)-trifenilfosforano (Aldrich, 492 mg, 1,36 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -20 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml) y los productos orgánicos resultantes se lavaron con agua (50 ml) y después con salmuera (50 ml), se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron. El producto en bruto se purificó en columna de COMBIFLASH™ de 10 g con EtOAc al 0-50 % en hexano proporcionando alqueno sólido blanco **59** (151 mg, 59 %). RMN-¹H (DMSO) δ 8,18 (d, 2 H), 7,47 (d, 2 H), 7,22 (d, 1 H), 6,51 (d, 1 H), 4,48 (m, 1 H), 4,11 (c, 2 H), 2,80-2,94 (m, 2 H), 1,62 (s, 3 H), 1,23 (s, 9 H), 1,16 (t, 3 H).

45 *Arilamina 60.* Una solución de alqueno **59** (148 mg, 0,39 mmol) en EtOH (Acros, anhidro, 3 ml) y Pd en carbón activo (Aldrich, al 10 %, 50 mg) se agitó en H₂ durante toda una noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (10 ml) y se filtró a través de CELITE™. El filtrado se concentró y el producto en bruto se purificó en columna COMBIFLASH™ de 4 g con MeOH al 0-20 % en DCM proporcionando arilamina **60** como un sólido blanco (102 mg, 75 %). RMN-¹H (DMSO) δ 7,18 (d, 2 H), 7,11 (s, 2 H), 6,71 (d, 1 H), 3,98 (c, 2 H), 3,51 (m, 1 H), 2,57 (m, 2 H), 2,41 (m, 1 H), 1,63 (m, 1 H), 1,37 (m, 1 H), 1,29 (s, 9 H), 1,09 (t, 3 H), 0,99 (d, 3 H), EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 351,2, hallada 351,2.

50 *Ejemplo 9 – Esquema 9*

55 El Esquema 9 (**Fig. 8b**) muestra otro procedimiento para fabricar un compuesto de acuerdo con fórmula (VIII-b), útil como un intermedio para fabricar compuestos de la presente invención.

60 *Aminoácido 61.* Una mezcla de ácido carboxílico **24** (Esquema 3, **Fig. 3**) (4,4 mg, 0,0025 mmol) y paladio en carbono (10 %, 1 mg) en MeOH (0,5 ml) se agitó a una atmósfera de hidrógeno durante toda una noche. El catalizador se eliminó por filtración, y el filtrado se concentró proporcionando 3,5 mg de aminoácido **61** como un sólido blanco. EM:

(+) m/z 223,3 (M+1).

Ejemplo 10 – Esquemas 10, 11, y 12

- 5 El Esquema 10 (**Fig. 8c**) muestra otro procedimiento para fabricar un compuesto de acuerdo con la fórmula (VIII-b), útil como un intermedio para fabricar compuestos de la presente invención.

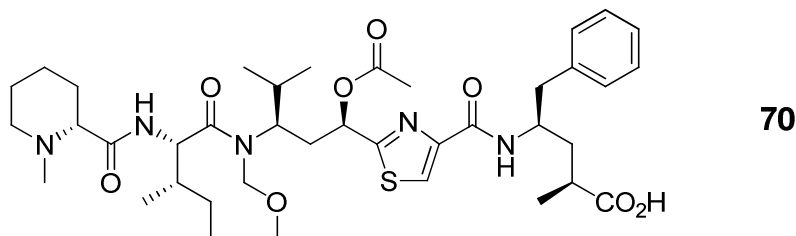
10 **Compuesto 62.** Una mezcla de monoéster **33** (Esquema 3, **Fig. 3**) (0,34 g, 0,93 mmol) y paladio en carbono (al 10 %, 50 mg) en metanol (20 ml) se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante toda una noche. El catalizador se filtró, y el filtrado se concentró proporcionando 0,29 g de compuesto **62** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 237,3 (sin Boc).

15 El Esquema 11 (**Fig. 9**) ilustra como los compuestos de acuerdo con la fórmula (VIII-b) se pueden usar para fabricar compuestos de la presente invención. El éster de Boc **62** se convierte a éster de Bpoc **62a** protegiendo primero el grupo amina aromático con un grupo Fmoc, tratamiento con TFA eliminando el grupo Boc del grupo de amina alifática, tratamiento con éster α,α -dimetil-p-fenilbencil-fenílico del ácido carbónico (8Cl) instalando un grupo de Bpoc allí, y para eliminación del grupo Fmoc con piperidina. El éster de Bpoc **62a** está acoplado con ácido carboxílico **63** con HATU proporcionando un éster intermedio que se hidroliza después con LiOH produciendo compuesto **64**. La hidrogenación eliminando el grupo protector Cbz del compuesto **64**, seguido por acoplamiento mediado por HATU con ácido 6-maleimidohexanoico y eliminación del grupo Bpoc con ácido acético produce aminoácido **65**. Otro acoplamiento mediado por HATU con compuesto **34a** (Esquema 3, **Fig. 3**) proporciona compuesto **66**. La eliminación del grupo protector de Boc con TFA proporciona compuesto **67**, listo para conjugación.

20 Aún se muestra otro modo de utilizar compuestos de fórmula (VIII-b) en Esquema 12 (**Fig. 10**). Partiendo del compuesto **34a**, el acoplamiento mediado por HATU con compuesto **68** proporciona éster de Boc **69**. La eliminación del grupo Boc con TFA y la hidrólisis del éster con LiOH proporcionan aminoácido **36**, que puede elaborarse como se muestra en el Esquema 4 (**Fig. 4**) preparando una composición adecuada para conjugación.

Ejemplo 11 – Compuesto 70

- 30 **Compuesto 70.** Tubulisina D (fabricada por Peltier y col. 2006; 2 mg, 2,4 μ mol) se disolvió en MeOH a 0 °C. A esta solución se añadió una gota de HCl (0,1 M). Después de agitar la mezcla de reacción durante toda una noche a TA la solución se evaporó en el vacío dando un residuo que se hizo pasar a través de una columna corta (DCM:MeOH al 0-10 %) dando compuesto **70** (1,3 mg, 1,6 μ mol, 67 %) como un aceite. EM (ES+) m/z, calculada: m+1, 772,42, hallada, 772.



Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la metodología general de los Esquemas se puede adaptar para fabricar compuestos de la presente invención distintos de aquellos específicamente descritos anteriormente. Por ejemplo, el compuesto **14** (el mismo que el compuesto **49**) se puede usar para hacer numerosos otros compuestos de la presente invención acoplándolo con otros reemplazos para la subunidad Tup. Como otro ejemplo, cambiando los reactivos usados con el compuesto **9** (Esquema 1), compuestos **44** y **46** (Esquema 5), se pueden sintetizar variaciones en grupos R^2 y R^3 en fórmula (II) más allá de aquellos específicamente ejemplificados.

45 **Ejemplo 12 – Preparación de un Conjugado**

El presente ejemplo describe la preparación de un conjugado de construcción de citotoxina-engarce (VI-b) y anticuerpo monoclonal anti-CD70 2H5 (Terrett y col., US 2009/0028872 A1; Coccia y col., WO 2008/074004 A2). Es representativo del procedimiento usado en la preparación de otros conjugados.

50 El anticuerpo anti-CD70 2H5 a ~5 mg/ml en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 50 mM, DTPA 100 μ M, pH 7,5, se tióló con un exceso molar de 13 veces de 2-iminotiolano. La reacción de tiolación se dejó avanzar durante 1 hora a TA con mezclado continuo.

55 Tras tiolación, se intercambió el tampón del anticuerpo en tampón de conjugación (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, DTPA 2 mM, pH 6,0) por medio de una columna PD10 (Sephadex G-25). La concentración del anticuerpo tiolado se determinó a 280 nm. La concentración de tiol se midió usando un ensayo de ditiodipiridina.

Una reserva de construcción 5 mM (VI-b) en DMSO se añadió a un exceso molar de 3 veces por tiol de anticuerpo y se mezcló durante 90 minutos a TA. Tras la conjugación, N-etilmaleimida 100 mM en DMSO se añadió a un exceso molar de tiol de 10 veces por anticuerpo desactivando cualesquiera grupos tiol. Esta reacción de desactivación se hizo durante una hora a TA con mezclado continuo.

5 El conjugado del fármaco con anticuerpo anti-CD70 se filtró a través de un tamiz de 0,2 μm antes de purificación cromatográfica de intercambio de cationes. La columna de intercambio de Cationes de Alta Resolución (CEX) de SP SEFAROSA™ se regeneró con 5 volúmenes de columna (CV) de HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 1M, pH 6,0. Tras regeneración, la columna se equilibró con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibración (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, pH 6,0). El conjugado se cargó y la columna y se lavó una vez con el tampón de equilibración. El conjugado se eluyó con HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 200 mM, pH 6,0. El eluato se recogió en fracciones. La columna se regeneró después con HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 1M, pH 6,0 retirando agregados de proteína y cualquier construcción no reaccionada (VI-b).

15 Las fracciones que contienen conjugado monomérico de anticuerpo se almacenaron. La concentración de conjugado de anticuerpo y las proporciones de sustitución se determinaron midiendo absorbancia a 280 y 252 nm.

La reserva de eluato purificado se intercambió en sacarosa 30 mg/ml, glicina 10 mg/ml, pH 6,0 por diálisis. El dextrano 40 se añadió a la muestra a 10 mg/ml tras diálisis. La concentración de conjugado de anticuerpo y la proporción de sustitución (SR) se determinaron midiendo absorbancia a 280 y 252 nm. La SR fue 2,2 moles de citotoxina por mol de anticuerpo.

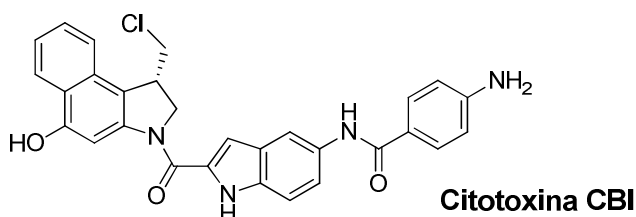
Ejemplo 13 – Ensayos de Proliferación

25 El presente ejemplo generalmente describe los procedimientos usados para ensayar la actividad antiproliferativa de compuestos de la presente invención en sus conjugados. Las líneas celulares tumorales humanas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, EE.UU. y se cultivaron de acuerdo con la instrucción de la ATCC. Las células se sembraron a $1,0 \times 10^3$ o $1,0 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 3 horas para ensayos de ATP o ensayos de ^3H -timidina, respectivamente. Se añadieron a los pocillos diluciones seriadas 1:3 de compuestos libres (no conjugados) o sus conjugados. Las placas se dejaron incubar de 24 a 72 horas. Las placas de ^3H -timidina se sometieron a pulsos con 1.0 μCi de ^3H -timidina por pocillo durante las últimas 24 horas del periodo de incubación total, se cosecharon, y se leyeron en un Contador de Centelleo Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Los niveles de ATP en placas de ATP se midieron usando el kit de Viabilidad Celular Luminiscente CELLTITER-GLO® siguiendo el manual del fabricante y se leyeron en un luminómetro GLOMAX® 20/20 (ambos de Promega, Madison, WI, EE.UU.). Los valores CE_{50} –la concentración a la que el agente inhibe o reduce la proliferación celular en un 50 %- se determinaron usando software PRISM™, versión 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

Ejemplo 14 – Actividad In Vitro de Citotoxina

40 Usando la ^3H -timidina o el ensayo de luminiscencia de ATP, o ambos, las actividades de los compuestos de la presente invención se ensayaron contra las siguientes líneas celulares de cáncer: HCT-15 (cáncer colorrectal, multirresistente a fármacos (MDR)); Hep3B (cáncer de hígado); LNCaP (cáncer de próstata, positivo en receptor de andrógenos (AR^+)); MDA-MB-231 (cáncer de mama, negativo en receptor de estrógeno, receptor de progesterona y Her2 (triple negativo)); 45 A2058 (melanoma); U-87 MG (glioblastoma); NCI-H460 (NSCLC); A549 (NSCLC); HPAC (cáncer pancreático, primario); PC3 (cáncer de próstata, AR^-); BT474 (cáncer de mama, altamente positivo a Her2 (Her2hi)); SKOV3 (cáncer ovárico, Her2hi); 786-0 (cáncer renal); UO-31 (cáncer renal, MDR); NCI-H740 (SCLC); DMS53 (SCLC); SK-BR3 (cáncer de mama, Her2hi); ZR-75 (cáncer de mama, positivo en receptor de estrógenos); OVCAR3 (cáncer ovárico); HL-60 (APL); OVCAR8/Adr (cáncer ovárico, MDR); CEM-C1 (ALL); Nomo-1 (AML); RPMI-8226 (MM); Raji (linfoma); SW-480 (cáncer colorrectal, metastásico); SW-620 (cáncer colorrectal); y H226 (cáncer de pulmón). (No todos los compuestos se ensayaron contra todas las líneas celulares).

Los siguientes compuestos se usaron como referencia o citotoxinas de comparación: doxorrubicina (Dox), Citotoxina CBI (un agente alquilante de surco menor de ADN de la clase ciclopropa[c]benz[o]indol-4-ona, tubulisina D (Tub D, 55 Tabla 1) y el éster metílico de MMAF ("MMAF", un compuesto relacionado con auristatina; véase Sutherland y col., *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (15), 10540-10547).



Figs. 11a y 11b muestran planes ilustrativos para ensayos de proliferación de ³H-timidina para compuestos de la presente invención, contra células HL-60 y 786-0, respectivamente, con Citotoxina CBI y tubulisina D como compuestos comparativos, con un periodo de incubación de 48 horas.

5 **Figs. 12a y 12b** muestran planes ilustrativos para ensayos de proliferación de luminiscencia de ATP para un segundo grupo de compuestos de la presente invención, contra células HL-60 y 786-O, respectivamente, con un periodo de incubación de 72 horas. **Figs. 12c y 12d** muestran los trazados para ensayos de proliferación con ³H-timidina para el mismo grupo de compuestos, de nuevo contra células HL-60 y 786-O, respectivamente, con un periodo de incubación de 72 horas. En cada caso, se usó doxorubicina como un compuesto comparativo.

10 La tabla 2 proporciona los datos para ensayos de proliferación usando el procedimiento de la ³H-timidina, con un periodo de incubación de 72 horas.

Tabla 2 (Parte 1) – Ensayos de Proliferación con ³ H-Timidina							
Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	HCT-15	Hep3B	LNcaP	MDA-MB-231	A2058	U-87 MG	NCI-H460
Dox	149	44	130	133	—	106	101
CBI	0,040	0,020	0,051	0,019	—	0,14	0,042
Tub D	0,062	0,022	0,36	0,091	—	0,014	0,032
MMAF	1,3	0,11	1,7	0,29	—	0,12	0,37
15	67	1,6	27	1,3	1,6	0,42	2,0
16	284	>100	>100	>100	>100	>100	>100
17	392	>100	>100	84	>100	12	>100
19	1067	52	>100	—	0,13	>100	>100
24	704	32	76	33	0,12	18	>100
25	280	305	930	236	409	271	306
26	31	18	>3000	15	25	5,2	18
51	101	4,2	41	8,7	0,40	0,75	7,2
26a	>100	36	80	>100	>100	71	>100
28	223	24	64	>100	0,96	>100	>100
29	0,18	0,041	0,54	0,13	0,40	0,064	0,21
29c	2,4	3,0	5,2	4,8	5,6	0,51	15
36	64	39	342	>100	60	15	52
51	101	4,2	41	8,7	0,40	0,75	7,2
54	0,44	0,30	16	1,6	0,64	0,11	0,31
56	2477	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Tabla 2 (Parte 2) – Ensayos de Proliferación con ³ H-Timidina							
Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	A549	HPAC	PC3	BT474	SKOV3	786-0	UO-31
Dox	128	126	276	424	163	168	267
CBI	0,072	0,063	0,049	1,2	0,047	0,035	0,035
Tub D	0,014	0,015	0,038	0,51	0,039	0,15	0,10
MMAF	0,21	0,29	0,38	1,7	0,24	1,4	7,3
(III-q)	—	—	—	—	—	—	—
15	2,1	3,0	1,7	7,1	2,6	—	15
16	>100	>100	>100	>100	44	19	>100
17	>100	>100	82	>100	91	32	>100
19	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
24	38	>100	63	>100	68	>100	>100
25	270	206	319	804	180	1862	435
26	18	11	16	11	4,6	26	50
26a	>100	>100	>100	7	47	>100	>100
28	>100	34	>100	>100	9,9	61	>100
29	0,44	0,069	0,21	0,57	0,029	1,2	0,13
29c	6,5	32	11	12	1,9	3,9	1,0
36	44	83	66	>100	32	>100	>100
51	7,8	6,4	5,6	30	4,4	10	35
54	0,24	0,83	0,82	8,8	0,34	6,9	1,3
56	>100	>100	>100	>100	>100	29	>100

Tabla 2 (Parte 3) – Ensayos de Proliferación con ³ H-Timidina							
Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	NCI-H740	DMS53	SK-BR3	ZR-75	OVCAR3	HL-60	OVCAR8
Dox	255	979	—	794	258	56	2044
CBI	0,098	1,5	—	1,5	0,071	0,027	0,16
Tub D	2,2	0,21	—	1,7	0,051	0,032	0,17
MMAF	13	10	—	42	0,16	0,25	25
(III-q)	—	—	—	—	—	15,05	—
15	2,3	37	17	—	>100	0,60	423
16	>100	>100	>100	>100	>100	8,9	1869
17	32	>100	>100	>100	>100	17	2970
19	3,8	>100	>100	34	53	37	69
24	51	>100	>100	3,6	90	6,9	>100
25	347	515	1714	>3000	379	308	946
26	3,0	99	32	>300	3,2	0,45	201
26a	3,2	>100	158	56	21	10	100
28	5,8	>100	>100	4,3	3,1	7,7	27
29	0,41	0,28	1,1	3,8	0,02	0,0099	0,70
29c	5,3	76	72	44	3,6	1,8	1,4
36	>100	>100	>100	>100	>100	107	>100
51	37	24	>100	1,3	2,5	4,2	20
54	10	2,0	1,1	2,2	3,9	0,53	2,1
56	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>3000

Tabla 2 (Parte 4) – Ensayos de Proliferación con ³ H-Timidina							
Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	CEM-C1	Nomo-1	RPMI-8226	Raji			
Dox	144	105	68	61			
CBI	0,11	0,016	0,12	0,013			
Tub D	0,018	0,042	0,037	0,013			
MMAF	0,17	0,27	0,24	0,12			
15	0,93	2,3	3,3	0,47			
16	11	1,8	22	28			
17	43	6,8	47	53			
19	22	1,3	23	32			
24	13	1,1	17	11			
25	225	116	396	231			
26	22	0,36	7,7	7,0			
26a	10	2,0	22	20			
28	10	0,20	8,7	13			
29	0,019	0,0075	0,034	0,024			
29c	45	0,43	16	8,5			
36	44	124	48	15			
51	2,0	3,5	2,2	1,5			
54	0,38	0,77	0,36	0,20			
56	>100	>100	>100	>100			

La Tabla 3 proporciona los datos para los ensayos de proliferación de luminiscencia de ATP, con un periodo de incubación de 48, 72, o 96 h, como se destaca.

5

Tabla 3 (Parte 1) – Ensayos de Proliferación de Luminiscencia de ATP (Periodo de Incubación como se Destaca)							
Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	HCT-15 (48 h)	Hep3B (48 h)	MDA-MB-231 (48 h)	A2058 (48 h)	NCI-H460 (48 h)	A549 (48 h)	PC3 (48 h)
Dox	—	443	—	—	—	149	1082
CBI	—	2,6	—	—	—	3,0	12
Tub D	—	0,0012	—	—	—	0,020	0,039
MMAF	—	0,053	—	—	—	0,33	0,43
15	40	6,3	5,6	3,5	6,7	—	>100
16	157	26	28	30	69	—	>100
17	443	>100	65	30	69	—	>100
19	—	18	—	—	—	—	~33
24	—	10	—	—	—	—	13
28	—	17	—	—	—	—	5,8
29	—	1,6	—	—	—	3,9	3,4

ES 2 525 351 T3

25	—	246	—	—	—	111	155
26	113	100	120	93	—	—	>3000
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	—	17	—	—	—	—	5,8
29	—	1,6	—	—	—	3,9	3,4
29c	200	75	52	32	—	—	66
36	—	86	—	—	—	1,9	78
51	—	3,8	—	—	—	—	16
54	—	1,5	—	—	—	3,0	3,1
56	>3000	>100	>100	>100	>100	—	>100

Tabla 3 (Parte 2) – Ensayos de Proliferación de Luminiscencia de ATP (Periodo de Incubación como se Destaca))

Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	BT474 (48 h)	SKOV3 (48 h)	786-0 (48 h)	UO-31 (48 h)	DMS53 (48 h)	SK-BR3 (48 h)	ZR-75 (48 h)
Dox	—	674	360	908	—	—	—
CBI	—	3,0	1,6	4,2	—	—	—
Tub D	—	0,029	0,022	0,099	—	—	—
MMAF	—	0,19	0,71	2,6	—	—	—
15	3,5	4,2	—	—	32	3,9	13
16	19	18	—	—	50	6,6	11
17	23	58	—	>100	~80	24	24
19	8,8	—	—	>100	—	3,9	20
24	4,6	—	—	13	—	8,9	8,4
28	12	—	—	5,8	—	7,8	16
29	1,5	—	—	2,7	5,3	3,6	15
25	166	—	—	759	366	>3000	1003
26	19	—	—	240	—	253	208
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	12	—	—	5,8	—	7,8	16
29	1,5	—	—	2,7	5,3	3,6	15
29c	492	—	—	26	—	278	136
36	~120	—	—	8,8	~300	>300	>300
51	11	—	—	>100	—	13	19
54	4,8	—	—	—	7,9	6,2	9,6
56	>100	>100	—	—	>100	>100	>100
84a	—	—	6,12	—	—	—	—
84b	—	—	4,10	—	—	—	—
109	—	—	1,03	—	—	—	—

Tabla 3 (Parte 3) – Ensayos de Proliferación de Luminiscencia de ATP (Periodo de Incubación como se Destaca))

Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	OVCAR3 (48 h)	HL-60 (48 h)	CEM-C1 (48 h)	Nomo-1 (48 h)	RPMI-8226 (48 h)	HCT-15 (72 h)	LNCaP (72 h)
Dox	632	—	—	—	—	600	592
CBI	4,1	—	—	—	—	3,4	3,3
Tub D	0,085	—	—	—	—	0,014	0,093
MMAF	0,17	—	—	—	—	0,075	0,98
15	>100	—	—	—	—	—	—
16	>100	—	—	—	—	—	—
17	>100	—	—	—	—	—	—
19	25	—	—	—	—	245	—
24	29	—	—	—	—	188	—
25	>3000	224	—	83	—	366	—
26	—	—	61	3,9	45	—	412
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	14	—	—	—	—	132	—
29	>100	0,59	—	0,24	—	4,5	—
29c	—	—	20	2,9	70	—	255
36	>300	114	—	34	—	96	>300
36a	—	0,048	—	—	—	—	—
51	5,5	—	—	—	—	93	—
54	>100	2,5	—	3,1	—	2,6	11
56	>100	—	—	—	—	—	—
84a	8,19	10-28	—	—	—	138	—
84b	4,91	16-27	—	—	—	22,8	—
109	—	0,019	—	—	—	—	—
112	—	0,05-0,09	—	—	—	—	—

ES 2 525 351 T3

Tabla 3 (Parte 4) – Ensayos de Proliferación de Luminiscencia de ATP (Periodo de Incubación como se Destaca))							
Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	MDA-MB-231 (72 h)	A2058 (72 h)	U-87 MG (72 h)	NCI-H460 (72 h)	A549 (72 h)	HPAC (72 h)	BT474 (72 h)
Dox	518	101	324	92	—	215	388
CBI	3,1	0,20	3,3	0,64	—	6,0	5,5
Tub D	0,047	0,0064	0,0054	0,0076	—	—	0,021
MMAF	0,33	0,039	0,052	0,13	—	0,067	0,024
15	—	—	8,6	—	—	—	—
16	—	—	>100	—	—	—	—
17	—	—	22	—	—	—	—
19	32	26	>100	43	—	0,33	—
24	13	14	18	23	—	1,1	—
25	202	212	357	177	—	97	—
26	—	—	94	90	—	279	—
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	16	20	18	35	—	5,9	—
29	5,1	2,9	4,9	3,0	—	4,9	—
29c	—	—	136	6,0	—	4,6	—
36	9,6	43	37	16	—	2,9	—
51	—	5,5	7,6	14	—	4,5	—
54	5,6	1,4	1,6	1,6	—	0,96	—
56	—	—	>100	—	—	—	—

Tabla 3 (Parte 5) – Ensayos de Proliferación de Luminiscencia de ATP (Periodo de Incubación como se Destaca))							
Compuesto	Línea Celular (CE ₅₀ , nM)						
	SKOV3 (72 h)	786-0 (72 h)	NCI-H740 (72 h)	DMS53 (72 h)	SK-BR3 (72 h)	ZR-75 (72 h)	OVCAR3 (72 h)
Dox	—	—	—	755	441	236	—
CBI	—	—	2,2	3,8	3,1	2,2	—
Tub D	—	—	0,022	0,069	0,025	0,034	—
MMAF	—	—	—	4,5	0,16	0,25	—
(III-q)	—	103	—	—	—	—	—
15	—	9,4	—	—	—	—	—
16	—	36	—	—	—	—	—
17	—	73	—	—	—	—	—
19	15	40	—	87	—	—	—
24	13	36	—	>100	—	—	—
25	109	306	—	—	—	—	—
26	38	126	—	193	—	—	49
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	2,9	11	0,82	10	15	36	21
29	—	0,85	—	1,0	2,1	2,7	1,5
29c	8,6	—	—	—	36	41	8,4
36	—	40	—	62	24	81	45
51	—	4,8	7,4	5,2	5,0	13	6,4
54	—	1,2	—	1,6	1,2	1,6	1,1
56	>100	>100	>100	5,7	24	>100	28
28	2,9	11	0,82	10	15	36	21
29	—	0,85	—	1,0	2,1	2,7	1,5
29c	8,6	—	—	—	36	41	8,4
36	—	40	—	62	24	81	45
51	—	4,8	7,4	5,2	5,0	13	6,4
54	—	1,2	—	1,6	1,2	1,6	1,1

Compuesto	Línea Celular y CE ₅₀ (nM)						
	HL-60 (72 h)	CEM-C1 (72 h)	Nomo-1 (72 h)	RPMI-8226 (72 h)	Raji (72 h)	SW480 (96 h)	SW-620 (96 h)
Dox	147	161	338	345	301	215	145
CBI	0,76	0,55	0,37	4,1	2,1	0,92	0,33
Tub D	0,0096	0,0030	0,013	0,0051	0,0048	0,020	0,0058
MMAF	0,12	0,11	0,14	0,068	0,084	0,17	0,057
(III-q)	14,27	—	—	—	—	—	—
15	2,7	2,6	2,7	2,6	2,5	5,6	3,7
16	2,8	2,5	3,1	15	3,0	48	29
56	>100	>100	>100	5,7	24	>100	28
17	7,4	26	3,9	15	27	92	65
19	7,7	11	5,2	9,6	9,2	52	14
24	6,4	8,7	4,0	8,4	7,9	42	10
25	—	176	—	235	209	261	193
26	27	—	—	—	46	67	48
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	2,9	11	0,82	10	15	36	21
29	—	0,85	—	1,0	2,1	2,7	1,5
29c	8,6	—	—	—	36	41	8,4
36	—	40	—	62	24	81	45
51	—	4,8	7,4	5,2	5,0	13	6,4
54	—	1,2	—	1,6	1,2	1,6	1,1
56	>100	>100	>100	5,7	24	>100	28

Adicionalmente, los siguientes valores de CE₅₀ se midieron para los siguientes compuestos contra la línea celular H226, usando el ensayo de ATP y un periodo de incubación de 72 horas: compuesto **36a** (0,307 nM); compuesto **109** (1,609 nM); y compuesto **112** (0,67-1,16 nm). Los siguientes valores de CE₅₀ se midieron para los siguientes compuestos contra la línea celular OVACAR8/Adr, usando el ensayo de ATP y periodo de incubación de 48 horas: compuesto **36a** (17,05 nM), compuesto **84a** (>300 nM); compuesto **84b** (47,2 nM); compuesto **109** (24,9 nM); y compuesto **112** (12 nM).

10 *Ejemplo 15 – Actividad In Vitro de Conjugados*

Fig. 13 muestra la actividad de conjugados de la presente invención en ensayos de proliferación que usan ³H-timidina, medidos contra células 786-0 de cáncer renal, que son positivas en CD70. El periodo de incubación fue de 72 horas. Los valores de CE₅₀ extraídos de las curvas de la **Fig. 13** se dan en la Tabla 4, junto con datos de otros experimentos. La línea celular LNCap es una línea celular de cáncer de próstata que expresa antígeno de membrana específico de próstata con (PSMA); H226 es una línea celular de cáncer de pulmón que expresa mesotelina. Los anticuerpos usados para conjugación fueron 2^aH10, un anticuerpo anti-PSMA (Huang y col., US 2009/0297438); 2H5, un anticuerpo anti-CD70 (Terrett y col., US 2009/028872); 1F4, un anticuerpo anti-CD70 (Coccia y col., WO 2008/074004); y 6^aH4, un anticuerpo antimmesotelina (Terret y col., WO 2009/045957). Como controles, el Compuesto J de Sufi y col., WO 2008/083312 ("Cpd. J", un agente de unión/alquilante de surco menor de ADN) se usó como un compañero de conjugación y la toxina diftérica ("DTX") se usó como un control no específico no conjugado.

Conjugado o Compuesto de Prueba		Línea Celular	CE ₅₀ (nM)
Designación	Descripción		
2A10-CBI	Conjugado de 2A10 y Compuesto J	786-O	116,7
DTX	Control no específico no conjugado	786-O	104,4
2H5-CBI	Conjugado de 2H5 y Compuesto J	786-O	0,08592
1F4-CBI	Conjugado 1F4 y Compuesto J	786-O	0,09951
2H5-(VI-a)	Conjugado 2H5 y Compuesto (VI-a)	786-O	0,1151 a 0,0749
2A10-(VI-a)	Conjugado de 2A210 y Compuesto (VI-a)	786-O	>> 100
2H5-(VI-b)	Conjugado de 2H5 y Compuesto (VI-b)	786-O	0,06554
2A10-(VI-b)	Conjugado de 2A10 y Compuesto (VI-b)	786-O	>> 100
2H5-(VI-n)	Conjugado de anticuerpo anti-2H5 y Compuesto (VI-n)	786-O	0,4384
2H5-(VI-m)	Conjugado de 2H5 y Compuesto (VI-m)	786-O	0,5899
2H5-(VI-q)	Conjugado de 2H5 y Compuesto (VI-q)	786-O	inactivo
2H5-(VI-p)	Conjugado de 2H5 y Compuesto (VI-p)	786-O	inactivo
2H5-(VI-t)	Conjugado de 2H5 y Compuesto (VI-t)	786-O	0,310
6A4-(VI-t)	Conjugado de 6A4 y Compuesto (VI-t)	H226	0,360
2A10-(VI-t)	Conjugado de 2A10 y Compuesto (VI-t)	LNCap	0,570

Los datos muestran que un anticuerpo específico de CD70 se necesita por un conjugado para ser capaz de administrar de forma efectiva una citotoxina a células 786-0 CD70-positivas: conjugados de anticuerpo 2A10, que es específico para un antígeno diferente (PSMA), tienen actividad baja o no tienen ninguna actividad. En cambio, todos los conjugados de un anticuerpo anti-CD70 fueron activos. Los conjugados de los Compuestos (VI-a) y (VI-b) fueron comparables en actividad a los conjugados del Compuesto J, un compañero de conjugación bien conocido y uno de cuyos conjugados está sufriendo ensayos clínicos. Es digno de mención que los conjugados de los Compuestos (VI-a) y (VI-b) muestren por separado toxicidad no específica muy pequeña: comparar las actividades de 2A10-(VI-a) y 2A10-(VI-b) frente a aquella de 2A10-CBI.

10 Ejemplo 16 – Actividad In Vitro de Conjugados

Las células 786-0 de cáncer renal humano CD70-positivas (Cat. CRL-1932 originalmente adquiridas de ATCC) se cultivaron *in vitro* por instrucciones de ATCC. Las células se recogieron, y se implantaron 2,5 millones de células por 200 μ l de DPBS/Matrigel™ (1:1) subcutáneamente en la región de los flancos de ratones CB17.SCID. Se midieron los tumores semanalmente en 3 dimensiones con un Calibrador Digital Electrónico de Fowler (Modelo 62379-531; Fred V. Fowler Co., Newton, MA, EE.UU.) y se registraron electrónicamente datos usando software StudyDirector de Studylog Inc. (San Francisco Sur, CA, EE.UU.). Los animales se sometieron a control diariamente con respecto a cambios posturales, de aclimamiento y respiratorios, así como de letargo. Los animales también se pesaron semanalmente y se sometieron a eutanasia si la pérdida de peso fue ≥ 20 %. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 194 mm³, se trataron grupos de 6 ratones cada uno con una dosis intraperitoneal (IP) individual de un conjugado de prueba (por ejemplo, 2H5-(VI-b)) y un control isotópico (2A10-(VI-b)) a un peso corporal de 0,3 μ mol/kg. Los volúmenes de tumores (LAA/2) y los pesos de los ratones se registraron a lo largo del curso de cada estudio, que se dejaron avanzar durante aproximadamente 2 meses tras la administración de dosis inicial. Se usó una macro de hoja de cálculo de Excel calculando los valores de media, desviación estándar y mediana de los tamaños de los tumores. Los datos se dibujaron en una curva usando el programa Prism versión 4.0.

El estudio de xenoinjerto resultó como se muestra en la Fig. 14, donde las etiquetas de las leyendas tienen el mismo significado que en el ejemplo anterior y que en la Fig. 13. Los datos demuestran la actividad in vivo de conjugados de compuestos de la presente invención frente a células 786-0 CD70*. Tanto conjugados de compuestos (VI-a) como conjugados de compuestos (VI-b) con el anticuerpo 2H5 anti-CD70 causaron una reducción en tamaño de tumor promedio a menos de la mitad durante el curso del estudio, mientras que, cuando se administró el control de vehículo o un conjugado con el anticuerpo 2A10 anti-PSMA, el volumen promedio de tumor subió a más del doble.

35 Ejemplo 17 – Esquema 13

El Esquema 13 (Fig. 15) muestra un procedimiento para fabricar 4-nitrotubufenilalaninas enantioméricamente puras (4-NO₂Tup) **82a** y **82b**, que son útiles para fabricar compuestos de esta invención.

Compuesto 80. Se añadió dicarbonato de di-*terc*-butilo (90,5 mg, 0,42 mmol) a una mezcla de compuesto **34** de Esquema 3 (0,1 g, 0,35 mmol) en NaOH acuoso 0,7 M (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 horas, y después se acidificó a pH 3 con HCl 5 N. Después de que la solución acuosa se extrajera con EtOAc tres veces, las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-20 % en DCM proporcionando 0,117 g de compuesto **80** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 253,1 (M+1 sin Boc).

Ésteres de (-)-mentol 81a y 81b. Se añadió DCC (87,8 mg, 0,43 mmol) a una solución de compuesto **80**, (-)-mentol (66,6 mg, 0,43 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina ("DMAP," 10,4 mg, 0,085 mmol) en DCM (1,5 ml) a TA. Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h, el precipitado se eliminó por filtración. El filtrado se concentró después. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente del 0-20 % en hexanos proporcionando 55,7 mg de éster **81a** como un sólido blanco, y 55,7 mg de éster **81b** como un sólido blanco. EM para éster **81a**: (+) m/z 391,2 (M+1 sin Boc); EM para éster **81b**: (+) m/z 391,2 (M+1 sin Boc).

4-NO₂Tup 82a y 82b. Se calentó una solución de éster **81a** en HCl 6 N (40 mg, 0,082 mmol) a 130 °C durante 1,5 h. La mezcla de reacción se concentró proporcionando 23,5 mg de 4-NO₂Tup **82a** como un sólido blanco. RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ 8,04 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,33 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 3,50 (m, 1H), 3,03 (dd, 1H, *J* = 6,8, 14,4 Hz), 2,89 (dd, 1H, *J* = 7,6 Hz, 14,4 Hz), 2,45-2,39 (m, 1H), 1,92-1,84 (m, 1H), 1,62-1,55 (m, 1H), and 0,98 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz); EM: (+) m/z 253,1 (M+1). 4-NO₂Tup **82b** se obtuvo por el mismo procedimiento en la misma escala como un sólido blanco (23,5 mg). RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ 8,03 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,33 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 3,50 (m, 1H), 2,93 (dd, 2H, *J* = 2,0, 7,6 Hz), 2,54-2,48 (m, 1H), 1,86-1,78 (m, 1H), 1,60-1,53 (m, 1H) y 0,98 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz); EM: (+) m/z 253,1 (M+1).

60 Ejemplo 18 – Esquema 14

El Esquema 14 (Fig. 16) representa la conversión de 4-NO₂Tup **82a** y **82b** en compuestos de la invención.

Ácido de nitro 83a. Se añadió Compuesto **34a** de Esquema 3 (10 mg, 0,019 mmol) a una solución 0,2 M de pentafluorofenol (5,1 mg, 0,028 mmol) y *N,N*-diisopropilcarbodiimida ("DIC," 0,0032 ml, 0,021 mmol) en DCM (0,2 ml)

- a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a TA y se agitó a tal temperatura durante toda una noche. El disolvente se evaporó. Se añadió EtOAc (1,8 ml), t se filtró el producto en bruto, con aclarado del recipiente de reacción con EtOAc. El filtrado se concentró a presión reducida, y el pentafluorofenilo en bruto se usó sin purificación adicional. Se añadió DMF (0,2 ml) al éster en bruto, seguido por 4-NO₂Tup **82a** (10,7 mg, 0,037 mmol), y DIEA (0,013 ml, 0,074 mmol). La
- 5 mezcla de reacción se agitó a TA durante toda una noche, y el disolvente se eliminó por evaporación después. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-20 % conteniendo NH₄OH al 1 % en DCM proporcionando 12,9 mg de ácido de nitró **83a** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 773,4 (M+1).
- 10 *Ácido de nitró **83a** de vía alternativa:* se añadió DIEA a una solución de compuesto 34a (10 mg, 0,019 mmol) y HATU (7,8 mg, 0,020 mmol) en DMF (0,3 ml), manteniendo el pH a 8-9. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Después se añadieron DIEA y amina de nitró **82a** (5,4 mg, 0,019 mmol) en DMF (1 ml), manteniendo el pH a 8-9. Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 minutos, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 13,4 mg de ácido de nitró **83a** como un sólido blanco.
- 15 Se preparó ácido de nitró **83b** por la misma vía alternativa, en la misma escala y se obtuvo como un sólido blanco (13,4 mg). EM: (+) m/z 773,4 (M+1).
- 20 *Amina **84a**.* Una mezcla de ácido de nitró **83a** (7,5 mg, 0,0097 mmol) y paladio en carbono (10 %, 1,1 mg) en MeOH (0,37 ml) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 4 horas. El catalizador se eliminó por filtración, y el filtrado se concentró. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 6,2 mg de amina **84a** como un sólido blanco. RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 8,06 (s, 1H), 7,36 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,17 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 5,70 (dd, 1H, J = 2,8, 10,8 Hz), 4,71 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 4,44-4,35 (m, 2H), 3,74 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 3,49-3,45 (m, 1H), 3,36-3,35 (m, 1H), 3,30-3,25 (m, 1H), 3,13 (s, 3H), 3,14-3,04 (m, 1H), 2,93 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 2,74 (s, 3H), 2,48-2,28 (m, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,19-2,03 (m, 2H), 1,95-1,86 (m, 4H), 1,80-1,71 (m, 2H), 1,71-1,57 (m, 3H), 1,24-1,13 (m, 1H), 1,16 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,04 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 1,02 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,94 (t, 3H, J = 7,2 Hz) y 0,84 (d, 3H, J = 6,8 Hz); EM: (+) m/z 743,4 (M+1).
- 25 El ácido de nitró **83b** se hidrogenó a amina **84b** usando el mismo procedimiento, en una escala de 8 g. Se obtuvo amina **84b** como un sólido blanco (6,7 mg). RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 8,06 (s, 1H), 7,35 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,16 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 5,70 (dd, 1H, J = 2,8, 11,2 Hz), 4,72 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 4,49-4,32 (m, 2H), 3,75 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 3,49-3,45 (m, 1H), 3,36-3,35 (m, 1H), 3,33-3,31 (m, 1H), 3,12 (s, 3H), 3,12-3,04 (m, 1H), 2,91 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 2,74 (s, 3H), 2,57-2,52 (m, 1H), 2,45-2,37 (m, 1H), 2,33-2,28 (m, 1H), 2,15 (s, 3H), 2,19-2,13 (m, 1H), 2,03-1,88 (m, 5H), 1,81-1,57 (m, 5H), 1,24-1,13 (m, 1H), 1,17 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,04 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 1,02 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 0,94 (t, 3H, J = 7,2 Hz), y 0,84 (d, 3H, J = 6,4 Hz); EM: (+) m/z 743,4 (M+1).
- 30 Los compuestos **84a** y **84b** se describen también en esta memoria descriptiva por fórmulas (III-r) y (III-s), respectivamente.
- 35 Ejemplo 19 – Esquema 15
- El Esquema 15 (**Fig. 17**) representa la síntesis de compuestos listos para la conjugación de esta invención que tiene un engarce aminoácido de esta invención (citruilina).
- 40 *Compuesto **85**.* Una mezcla de compuesto **62** de Esquema 10 (0,22 g, 0,654 mmol), citrolina protegida por Fmoc (0,39 g, 0,981 mmol), y clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida ("EDCI," 0,188 g, 0,981 mmol) en DMF (4 ml) se agitó a TA durante toda una noche. La reacción se desactivó por adición de NH₄Cl saturado y la solución acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-20 % en DCM proporcionando 0,42 g de compuesto **85** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 716,4 (M+1).
- 45 *Compuesto **86**.* Se añadió piperidina a una solución de compuesto **85** (0,248 g, 0,346 mmol) en DMF, manteniendo el pH a 9-10. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 20 minutos y después se concentró proporcionando 0,17 g de compuesto **86**. EM: (+) m/z 494,4 (M+1).
- 50 *Compuesto **87**.* Se añadió LiOH (26,6 mg, 1,11 mmol) en agua (3 ml) a una solución de compuesto **86** (0,17 g, 0,346 mmol) en THF (2 ml). Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h, el disolvente se eliminó parcialmente. La solución acuosa se acidificó a pH 2-3 con HCl y se concentró. El residuo se redisolvió en DMF (2 ml) y se añadieron 6-maleimidohexanoato de *N*-succinimidilo (0,16 g, 0,519 mmol) y DIEA (0,091 ml, 0,519 mmol). Después la mezcla de
- 55 reacción se agitó a TA durante 10 minutos, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 0,198 g de compuesto **87** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 673,4 (M+1).
- 60 *Compuesto **88**.* Se añadió TFA (0,5 ml) a una solución de compuesto **87** (12,5 mg, 0,019 mmol) en DCM (0,5 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 minutos y después se concentró proporcionando 12,8 mg de compuesto **88** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 573,4 (M+1).
- 65

Compuesto 89. Se añadió DIEA a una solución de compuesto **34a** de Esquema 3 (5 mg, 0,0093 mmol) y HATU (3,9 mg, 0,010 mmol) en DMF (0,3 ml), manteniendo el pH a 8-9. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Después se añadieron DIEA y compuesto **88** (12,8 mg, 0,019 mmol) en DMF (1 ml), manteniendo el pH a 8-9. Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 minutos, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 8,6 g de compuesto **89** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 1093,8 (M+1). Se representa también el Compuesto **89** en esta memoria descriptiva por fórmula (VI-m).

Compuesto 90. Se añadió DIEA a una solución de compuesto **49** de Esquema 5 (5 mg, 0,0098 mmol) y HATU (4,1 mg, 0,011 mmol) en DMF (0,3 ml), manteniendo el pH a 8-9. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Después se añadieron DIEA y el compuesto **88** (13,5 mg, 0,0196 mmol) en DMF (1 ml), manteniendo el pH 8-9. Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 minutos, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 8,9 mg de compuesto **90** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 1065,6 (M+1). Se representa también el compuesto **90** en esta memoria descriptiva por fórmula (VI-p).

15 Ejemplo 20 – Esquema 16

El Esquema 16 (**Fig. 18**) representa la preparación de compuestos listos para conjugación de esta invención, que tienen un engarce dipeptídico (citrulina-valina).

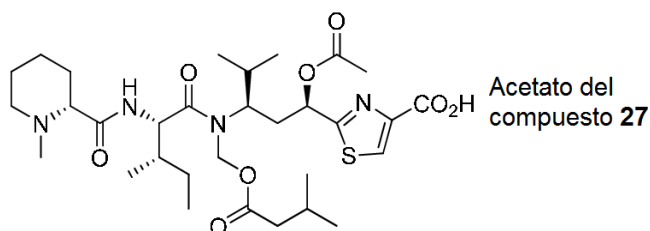
Compuesto 91. Se añadió DIEA a una solución de valina protegida con Fmoc (62,3 mg, 0,184 mmol) y HATU (63,6 mg, 0,167 mmol) en DMF (0,5 ml), manteniendo el pH a 8-9. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Después se añadieron DIEA y el compuesto **86** de Esquema 15 (82,5 mg, 0,167 mmol) en DMF (1 ml), manteniendo el pH a 8-9. Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 minutos, la reacción se desactivó por adición de TFA acuoso al 0,05 %. Después de que la solución acuosa se extrajera con EtOAc tres veces, las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-20 % en DCM proporcionando 0,13 g de compuesto **91** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 815,5 (M+1).

Compuesto 92. Se añadió piperidina a una solución de compuesto **91** (0,144 g, 0,177 mmol) en DMF, manteniendo el pH a 9-10. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 20 min. y después se concentró. El residuo se disolvió en THF (2,5 ml) y se añadió LiOH (16,3 mg, 0,681 mmol) en agua (1,3 ml). Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h, el disolvente se eliminó parcialmente. La solución acuosa se acidificó a pH 2-3 con HCl y después se concentró. El residuo se redisolvió en DMF (2,5 ml) y se añadieron 6-maleimidohexanoato de *N*-succinimidilo (0,105 g, 0,341 mmol) y DIEA (0,060 ml, 0,341 mmol). Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 10 minutos, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 0,116 g de compuesto **92** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 772,5 (M+1).

Compuesto 93. Se añadió TFA (0,6 ml) a una solución de compuesto **92** (14,4 mg, 0,019 mmol) en DCM (1 ml) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 minutos y después se concentró proporcionando 14,7 mg de compuesto **93** como un sólido blanco. RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 7,58 (dd, 2H, *J* = 1,6, 8,4 Hz), 7,21 (dd, 2H, *J* = 2,8, 8,8 Hz), 6,79 (s, 2H), 4,48 (m, 1H), 4,13 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 3,57-3,46 (m, 3H), 3,33-3,32 (m, 1H), 3,22-3,09 (m, 2H), 2,91-2,80 (m, 1H), 2,27 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz), 2,09-1,85 (m, 3H), 1,81-1,54 (m, 8H), 1,35-1,29 (m, 3H), 1,19 (d, 1,5 H, *J* = 6,8 Hz), 1,18 (d, 1,5 H, *J* = 7,2 Hz), 0,98 (d, 3H, *J* = 2,4 Hz), 0,96 (d, 3H, *J* = 2,8 Hz); EM: (+) m/z 672,4 (M+1).

Compuesto 94. Se añadió DIEA a una solución de compuesto **34a** de Esquema 3 (11 mg, 0,0204 mmol) y HATU (3,9 mg, 0,0204 mmol) en DMF (0,3 ml), manteniendo el pH a 8-9. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Después se añadieron DIEA y compuesto **93** (14,7 mg, 0,019 mmol) en DMF (1 ml), manteniendo el pH a 8-9. Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 minutos, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 18,9 g de compuesto **94** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 1192,6 (M+1). Se representa también que el compuesto **94** se representa también en esta memoria descriptiva por fórmula (VI-n).

Acetato de compuesto 27. Se añadió anhídrido acético (0,248 ml) a una solución de compuesto **27 de** Esquema 2 (Peltier y col., 2006; 0,13 g, 0,218 mmol) en piridina (2,6 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó después a TA durante toda una noche. Después la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, una solución de agua y se añadió 1,4-dioxano (12 ml, v/v 1:1). La mezcla de reacción se agitó a TA durante toda una noche y después se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 10-20 % en DCM proporcionando 0,114 g de compuesto **27** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 639,4 (M+1).



Compuesto 95. Se añadió DIEA a una solución de acetato de compuesto **27** (3,8 mg, 0,0059 mmol) y HATU (2,5 mg, 0,0065 mmol) en DMF (0,3 ml), manteniendo el pH a 8-9. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Después se añadieron DIEA y compuesto **93** (5,6 mg, 0,0071 mmol) en DMF (1 ml), manteniendo el pH a 8-9. Después la mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 minutos, el producto en bruto se purificó por HPLC preparativa proporcionando 6,5 g de compuesto **95** como un sólido blanco. EM: (+) m/z 1292,7 (M+1). El compuesto **95** se representa también en esta memoria descriptiva por fórmula (VI-o).

10 Ejemplo 21 – Esquema 17

Este ejemplo describe la síntesis de ácido **108**, un intermedio útil para la preparación de compuestos de esta invención, con referencia a Esquema 17 (**Fig. 19**).

Éster metílico 100. Se añadió HCl en dioxano (8,3 ml, 4M, 33,2 mmol) a una solución de compuesto **9** de Esquema 1 (8 g, 22,1 mmol) en MeOH (10 ml). La mezcla de reacción se agitó después a TA. Después de 20 minutos, la solución se evaporó a vacío dando éster metílico **100** como un aceite (6,5 g), que se usó para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

Propilamina 101. Se añadieron propanal (700 μ l, 7,36 mmol) y $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (2,8 g, 13,2 mmol) a una solución de éster metílico **100** (1,96 g, 6,6 mmol) en DCM (10 ml). La mezcla de reacción se agitó después a 5 °C. Después de 1 hora la mezcla se llevó en EtOAc y se lavó con solución de K_2CO_3 al 7 % dos veces y después con salmuera. La fase de EtOAc se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y después se evaporó a vacío proporcionando un residuo que se hizo pasar a través de una columna (MeOH al 0-10 %:DCM) dando propilamina **101** (1,12 g, 60 %) como un aceite. **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,17 (s, 1H), 5,43 (t, $J = 4,6$ Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,07-2,87 (m, 2H), 2,82-2,70 (m, 1H), 2,54 (s, 1H), 2,45-2,26 (m, 2H), 2,16-2,02 (m, 1H), 1,73 (m, 2H), 1,05-0,94 (m, 9H). EM m/z $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (M+1) $^+$ calculada 301,2, hallada 301.

Compuesto 102. Se añadieron hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio ("PyBop," 1,28 g, 2,47 mmol), HOBt (0,33 g, 2,47 mmol), isoleucina protegida con Boc (430 μ l, 2,47 mmol) a una solución de propilamina **101** (570 mg, 1,9 mmol) en DCM (5 ml). La mezcla de reacción se agitó después a TA. Después de 20 minutos se añadió EtOAc (200 ml) y la fase orgánica se lavó con ácido cítrico al 10 % (dos veces), NaHCO_3 saturado, y salmuera. La fase de EtOAc se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y después se evaporó a vacío proporcionando un residuo que se hizo pasar a través de una columna dando compuesto **102** (0,55 g) como un aceite. EM m/z $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ (M+1) $^+$ calculada 514,3, hallada 514,3.

Éster de azido 104. Se añadió cloruro ácido **103** (2 mmol., Lundquist y col. 2001; véase también anteriormente en la preparación de éster de azido **43** de Esquema 5) en DCM (3 ml) a una solución de compuesto **102** (0,55 g, 1,1 mmol) en DCM (10 ml) y DIEA (871 μ l, 5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 5 °C. Después de agitar durante 10 minutos la mezcla se evaporó a vacío dando un residuo que se hizo pasar a través de una columna dando éster de azido **104** (300 mg) como un aceite. EM m/z $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$ (M+1) $^+$ calculada 653,4, hallada 653.

Compuesto 106. Se añadió una solución de éster de pentafluoroetilo **105** (2,1 mmol, Peltier y col. 2006) en 1 ml de EtOAc a una solución de éster de azido **104** (300 mg, 0,46 mmol) y Pd/C (10 %, 50 mg) en EtOAc (5 ml). El matraz de reacción se cargó con H_2 usando un balón y se agitó durante toda una noche a TA. Después de agitar durante toda una noche la mezcla de reacción de filtró, se concentró a vacío y después se hizo pasar a través de una columna (MeOH:DCM, 0-10 %) dando compuesto **106** (170 mg) como un aceite. EM m/z $\text{C}_{38}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$ (M+1) $^+$ calculado 752,5, hallado 752,5.

Compuesto 107. Se añadió NaOH (120 μ l, 1,2 mmol, 10 M) a una solución de compuesto **106** (170 mg, 0,22 mmol) en MeOH (10 ml) a TA. Después de agitar durante 2 horas la mezcla de reacción se acidificó a pH 2 con HCl concentrado. La mezcla de reacción se evaporó después a vacío y se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:H₂O, 0-100 % con TFA al 0,1 %). Después de liofilización, el compuesto **107** (63 mg) se obtuvo como un polvo blanco. El perfil de HPLC indicó que era una mezcla de rotámeros. EM m/z $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ (M+1) $^+$ calculada 525,3, hallada 525.

Ácido 108. Se añadió anhídrido acético (60 μ l, 0,64 mmol) a una solución de compuesto **107** (63 mg, 0,12 mmol) en piridina (1 ml) a 5 °C. La temperatura se elevó a TA gradualmente. Después de permitir a la reacción avanzar durante toda una noche, se añadió agua (100 μ l). Después de otras 5 horas, los productos orgánicos volátiles se eliminaron dando un residuo que se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:H₂O, 0-100 % con TFA al 0,1 %) dando ácido **108** (42 mg) como un aceite. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 8,35 (s, 1H), 5,71 (dd, J = 11,4, 1,4 Hz, 1H), 4,63 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 3,97 (t, J = 16,4 Hz, 1H), 3,65-3,42 (m, 2H), 3,21-3,05 (m, 2H), 2,87 (s, 3H), 2,34-2,14 (m, 4H), 2,13 (s, 3H), 2,03-1,46 (m, 10H), 1,29-1,06 (m, 1H), 1,04-0,85 (m, 15H). EM m/z C₂₈H₄₇N₄O₅S (M+1)⁺ calculado 567,3, hallado 567.

10 *Ejemplo 22 – Esquemas 18 y 19*

El Esquema 18 (Figs. 20a y 20b) muestra la síntesis de compuestos de esta invención usando como ácido **108**, preparado en el ejemplo precedente.

15 *Procedimiento general para acoplamiento mediado por HATU.* Se añadieron HATU (en exceso 1,2 x) y DIEA (en exceso 4 x) en una solución de ácido **108** en DMF a 5 °C. Después de agitar la mezcla de reacción durante 10 minutos, se añadió la amina correspondiente. La mezcla de reacción se agitó durante otros 10 minutos antes de diluirla con DMSO y solución de TFA al 0,1 %. La mezcla resultante se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:H₂O, 0-100 % con TFA al 0,1 %). Se analizaron las fracciones recogidas y se liofilizaron las fracciones deseadas dando el producto correspondiente.

20 *Compuesto 109.* Obtenido del acoplamiento de ácido **108** y éster metílico de fenilalanina. EM m/z C₃₈H₅₈N₅O₇S (M+1)⁺ calculada 728,4, hallada 728,4. El compuesto **109** se representa también anteriormente en el presente documento como estructura (III-x).

25 *Compuesto 111.* Obtenido del acoplamiento de ácido **108** y compuesto **110** (preparación descrita más adelante). EM m/z C₄₂H₆₃N₆O₉S (M+1)⁺ calculado 827,4, encontrado 827,5.

30 *Compuesto 112.* A una solución de compuesto **111** (5 mg, 6 μ mol) en 2 ml de MeOH se añadió Pd/C (10 %, 10 mg). El matraz de reacción se cargó con H₂ usando un balón y se agitó durante 2 horas a TA. La mezcla de reacción después se filtró, se concentró a vacío y se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:H₂O, 0-100 % con TFA al 0,1 %) dando compuesto **112** (2,1 mg) como un polvo blanco. EM m/z C₄₂H₆₇N₆O₇S (M+1)⁺ calculada 799,5, hallada 799,5. El compuesto **112** se representa también anteriormente en el presente documento como estructura (III-y).

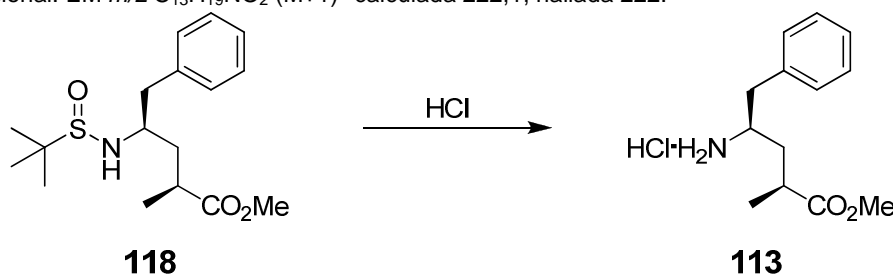
35 *Compuesto 114.* Obtenido del acoplamiento de ácido **108** y compuesto **113** (preparación descrita más adelante). EM m/z C₄₁H₆₄N₅O₇S (M+1)⁺ calculada 770,4, hallada 770.

40 *Compuesto 116.* Obtenido del acoplamiento de ácido **108** y compuesto **115** (preparación descrita más adelante). EM m/z C₆₁H₉₅N₁₁O₁₃S (M+2)⁺ calculada 610,9, hallada 611. El compuesto **116** se representa también anteriormente en el presente documento como estructura (VI-t).

Compuesto 117. Obtenido del acoplamiento de ácido **108** y del éster metílico de alfa-N-acetilisina. EM m/z C₃₇H₆₃N₆O₈S (M+1)⁺ calculado 751,4, hallado 751,5.

45 *Compuesto 110.* Se disolvió alqueno **59** de Esquema 8 (como éster etílico en vez de éster metílico, 1 g, 2,6 mmol) en DCM (10 ml) conteniendo TFA al 5 % y la mezcla de reacción se agitó a 5 °C. Después de 40 minutos la mezcla se secó a vacío dando compuesto **110** (0,3 g, 100 %) como un semisólido. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 8,22-8,17 (m, 2H), 7,50 (dd, J = 9,0, 2,2 Hz, 2H), 6,58 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 4,45 (td, J = 9,8, 5,3 Hz, 1H), 4,19 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,35-3,28 (m, 1H), 3,06 (dd, J = 13,2, 9,6 Hz, 1H), 1,55 (d, J = 0,9 Hz, 3H), 1,27 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

50 *Compuesto 113.* Se añadió HCl (2,5 ml, 10 mmol, 4 M) a una solución de compuesto **118** (2 g, 5,5 mmol, Peltier y col. 2006) en MeOH (10 ml) y la mezcla de reacción se agitó a TA. Después de 20 minutos la mezcla se secó a vacío dando compuesto **113** (2 g, 100 %) como un semisólido. Se usó producto en bruto para la reacción de la siguiente etapa sin purificación adicional. EM m/z C₁₃H₁₉NO₂ (M+1)⁺ calculada 222,1, hallada 222.



55

El Esquema 19 (Fig. 21) muestra la síntesis de compuesto **115**, usado en la síntesis de compuesto **116**, anterior.

5 **Compuesto 120.** Se añadieron DIEA (697 μ l, 12 mmol) y éster t-butilico de valina 543 (627 mg, 3 mmol) en una solución en 10 ml de DCM de ácido 6-maleimidohexanoico ("6-MHA," 622 mg, 3 mmol) y HATU (1,14 g, 3 mmol). Después de 20 minutos se añadió EtOAc (200 ml). La fase orgánica se lavó con ácido cítrico al 10 %, solución de NaHCO₃ saturada y salmuera. Se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó por evaporación. El residuo resultante se hizo pasar a través de una columna (Hexano:EtOAc, 0-80 %) dando compuesto **120** (900 mg) como un aceite. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,66 (s, 2H), 5,94 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,44 (dd, J = 8,7, 4,5 Hz, 1H), 3,49 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,31-2,06 (m, 3H), 1,73-1,54 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,37-1,25 (m, 2H). EM m/z C₁₉H₃₁N₂O₅ (M+1)⁺ calculada 367,2, hallada 367.

10 **Compuesto 121.** El compuesto **120** (1 g, 2,73 mmol) se disolvió en 20 ml de DCM con 3 ml de TFA a TA. Después de 1 hora la mezcla se secó por evaporación dando compuesto **121** () como un aceite, que se usó sin purificación adicional. EM m/z C₁₅H₂₃N₂O₅ (M+1)⁺ calculado 311,2, hallado 311.

15 **Compuesto 123.** Se añadieron DIEA (920 μ l, 5,28 mmol) y compuesto **122** (500 mg, 1,32 mmol; véase Esquema 22 y Ejemplo 25 en el presente documento) a solución en 10 ml de DMF de citrulina protegida por Fmoc (524 mg, 1,32 mmol) y HATU (601 mg, 1,58 mmol). Después de 20 minutos, se añadieron 200 ml de EtOAc. La fase orgánica se lavó con ácido cítrico al 10 %, solución saturada de NaHCO₃ y salmuera. Se secó después con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el EtOAc. El residuo resultante se hizo pasar a través de una columna (MeOH:DCM; 0-10 %) dando un sólido. Este sólido se disolvió en DMF (5 ml) con piperidina al 5 %. Después de 1 hora la solución se evaporó y el residuo se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:H₂O; 0-100 % con TFA al 0,1 %) dando compuesto **123** (212 mg). EM m/z C₂₇H₄₆N₅O₆ (M+1)⁺ calculada 536,3, hallada 536,4.

20 **Compuesto 124.** Se añadieron DIEA (404 μ l, 2,4 mmol) y compuesto **123** (321 mg, 0,6 mmol) en una solución en DMF de 5 ml de compuesto **121** (180 mg, 0,58 mmol) y HATU (220 mg, 0,58 mmol). Después de 20 minutos se añadieron 200 ml de EtOAc. La fase orgánica se lavó con ácido cítrico al 10 %, solución de NaHCO₃ saturada y salmuera. Se secó después con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el EtOAc. El residuo resultante se hizo pasar a través de una columna (MeOH:DCM; 0-20 %) dando compuesto **124** (240 mg) como un aceite. EM m/z C₄₂H₆₆N₇O₁₀ (M+1)⁺ calculada 828,5, hallada 828,5.

30 **Compuesto 115.** El compuesto **124** (240 mg, 0,29 mmol) se disolvió en una solución de 5 ml de TFA y DCM (1:1). Después de 3 horas la mezcla se secó por evaporación y el compuesto **115** resultante se usó sin purificación adicional. A partir de RMN, se obtuvo una mezcla de dos (5:1) isómero. Se comunica el isómero principal: RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 8,27 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,58 (dd, J = 8,5, 1,9 Hz, 2H), 7,21 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 4,48 (dd, J = 13,3, 8,1 Hz, 1H), 4,14 (dd, J = 7,5, 4,9 Hz, 1H), 3,62-3,38 (m, 3H), 3,25-2,97 (m, 3H), 2,96-2,78 (m, 2H), 2,70-2,40 (m, 1H), 2,32-2,21 (m, 2H), 2,11-1,92 (m, 2H), 1,94-1,83 (m, 1H), 1,82-1,70 (m, 1H), 1,70-1,49 (m, 7H), 1,19 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 0,97 (dd, J = 6,8, 2,8 Hz, 6H). EM m/z C₃₃H₅₀N₇O₈ (M+1)⁺ calculada 672,4, hallada 672.

Ejemplo 23 – Esquema 20

40 El Esquema 20 (**Fig. 22**) muestra la síntesis de compuesto **131**, un intermedio usado para fabricar compuestos de esta invención.

45 **Compuesto 125.** El compuesto **9** de Esquema 1 (3 g, 8,29 mmol) se disolvió en THF (20 ml) y dimetilsulfato (1,2 ml, 12,4 mmol). A esta solución se añadió NaH (552 mg, 13,8 mmol) a 5 °C en partes durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se vertió después en solución de NH₄Cl saturada. Se añadió EtOAc a la mezcla de reacción y la fase orgánica se lavó con salmuera y se secó y se evaporó a vacío dando un residuo. El residuo resultante se hizo pasar a través de una columna (Hexano:EtOAc, 0-100 %) dando compuesto **125** (1,2 mg) como un aceite. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,12 (s, 1H), 4,95 (dd, J = 10,0, 3,3 Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,50 (s, 3H), 3,45-3,40 (m, 2H), 1,93-1,79 (m, 2H), 1,74-1,65 (m, 1H), 1,20 (s, 9H), 0,84 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,80 (d, J = 6,8 Hz, 3H). EM m/z C₁₆H₂₉N₂O₄S₂ (M+1)⁺ calculada 377,1, hallada 377,2.

50 **Compuesto 126.** Se añadió HCl en dioxano (1 ml, 4 mmol) a una solución de compuesto **125** (0,7 g, 1,86 mmol) en MeOH (10 ml). La mezcla de reacción se agitó después a TA. Después de 20 minutos, los productos volátiles se evaporaron a vacío dando compuesto **126** (0,8 g) como un aceite que se usa para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. EM m/z C₁₂H₂₁N₂O₃S (M+1)⁺ calculada 273,1, hallada 273.

60 **Compuesto 127.** A una solución de compuesto **126** (616 mg, 2 mmol) en DCM (10 ml) y DIEA (1,8 ml, 10 mmol) a 5 °C, se añadió compuesto **103** (Esquema 17, 6 mmol) en 5 ml de DCM. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a TA. Después de 3 horas la mezcla de reacción se vertió en solución NaHCO₃ saturada y EtOAc. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó y se evaporó. El residuo resultante se hizo pasar a través de una columna (Hexano:EtOAc, 0-50 %) dando compuesto **127** (594 mg, 72 %) como un semiaceite. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,18 (s, 1H), 6,47 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 4,60-4,52 (m, 1H), 4,23-4,13 (m, 1H), 3,96-3,95 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,44 (s, 3H), 2,21-2,08 (m, 1H), 1,94-1,84 (m, 2H), 1,84-1,71 (m, 1H), 1,52-1,38 (m, 1H), 1,35-1,20 (m, 1H), 1,07 (d, J = 6,9 Hz, 3H), 0,95-0,85 (m, 9H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 176,00, 168,63, 161,92, 146,90, 128,24, 78,81, 70,34, 58,97, 52,72, 50,76, 40,48, 38,62, 32,24, 24,32, 19,13, 18,13, 16,25, 11,82. EM m/z C₁₈H₃₀N₅O₄S (M+1)⁺ calculada 412,2, hallada 412,3.

65

Compuesto 129. Se añadió hexametildisilazida de potasio ("KHMDs," 0,19 mmol, 0,375 ml de solución de tolueno) en una solución en THF (0,5 ml) de compuesto **127** (50 mg, 0,12 mmol) a -43 °C. Después de 20 minutos se añadió compuesto **128** (0,36 mmol, 137 µl, Abe y col. 1997). Después de 2 horas, se añadieron 100 µl de MeOH y la mezcla de reacción se vertió en solución de NH₄Cl saturada. Se añadió después EtOAc. Después de separación de las fases, la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se retiró por evaporación. El residuo resultante se hizo pasar a través de una columna (Hexano:EtOAc, 0-50 %) dando compuesto **129** (51 mg) como un semisólido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,16 (s, 1H), 5,70 (s, 1H), 5,43 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,32 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 4,39 (d, J = 10,6 Hz, 1H), 3,92 (d, J = 11,7 Hz, 3H), 3,53-3,44 (m, 1H), 3,37 (d, J = 10,5 Hz, 3H), 2,41 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,37-2,11 (m, 4H), 1,92 – 1,68 (m, 2H), 1,37-1,21 (m, 1H), 1,12 – 0,85 (m, 18H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 175,24, 172,79, 171,21, 161,90, 147,09, 128,25, 78,44, 68,69, 63,35, 58,71, 52,48, 43,23, 38,63, 34,91, 31,01, 25,73, 25,25, 22,58, 22,56, 22,48, 20,45, 19,62, 16,14, 10,65. EM m/z C₂₄H₄₀N₅O₆S (M+1)⁺ calculada 526,3, hallada 424,3 (rotura del N,O acetal).

Compuesto 130. Se mezclaron compuestos **129** (200 mg, 0,38 mmol) y **105** (Peltier y col. 2006; 4 mmol) en 5 ml de EtOAc con Pd/C (150 mg, 10 %) a ta. El matraz de reacción se evacuó y recargó con H₂ usando un balón. Después de agitar durante toda una noche a TA, la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó. Después de cromatografía en columna (SiO₂, MeOH:DCM, 0-100 %) se obtuvo el compuesto **130** (97 mg) como un sólido. EM m/z C₃₁H₅₃N₄O₇S (M+1)⁺ calculada 625,4, hallada 625,5.

Compuesto 131. Se añadió hidróxido de tributilestano (181 mg, 0,59 mmol) a una solución de compuesto **130** (97 mg, 0,16 mmol) en 1,2-dicloroetano de 10 ml. Después de 22 horas a 67 °C, la mezcla se evaporó y se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:(tampón NH₄(HCO₃) 20 mM, pH 7), 5-100 %) dando compuesto **131** (34 mg) como un sólido. EM m/z C₃₀H₅₁N₄O₇S (M+1)⁺ calculada 611,3, hallada 424,3 (rotura del N,O acetal).

Ejemplo 24 – Esquema 21

El Esquema 21 (Fig. 23) muestra la síntesis de compuestos de esta invención usando compuesto **131** como un precursor.

Compuesto 132. Se disolvió compuesto **60** (Esquema 8, 200 mg, 0,57 mmol) en 2 ml de DCM con TFA al 20 % a ta. Después de 1 hora los productos volátiles se evaporaron dando compuesto **132** (200 mg) como un sólido amarillo, que se usó sin purificación adicional.

Compuesto 133. Se añadió DIEA (43 µl, 0,2 mmol) a una solución DMF (1 ml) de compuesto **131** (30 mg, 0,049 mmol) y HATU (22,3 mg, 0,059 mmol) a -43 °C. Después de 10 min se añadió compuesto **132** (15 mg, 0,06 mmol). La mezcla se elevó a TA. La mezcla final se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:(tampón 20 mM NH₄(HCO₃) 20 mM, pH 7), 5-100 %) dando compuesto **133** (20 mg) como un polvo blanco. EM m/z C₄₄H₇₃N₆O₈S (M+1)⁺ calculada 843,5, hallada 843,5. El Compuesto **133** se representa también anteriormente en el presente documento como estructura (III-u).

Compuesto 134. Se disolvió el compuesto **133** (2 mg, 2,4 µmol) en 0,5 ml de metanol y el pH de la solución se ajustó a 1 con HCl 1M. Después de agitar durante toda una noche, los productos volátiles se evaporaron y el residuo se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:(tampón NH₄(HCO₃) 20 mM, pH 7), 5-100 %) dando compuesto **134** (0,7 mg) como un polvo blanco. EM m/z C₄₀H₆₅N₆O₇S (M+1)⁺ calculada 773,5, hallada 773,5. El Compuesto **134** se representa también anteriormente en el presente documento como estructura (III-v).

Compuesto 135. Se disolvió el compuesto **133** (2 mg, 2,4 µmol) en 0,5 ml de n-propanol y el pH de la solución se ajustó a 1 con HCl 1M. Después de agitar durante toda una noche, los productos volátiles se evaporaron y el residuo se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:(tampón NH₄(HCO₃) 20 mM, pH 7), 5-100 %) dando compuesto **135** (0,4 mg) como un polvo blanco. EM m/z C₄₂H₆₉N₆O₇S (M+1)⁺ calculada 802,5, hallada 801,5. El compuesto **135** se representa también anteriormente en el presente documento como estructura (III-w).

Ejemplo 25 – Esquema 22

El Esquema 22 (Fig. 24) muestra un procedimiento para fabricar compuesto **142**, útiles como un intermedio para fabricar compuestos de esta invención.

Compuesto 136. Se añadió NaOH (800 µl, 10 M, 8 mmol) a una solución de 20 ml de THF y MeOH (1:1) con compuesto **59** de Esquema 8 (1,65 g, 4,37 mmol). Después de agitar durante toda una noche el pH de la solución se ajustó a 1 con HCl 3 N a 5 °C. Después de evaporación de los disolventes, se añadieron 200 ml de EtOAc. Después de separación, la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el EtOAc. El residuo se hizo pasar a través de una columna (MeOH:DCM; 0-20 %) dando compuesto **136** (1,2 mg) como un aceite. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,21-8,12 (m, 2H), 7,41-7,32 (m, 2H), 6,62 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,82-4,57 (m, 2H), 3,15-3,02 (m, 1H), 2,90 (dd, J = 13,3, 7,2 Hz, 1H), 1,71 (d, J = 1,2 Hz, 3H), 1,41 (s, 9H).

Compuesto **137**. Se añadió DMF-di-t-butilacetato (1 ml, 4 mmol) a una solución en 6 ml de tolueno de compuesto **136** (128 mg, 0,36 mmol) a 133 °C. Después de 10 minutos la mezcla de reacción se enfrió y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se hizo pasar a través de una columna (Hexano:EtOAc, 0-30 %) dando compuesto **137** (133 mg) como un aceite. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,19-8,10 (m, 2H), 7,39-7,30 (m, 2H), 6,39 (dd, *J* = 9,1, 1,5 Hz, 1H), 4,63 (d, *J* = 39,1 Hz, 2H), 3,03 (dd, *J* = 13,2, 6,2 Hz, 1H), 2,90 (dd, *J* = 13,3, 7,0 Hz, 1H), 1,67 (d, *J* = 1,5 Hz, 3H), 1,47 (s, 9H), 1,39 (s, 9H).

Compuesto **122**. Se añadieron compuesto **137** (540 mg, 1,22 mmol), Pd/C (136 mg, 10 %) y HCl 3 N (0,3 ml) a una mezcla de DCM y MeOH (30 ml:5 ml). El matraz se cargó con H₂ usando un balón. Después de agitar durante toda una noche a TA, la mezcla se filtró y se concentró dando compuesto **122** (550 mg) como un semisólido. EM *m/z* C₂₁H₃₅N₂O₄ (M+1)⁺ calculada 379,3, hallada 223.

Compuesto **138**. Se mezclaron compuesto **136** (100 mg, 0,28 mmol) y Pd/C (20 mg, 10 %) en mezcla de 5 ml de MeOH y DCM (v:v 1:1) en un balón de hidrógeno a TA. Después de agitar durante toda una noche la mezcla se filtró y los disolventes se evaporaron a vacío dando compuesto **138** (95 mg) como un aceite, que se usó para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. EM *m/z* C₁₇H₂₇N₂O₄ (M+1)⁺ calculada 323,2, hallada 223.

Compuesto **139**. Se mezclaron compuesto **138** (10 mg, 0,03 mmol), cloruro de terc-butildimetilsililo ("TBDMSCl," 4,5 mg, 0,03 mmol) e imidazol (4 mg, 0,06 mmol) en 1 ml de DMF a TA. Se mezclaron citrulina protegida con Fmoc (24 mg, 0,06 mmol), oxalato de *N,N'*-disuccinimidilo ("DSO," 8 mg, 0,06 mmol) y DIEA (20 µl, 0,12 mmol) en otro 1 ml de DMF a TA. Después de 1 hora se mezclaron las dos soluciones y la mezcla se mantuvo a TA. Después de agitar durante toda una noche, se añadió EtOAc y la solución se lavó con ácido cítrico acuoso al 10 % y salmuera. La fase orgánica se secó después con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a vacío. El residuo resultante se hizo pasar a través de una columna (MeOH:DCM; 0-10 %) dando compuesto **139** (7 mg) como un aceite. EM *m/z* C₃₈H₄₈N₅O₈ (M+1)⁺ calculada 702, hallada 702.

Compuesto **141**. El compuesto **139** (10 mg, 0,014 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF con piperidina al 5 %. Después de 20 minutos el disolvente se evaporó a vacío y el residuo se mezcló con *N*-succinimidil-4-maleimidobutirato **140** (5,6 mg, 0,028 mmol) y DIEA (5 µl, 0,028 mmol) en 1 ml de DMF. Después de 10 minutos los disolventes se eliminaron de la mezcla de reacción a vacío y se hicieron pasar a través de una columna (MeOH:DCM, 0-20 %) dando compuesto **141** (6 mg) como un sólido. EM *m/z* C₃₁H₄₅N₆O₉ (M+1)⁺ calculada 645, hallada 645.

Compuesto **142**. El compuesto **141** (6 mg, 0,01 mmol) se disolvió en 1 ml de DCM con TFA al 10 %. Después de 10 min el disolvente se evaporó a vacío dando compuesto **142** (6 mg), usado para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

Ejemplo 26 – Esquema 23

El Esquema 23 (**Fig. 25**) muestra la elaboración de compuesto **142**, hecha por Esquema 22, en un compuesto de esta invención.

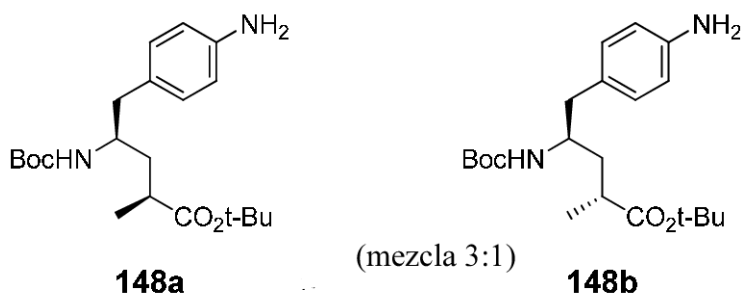
Compuesto **145**. Se añadió HCl (30 µmmol) en 150 µl de MeOH a una solución de compuesto **27** de Esquema 2 (5 mg, 8,3 µmmol) en 0,7 ml de MeOH a 5 °C. La temperatura se dejó aumentar a TA gradualmente. Después de agitar durante toda una noche la mezcla se evaporó y disolvió en 0,7 de piridina. A esta solución se añadió Ac₂O (28 µl, 296 µmmol) a 5 °C. La temperatura se dejó elevar a TA gradualmente y después de agitar durante toda una noche se añadieron 50 µl de H₂O. Después de 3 horas los productos volátiles se evaporaron y el residuo resultante se evaporó dando compuesto **145** (4,7 mg) como un semisólido. EM *m/z* C₂₇H₄₅N₄O₇S (M+1)⁺ calculada 569,3, hallada 569.

Compuesto **146**. Se añadieron DIEA (6 µl, 34 µmol) y compuesto **142** (5,5 mg, 8,3 µmol) a solución en 0,5 ml de DMF de compuesto **530** (4,7 mg, 8,3 µmmol) y HATU (3,2 mg, 8,4 µmol) a 5 °C. Después de 20 minutos, la mezcla final se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:(tampón NH₄(HCO₃)) 20 mM, pH 7), 5-100 %) dando compuesto **146** (20 mg) como un polvo blanco. EM *m/z* C₅₃H₇₉N₁₀O₁₃S (M+1)⁺ calculada 1095,5, hallada 1095,5. El compuesto **146** se representa también anteriormente en el presente documento como estructura (VI-r).

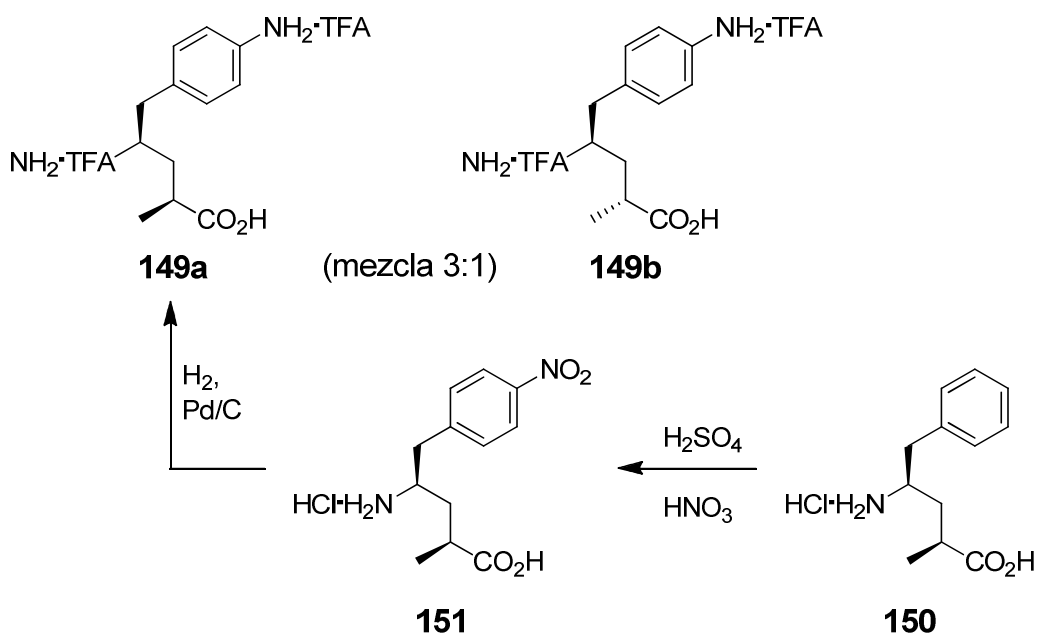
Compuesto **147**. DIEA (1,4 µl, 8 µmol) y una gota de solución de NH₄Cl saturada en una solución en 0,5 ml de DMF de compuesto **146** (2 mg, 1,8 µmol) y HATU (1,6 mg, 4,6 µmol). Después de 10 minutos, la mezcla se hizo pasar a través de una columna en fase reversa (ACN:(tampón NH₄(HCO₃)) 20 mM, pH 7), 5-100 %) dando compuesto **147** (20 mg) como un semisólido. EM *m/z* C₅₃H₈₀N₁₁O₁₂S (M+1)⁺ calculada 1094,6, hallada 1094. El Compuesto **147** se representa también anteriormente en el presente documento como estructura (VI-s).

Ejemplo 27 – Diastereómeros de 4-aminotubufenilalanina

El compuesto **122** (Ejemplo 25 anterior) se determinó que es una mezcla de diastereómeros **148a** y **148b** 3:1 como sigue.



5 El compuesto **122** (10 mg, 0,026 mmol) se disolvió en una mezcla de 2 ml de TFA y DCM (1:1) a TA. Después de 3 horas los disolventes se evaporaron y el residuo se hizo pasar a través de una columna de fase reversa (ACN:H₂O; 0-100 % con TFA al 0,1 %) dando una mezcla 3:1 de los compuestos **149a** y **149b**. El principal isómero en esta mezcla fue la estructura designada **149a** comparando el espectro de RMN con la RMN de una muestra auténtica de compuesto **149a** hecho de compuesto **150**.



10 Se añadió HNO₃ concentrado (10 µl) a una solución en 200 µl de H₂SO₄ concentrado de tubufenilalanina **150** (Peltier y col. 2006; 6 mg, 0,025 mmol) a 5 °C. Después de 20 minutos la solución se vertió en 2 ml de solución de K₂CO₃ al 7 % enfriada. Se añadieron después 10 ml de EtOAc. Después de la separación, se secó la fase orgánica por evaporación y se hizo pasar el residuo a través de una columna de fase reversa (ACN:H₂O; 0-100 % con TFA al 0,1 %) dando compuesto de nitro **151** (5 mg). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 8,27-8,21 (m, 2H), 7,56-7,49 (m, 2H), 3,69-3,58 (m, 1H), 3,07 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,73-2,61 (m, 1H), 2,04-1,91 (m, 1H), 1,64 (ddd, J = 14,7, 8,2, 4,9 Hz, 1H), 1,20 (d, J = 7,1 Hz, 3H). EM m/z C₁₂H₁₇N₂O₄ (M+1)⁺ calculada 253,1, hallada 253.

20 El compuesto de nitro **151** se convirtió después a compuesto **149a** como sigue: se mezcló compuesto de nitro **151** (5 mg, 0,01 mmol) con Pd/C (10 mg, 10 %) en 5 ml de MeOH a TA. El matraz se cargó con H₂ usando un balón. Después de 1 hora la mezcla se filtró y evaporó dando compuesto **149a** (4,5 mg), RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 7,08-7,03 (m, 2H), 6,83-6,79 (m, 2H), 3,51-3,41 (m, 1H), 2,84-2,78 (m, 2H), 2,68-2,58 (m, 1H), 2,04-1,92 (m, 1H), 1,60 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 1,18 (d, J = 7,0 Hz, 3H). EM m/z C₁₂H₁₉N₂O₂ (M+1)⁺ calculada 223,1, hallada 223. Este espectro de RMN fue la base para asignar las estructuras del componente principal de las mezclas **148a/148b** y **149a/149b**.

25 Se hizo pasar una muestra de compuesto **122** a través de una columna en fase reversa (ACN:H₂O; 0-100 % con TFA al 0,1 %) y las reacciones con el isómero menor se recogieron y liofilizaron. El producto resultante se trató después con TFA y DCM eliminando el grupo Boc. Después de 1 hora los disolventes se evaporaron dando un producto, que se designó para ser el **149b**, después de comparar su espectro de RMN con aquel del compuesto **149a**. Compuesto **149b**: RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) 7,36-7,23 (m, 2H), 7,22-7,09 (m, 2H), 3,59-3,40 (m, 1H), 3,04-2,84 (m, 2H), 2,61-2,45 (m, 1H) 2,07-1,87 (m, 1H), 1,73-1,58 (m, 1H), 1,21-1,09 (d, J = 7,2 Hz, 3H).

Los compuestos **148a**, **148b**, **149a**, y **149b** pueden usarse para preparar compuestos de esta invención que tengan una subunidad 4-aminotubufenilalanina, donde se define la estereoquímica del grupo alfa-metilo, utilizando las aproximaciones sintéticas ejemplificadas anteriormente, cambiando lo que haya que cambiar. Pueden ponerse para uso similar los compuestos **82a** y **82b** (Ejemplo 17).

Adicionalmente, mientras la presente invención se ha descrito particularmente en términos de ciertas realizaciones preferidas, la invención no está limitada a tales realizaciones preferidas. Por el contrario, el alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

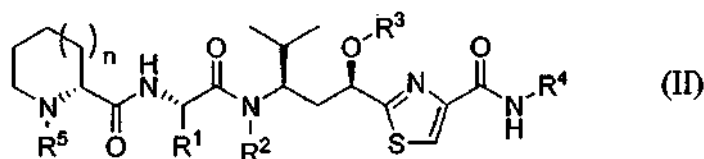
10 **REFERENCIAS**

Todas las citas de las siguientes referencias citadas en forma abreviada por el primer autor (o inventor) y fecha anterior en la presente memoria se proporcionan más adelante.

- 15 Abe y col., WO 97/2172 (1997).
 Boyd y col., US 2008/0279868 A1 (2008).
 Boyd y col., US 7.691.962 B2 (2010).
 Balasubramanian y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2996-2999.
 Balasubramanian y col., *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (2), 238-240.
- 20 Davis y col., US 2008/0176958 A1 (2008) [2008a].
 Domling, DE 10 2004 030 227 A1 (2006).
 Domling y col., US 2005/0239713 A1 (2005) [2005a].
 Domling y col., US 2005/0249740 A1 (2005) [2005b].
 Domling y col., *Mol. Diversity* **2005**, 9, 141-147 [2005c].
- 25 Domling y col., *Ang. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7235-7239.
 Ellman y col., WO 2009/012958 A2 (2009).
 Hamel y col., *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents* **2002**, 2, 19-53.
 Hoefle y col., DE 100 08 089 A1 (2001).
 Hoefle y col., *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75 (2-3), 167-178.
- 30 Hoefle y col., US 2006/0128754 A1 (2006) [2006a].
 Hoefle y col., US 2006/0217360 A1 (2006) [2006b].
 Kaur y col., *Biochem. J.* **2006**, 396, 235-242.
 Khalil y col., *ChemBioChem* **2006**, 7, 678-683.
 Leamon y col., *Cancer Res.* **2008**, 68 (23), 9839-9844.
- 35 Leamon y col., WO 2009/02993 A1 (2009).
 Leung y col., US 2002/0169125 A1 (2002).
 Low y col., WO 2009/026177 A1 (2009).
 Lundquist y col., *Org. Lett.* **2001**, 3, 781-783.
 Neri y col., *ChemMedChem* **2006**, 1, 175-180.
- 40 Patterson y col., *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9534-9541.
 Patterson y col., *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4362-4369.
 Peltier y col., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16018-16019.
 Reddy y col., *Mol. Pharmaceutics* **2009**, 6 (5), 1518-1525.
 Reichenbach y col. WO 98/13375 A1 (1998).
- 45 Richter, WO 2008/138561 A1 (2008).
 Sani y col., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3526-3529.
 Sasse y col., *J. Antibiotics* **2000**, 53 (9), 879-885.
 Sasse y col., *Nature Chem. Biol.* **2007**, 3 (2), 87-89.
 Schlupe y col., *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15 (1), 181-189.
- 50 Shankar y col., *SYNLETT* **2009**, 8, 1341-1345.
 Shibue y col., *Tetrahedron Lett.* **2009** 50, 3845-3848.
 Steinmetz y col., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4888-4892.
 Ullrich y col., *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, 48, 4422-4425.
 Vlahov y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18 (16), 4558-4561 [2008a].
- 55 Vlahov y col., US WO 2008/0248052 A1 (2008) [2008b].
 Vlahov y col., WO 2009/055562 A1 (2009).
 Vlahov y col., WO 2010/00048490 A1 (2010).
 Wang y col., *Chem. Biol. Drug. Des* **2007**, 70, 75-86.
 Wipf y col., *Org. Lett.* **2004**, 6 (22), 4057-4060.
- 60 Wipf y col., *Org. Lett.* **2007**, 9 (8), 1605-1607.
 Wipf y col., US 2010/0047841 (2010).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (II)



5

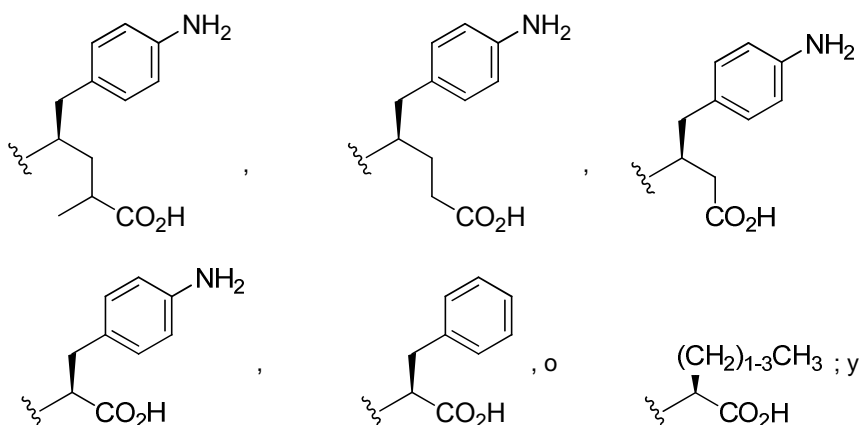
en la que

n es 0, 1 o 2;

10 R¹, R² y R³ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀ sin sustituir o sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sin sustituir o sustituido, alquino C₂-C₁₀ sin sustituir o sustituido, arilo sin sustituir o sustituido, heteroarilo sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alquilo C₁-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alquilo C₁-C₁₀), (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquilo C₁-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, cicloalifático sin sustituir o sustituido, heterocicloalifático sin sustituir o sustituido, arilalquilo sin sustituir o sustituido o alquilarilo sin sustituir o sustituido;

15

R⁴ es



20

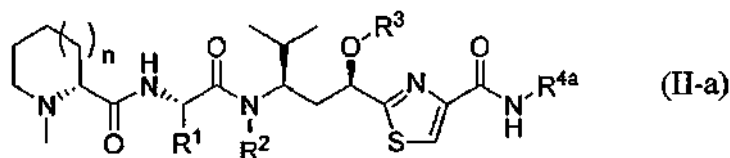
25 R⁵ es H, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅, alquino C₂-C₅, CO(alquilo C₁-C₅), CO(alqueno C₂-C₅) o CO(alquino C₂-C₅);

25

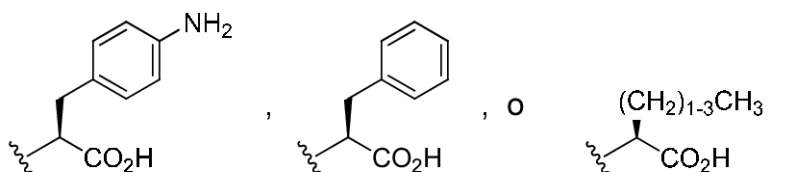
o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo, una amida farmacéuticamente aceptable del mismo en el grupo carboxilo de R⁴ con el grupo α-amino de un α-aminoácido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (II-a)

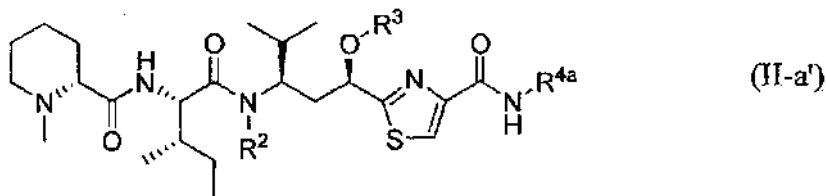


en la que R^{4a} es



35

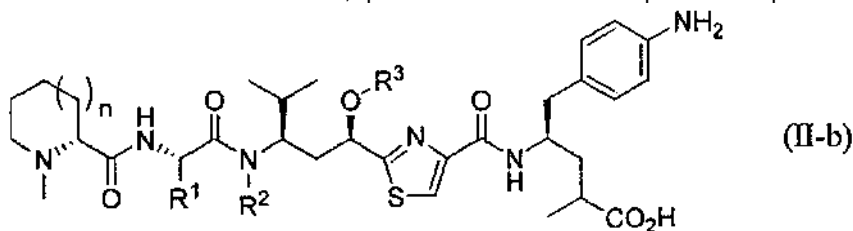
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, que tiene una estructura representada por la fórmula (II-a'):



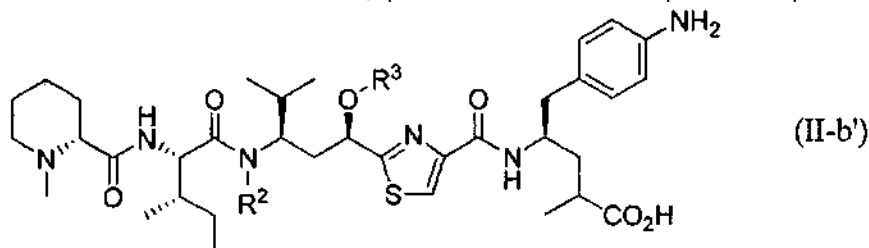
en la que

- 5 R^2 es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, CH₂O(alquilo C₁-C₅), CH₂O(alquenilo C₂-C₅), CH₂O(C=O)(alquilo C₁-C₅) o CH₂OC(=O)(alquenilo C₂-C₅); y
 R^3 es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, C(=O)alquilo C₁-C₅ o C(=O)alquenilo C₂-C₅.

10 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (II-b):



5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene una estructura representada por la fórmula (II-b'):

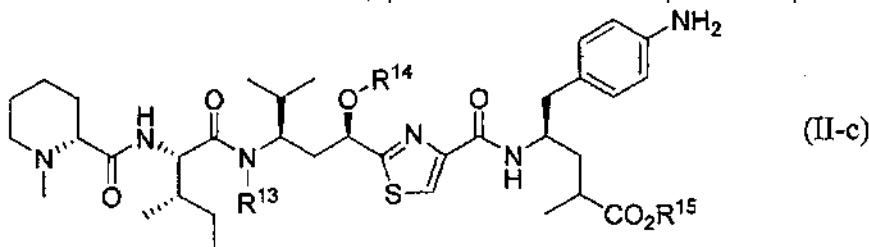


15 en la que

- 15 R^2 es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, CH₂O(alquilo C₁-C₅), CH₂O(alquenilo C₂-C₅), CH₂O(C=O)(alquilo C₁-C₅) o CH₂OC(=O)(alquenilo C₂-C₅); y
 R^3 es H, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, C(=O)alquilo C₁-C₅ o C(=O)alquenilo C₂-C₅.

20 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tienen una estructura de acuerdo con las fórmulas (III-a), (III-b), (III-c), (III-d), (III-e), (III-f), (III-g), (III-h), (III-i), (III-j), (III-k), (III-l), (III-m), (III-n), (III-o), (III-p), (III-q), (III-r), (III-s), (III-t), (III-u), (III-v), (III-w) o (III-y).

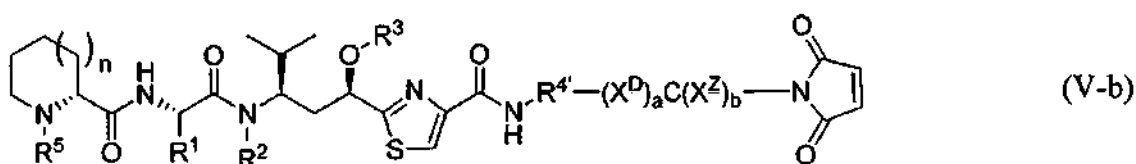
25 7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (II-c)



en la que R^{13} es Me, n-Pr, CH₂OMe o CH₂OC(=O)CH₂CH(Me)₂; R^{14} es Me o C(=O)Me; y R^{15} es H o alquilo C₁-C₅.

30

8. Una molécula enlazadora de compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (V-b)

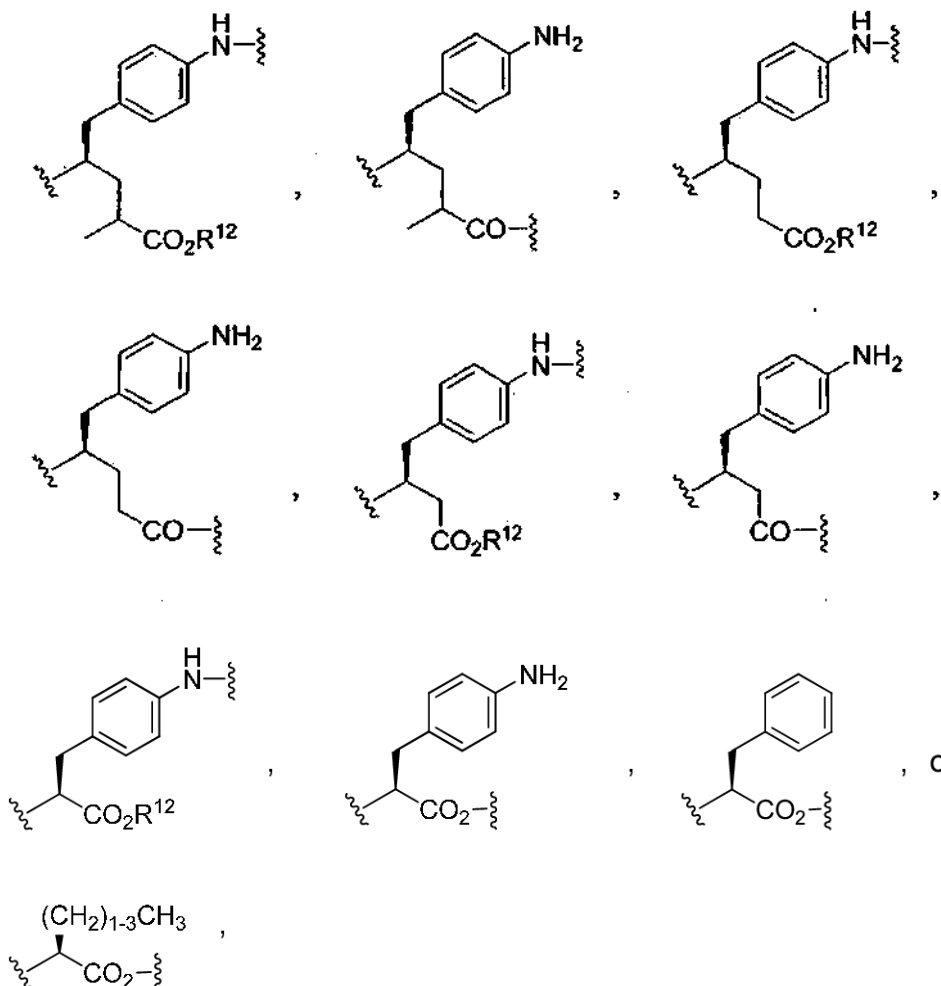


5 en la que

n es 0, 1 o 2;

10 R¹, R² y R³ son independientemente H, alquilo C₁-C₁₀ sin sustituir o sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sin sustituir o sustituido, alquino C₂-C₁₀ sin sustituir o sustituido, arilo sin sustituir o sustituido, heteroarilo sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alquilo C₁-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂O(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alquilo C₁-C₁₀), (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquilo C₁-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alqueno C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquino C₂-C₁₀) sin sustituir o sustituido, cicloalifático sin sustituir o sustituido, heterocicloalifático sin sustituir o sustituido, arilalquilo sin sustituir o sustituido o alquilarilo sin sustituir o sustituido;

15 R⁴ es

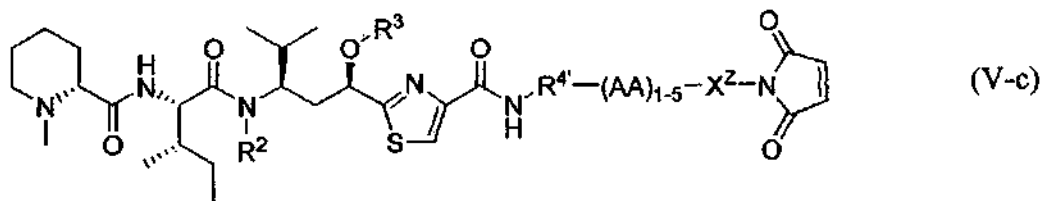


20 en las que R¹² es H, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅ o alquino C₂-C₅; y R⁵ es H, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅, alquino C₂-C₅, CO(alquilo C₁-C₅), CO(alqueno C₂-C₅) o CO(alquino C₂-C₅);

25 X^D y X^Z son grupos espaciadores;
C es un grupo escindible; y
a y b son independientemente 0 o 1;

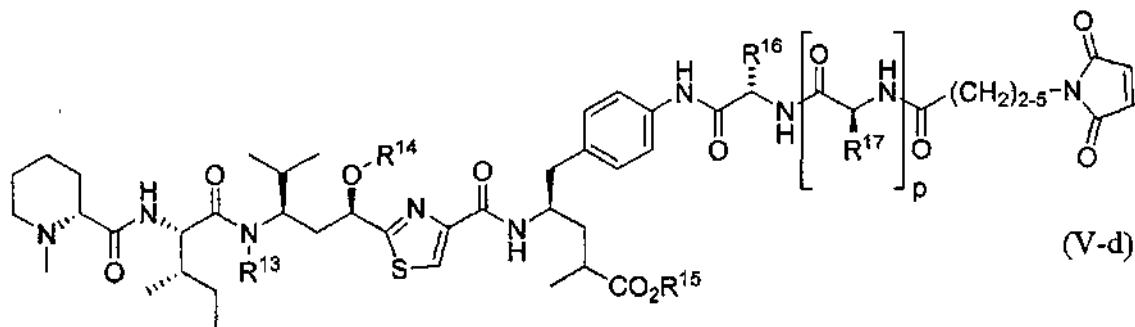
en donde el grupo R^4 está unido mediante un grupo carboxilo o un grupo amina de los mismo al grupo X^D en el caso de que a sea 1 o al grupo C en el caso de que a sea 0.

5 9. La molécula enlazadora de compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 que tiene una estructura representada por la fórmula (V-c):



10 en la que R^2 , R^3 y R^4 son como se han definido en la reivindicación 8, cada AA es independientemente un aminoácido natural y X^Z es $CH_2CH_2NHC(=O)(CH_2)_{2-5}$ o $C(=O)(CH_2)_{2-5}$

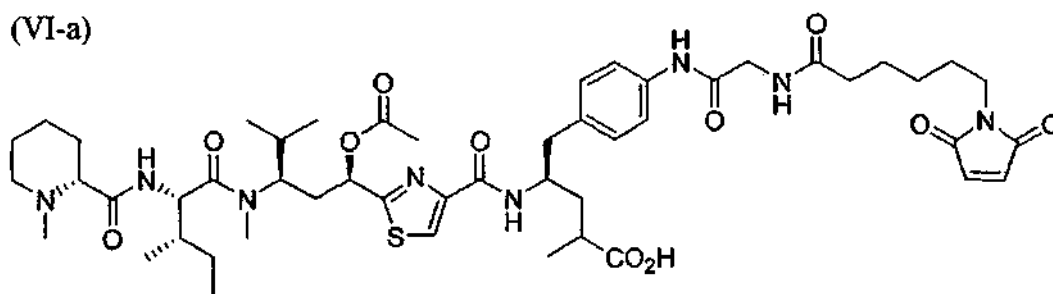
15 10. La molécula enlazadora de compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 que tiene una estructura representada por la fórmula (V-d):



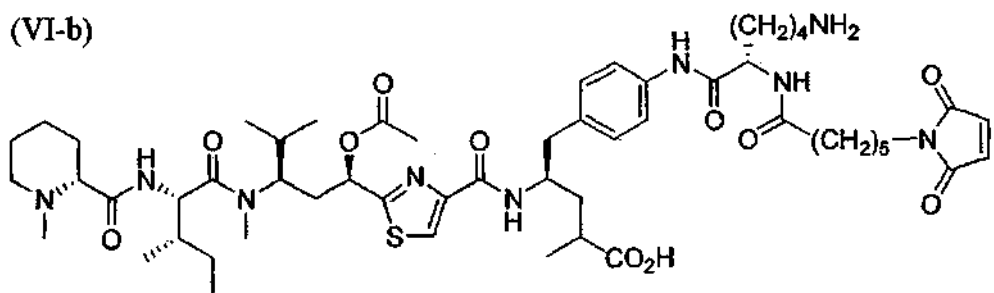
20 en la que R^{13} es Me, n-Pr, CH_2OMe o $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$; R^{14} es Me o $C(=O)Me$; R^{15} es H o alquilo C_1-C_5 ; R^{16} es $(CH_2)_4NH_2$ o $(CH_2)_3NHC(=O)NH_2$; R^{17} es $C(Me)_2$ o Me; y p es 0 o 1.

11. La molécula enlazadora de compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 que tiene una estructura representada por una de las fórmulas (VI-a) a (VI-t)

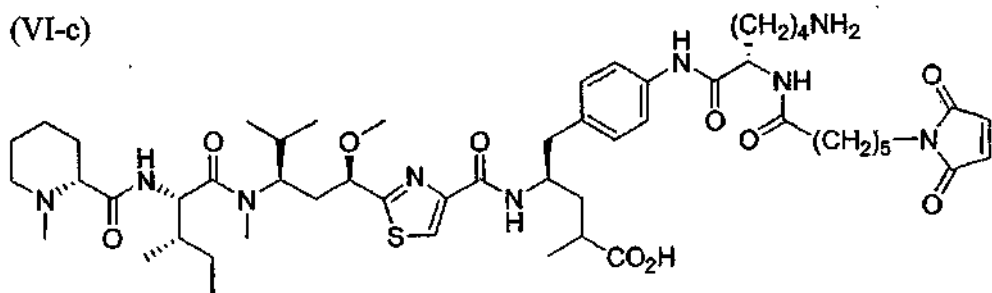
(VI-a)



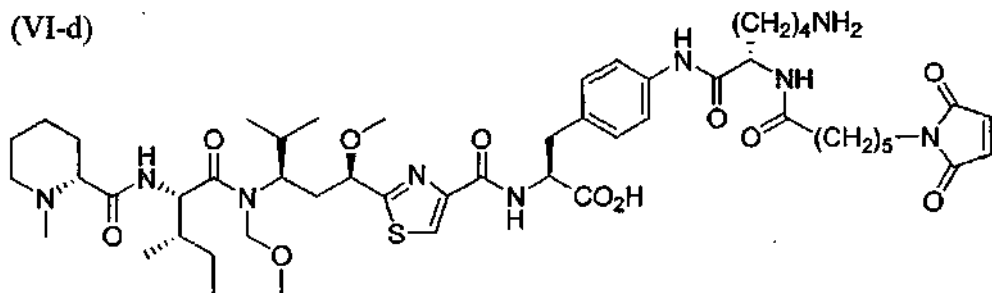
(VI-b)



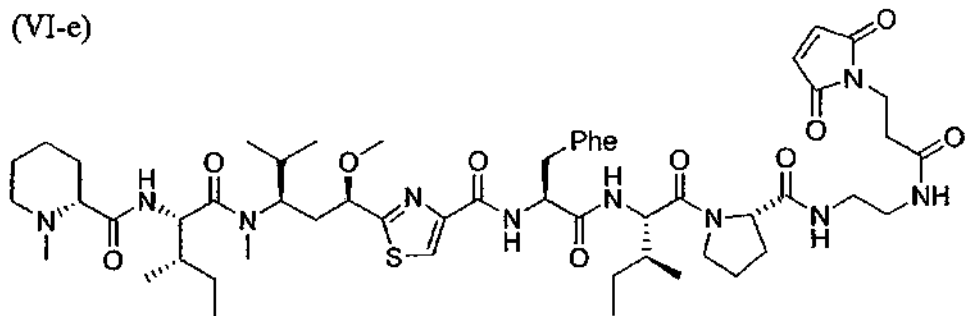
(VI-c)



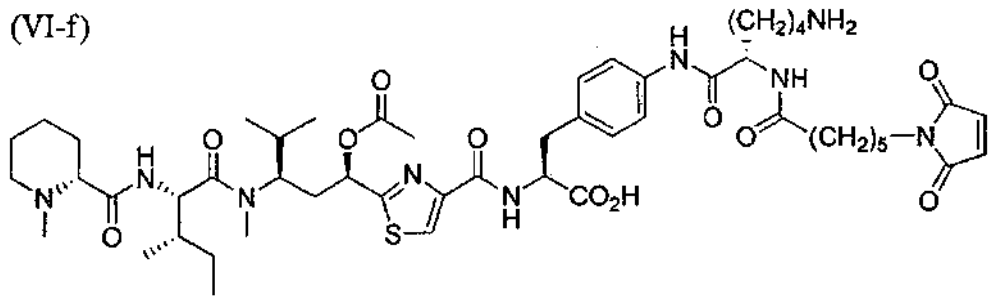
(VI-d)



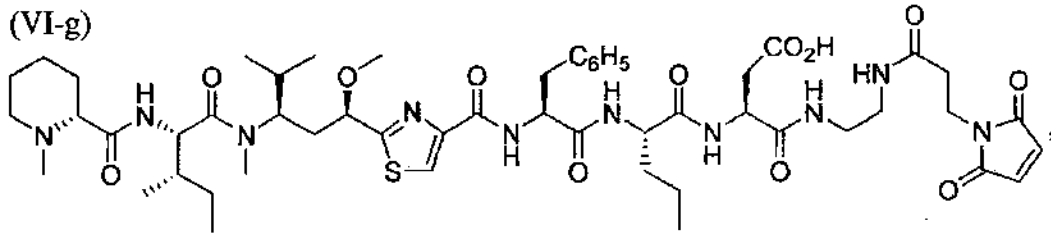
(VI-e)



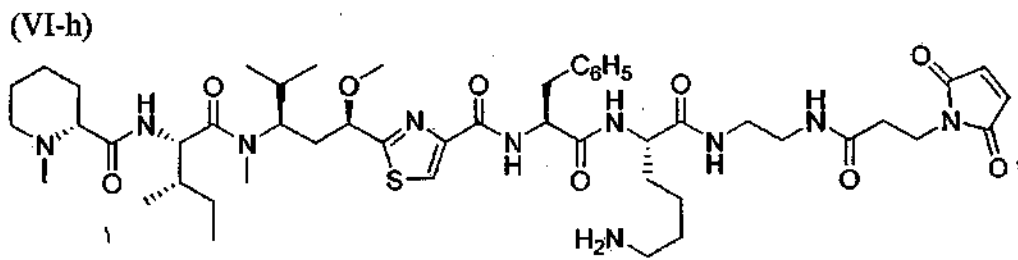
(VI-f)



(VI-g)

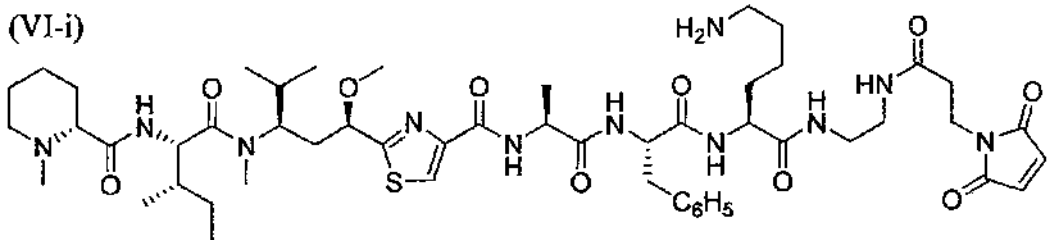


(VI-h)

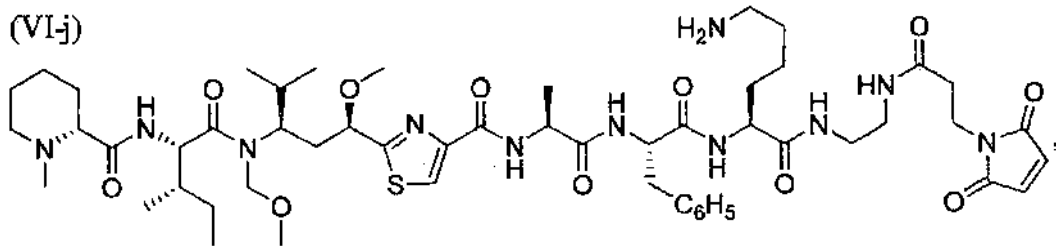


5

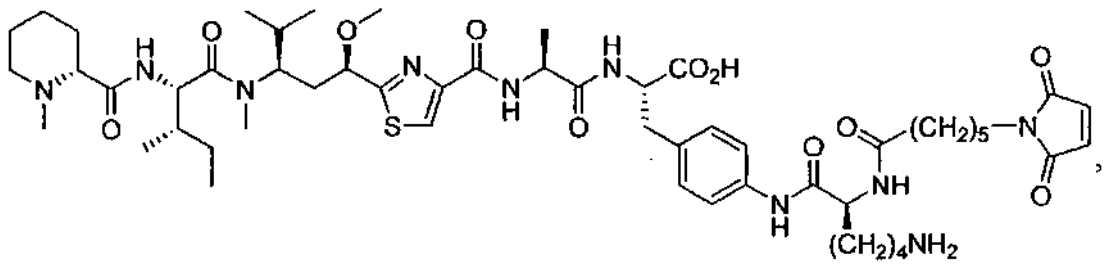
(VI-i)



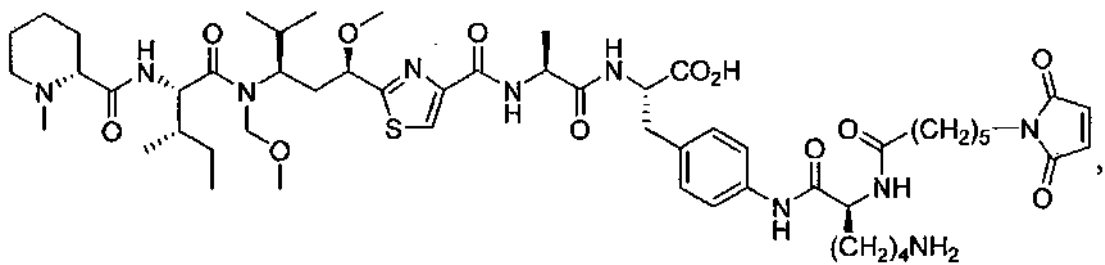
(VI-j)



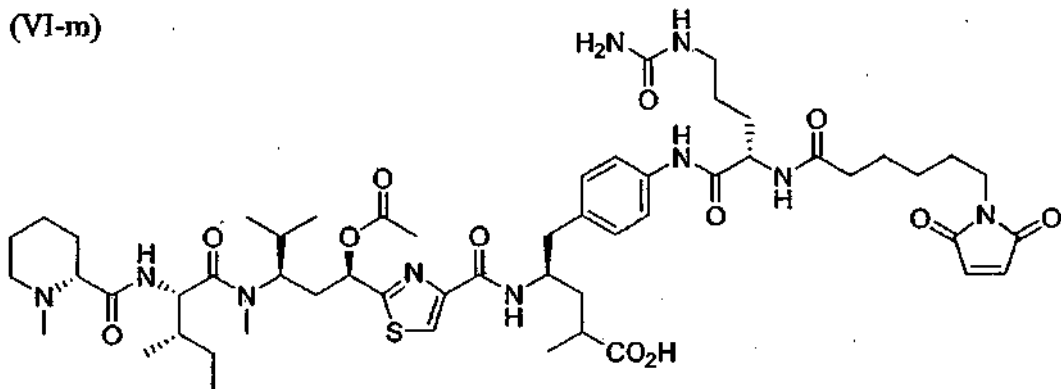
(VI-k)



(VI-l)

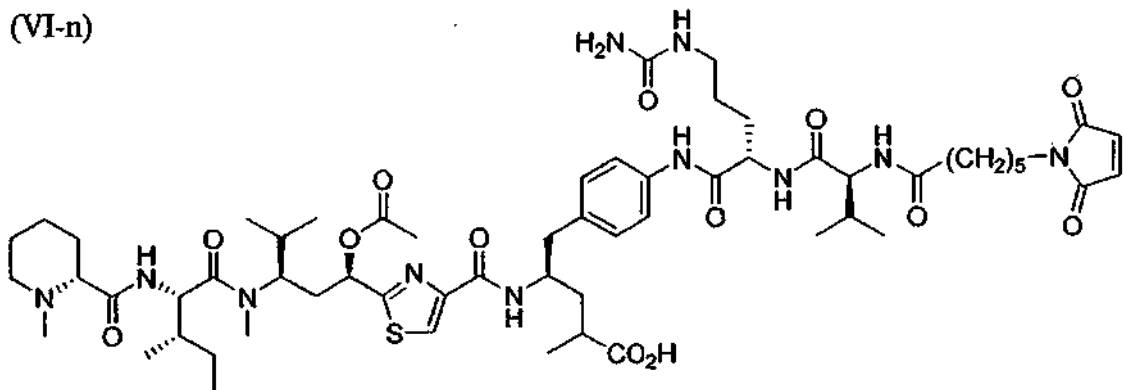


(VI-m)

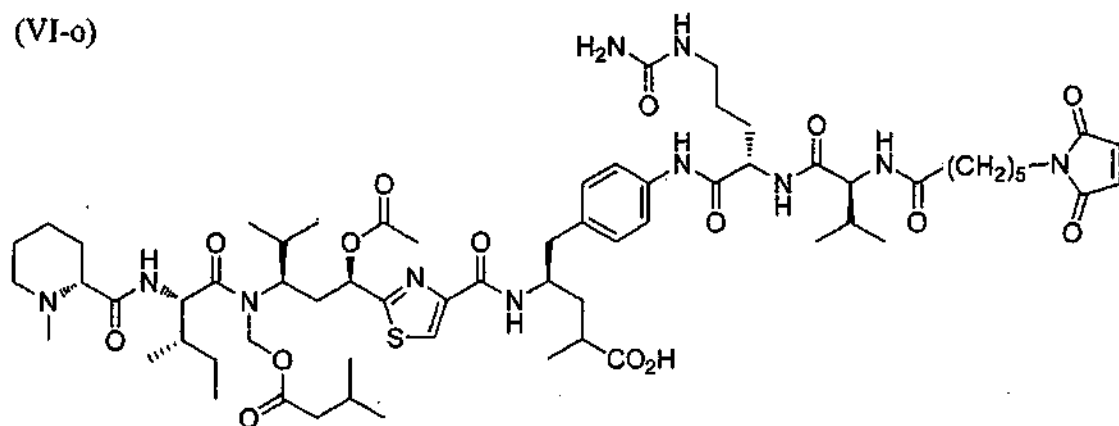


5

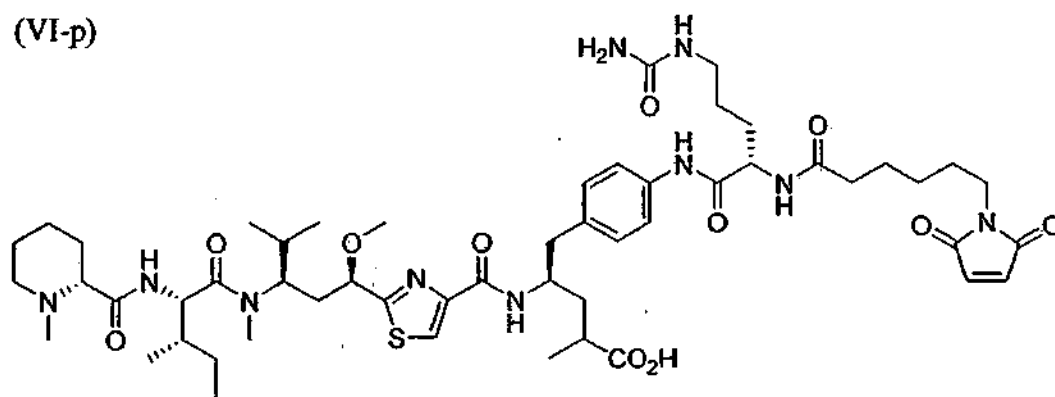
(VI-n)



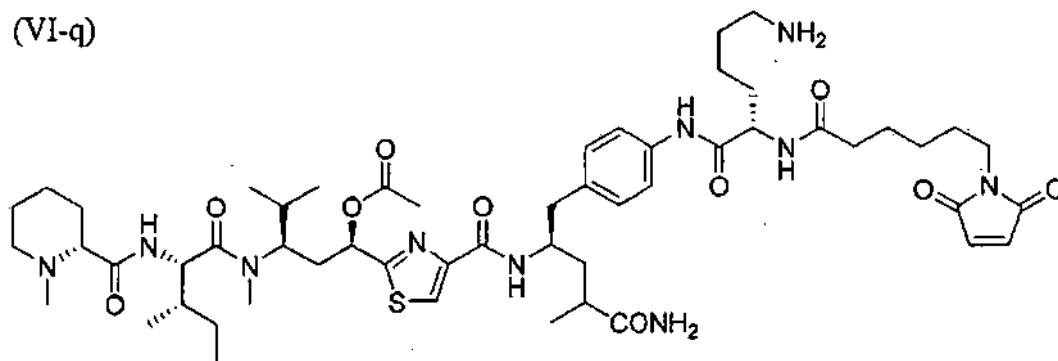
(VI-o)



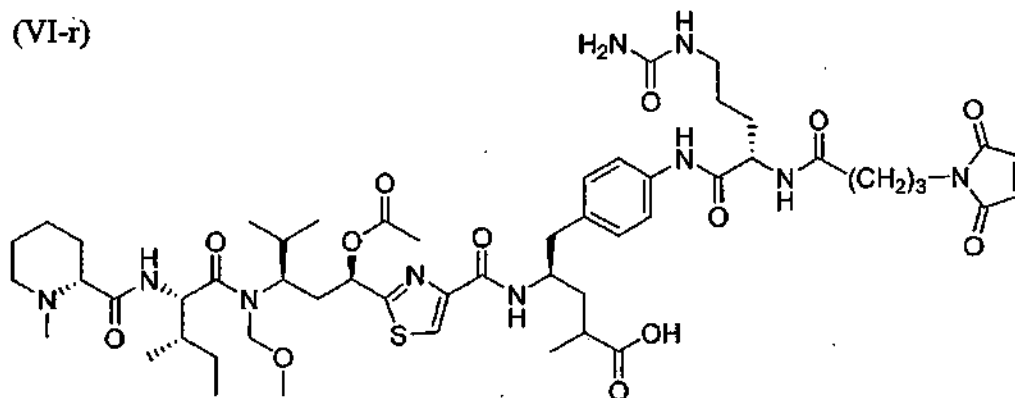
(VI-p)



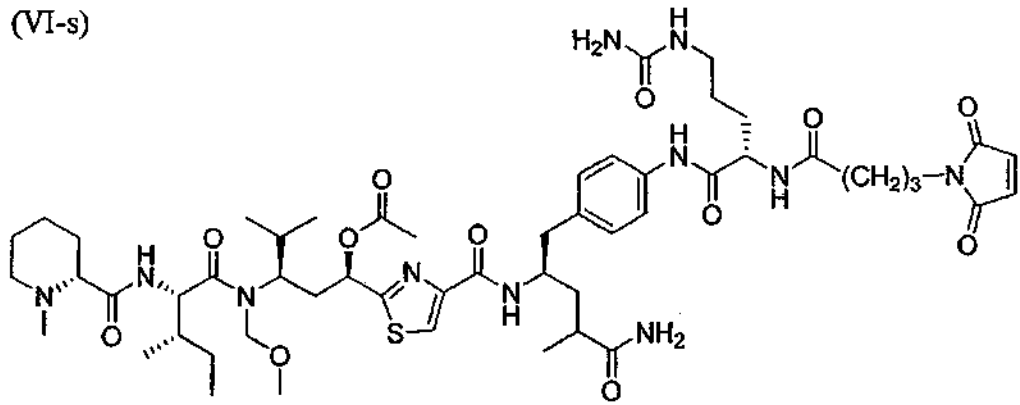
(VI-q)



(VI-r)

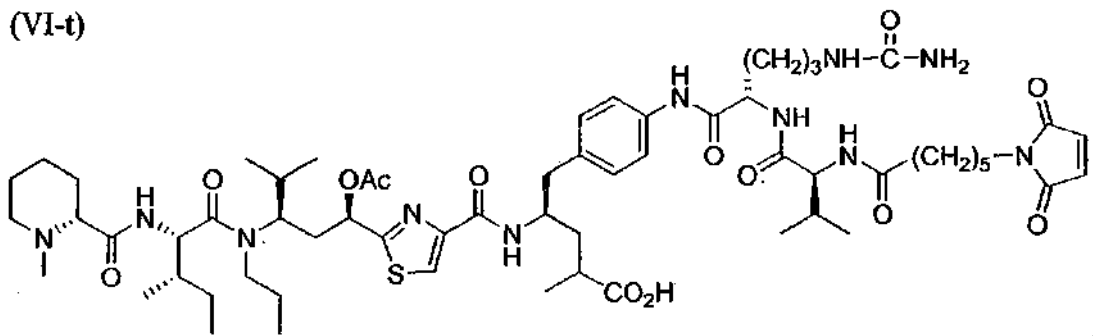


(VI-s)



y

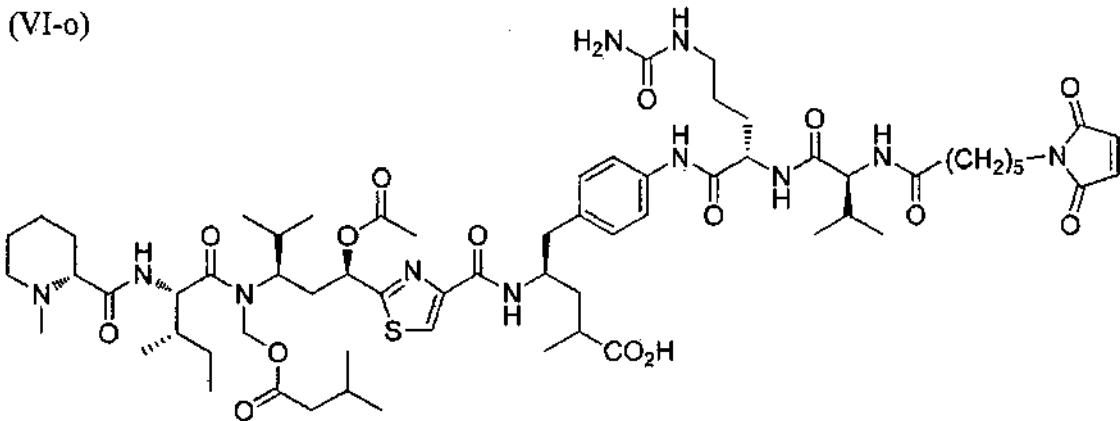
(VI-t)



5

12. La molécula enlazadora de compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 que tiene una estructura representada por la fórmula (VI-o)

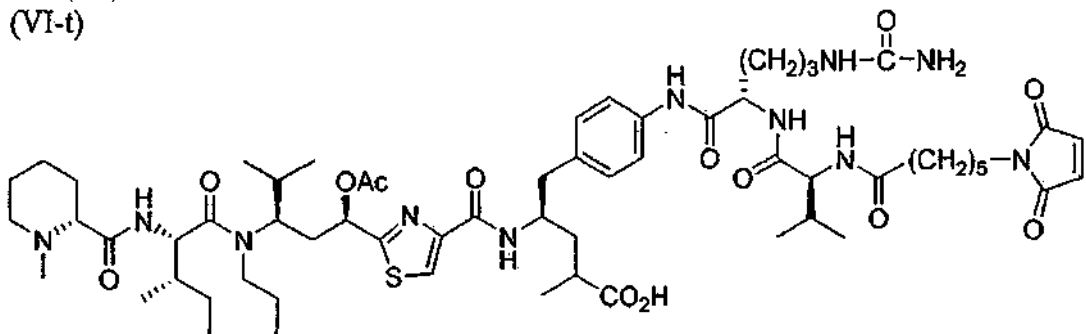
(VI-o)



10

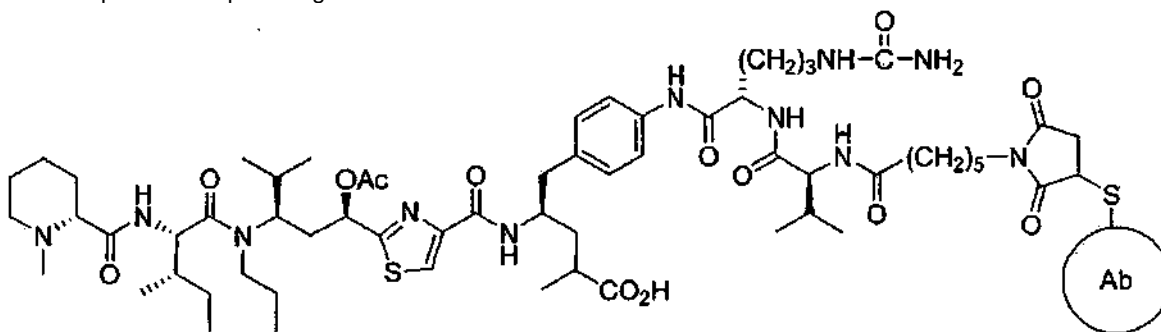
13. La molécula enlazadora de compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 que tiene una estructura representada por la fórmula (VI-t)

(VI-t)



14. Un conjugado que comprende la molécula enlazadora de compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 conjugada a un ligando mediante el producto de adición nucleófila de un grupo sulfhidrido del ligando y el grupo maleimida de la molécula enlazadora de compuesto, en donde el ligando se selecciona entre anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y miméticos de anticuerpo.

5 15. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la molécula enlazadora de compuesto tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



10 en la que Ab representa el anticuerpo anti-mesotelina monoclonal humano 6A4 que tiene la secuencia de la región variable de cadena pesada:

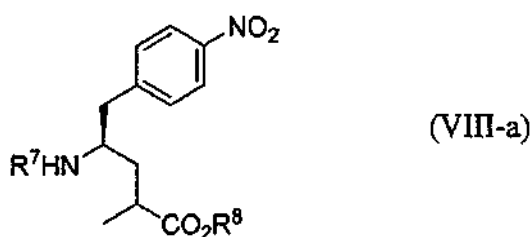
**QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGITFRIFYGMHWVRQAPGKGLEWVAVLWY
DGSHEYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDGDYYDSGS
PLDYWGQGTLLVTVSS**

15 y la secuencia de la región variable de cadena ligera:

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFLT TISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK.**

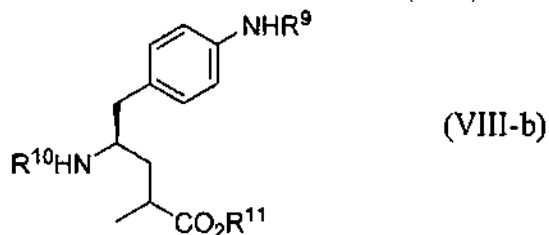
20 16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento de un cáncer.

17. Un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (VIII-a)



25 en la que R⁷ es H o un grupo protector de amina y R⁸ es H, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, arilo, cicloalifático, alquilcicloalifático, arilalquilo o alquilarilo.

18. Un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (VIII-b)



30 en la que R⁹ y R¹⁰ son independientemente H o un grupo protector de amina y R¹¹ es H, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, arilo, cicloalifático, alquilcicloalifático, arilalquilo o alquilarilo.

Fig. 1a

Esquema 1 (parte 1 de 2)

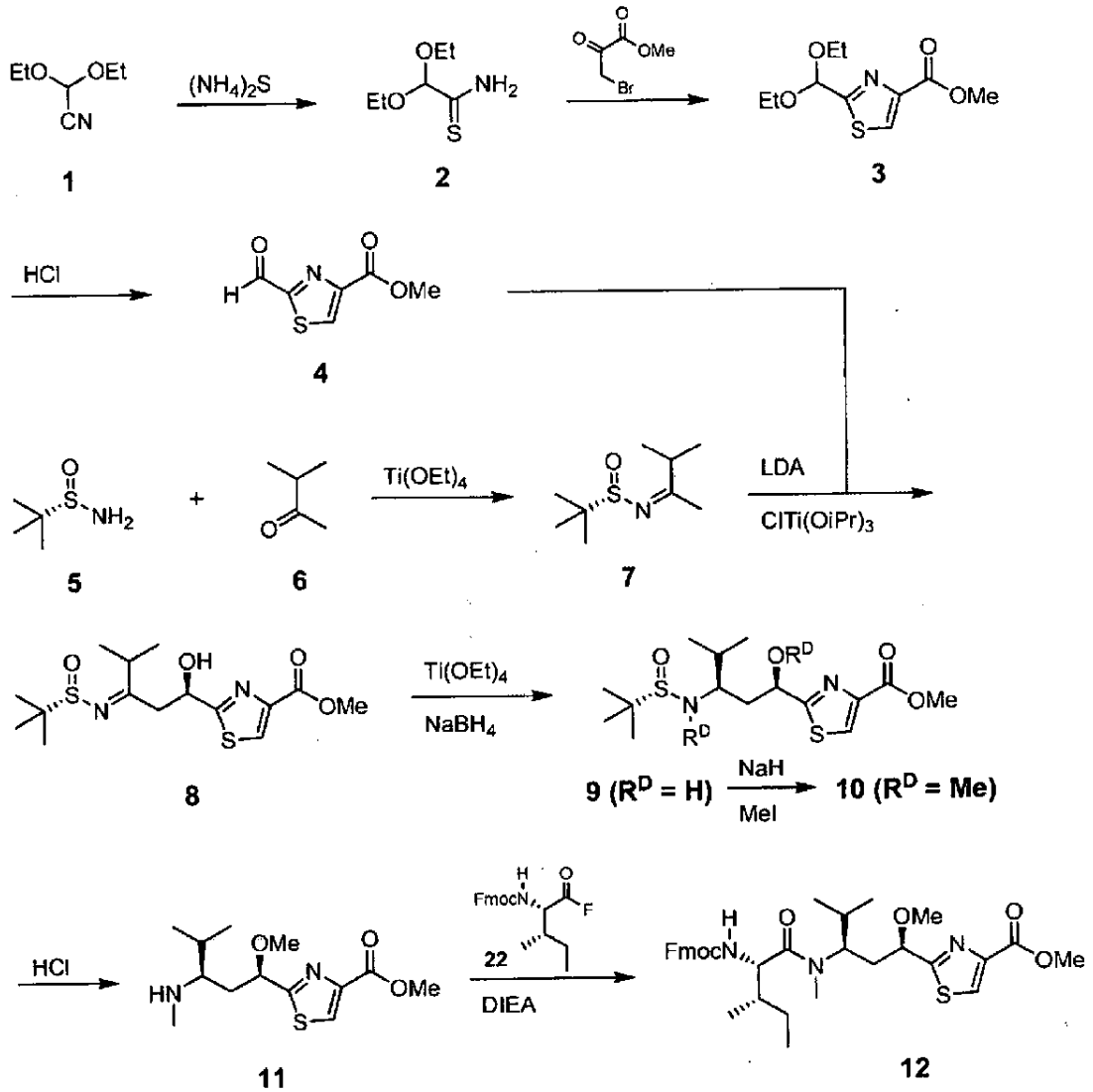


Fig. 1b

Esquema 1 (parte 2 de 2)

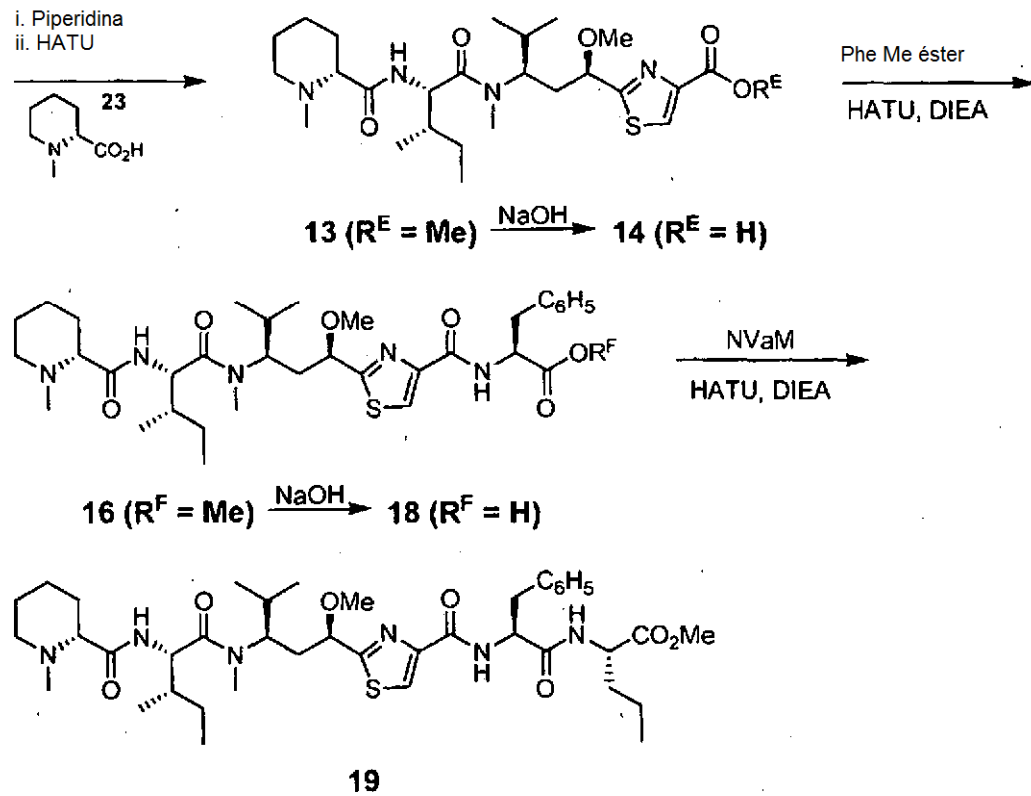


Fig. 2

Esquema 2

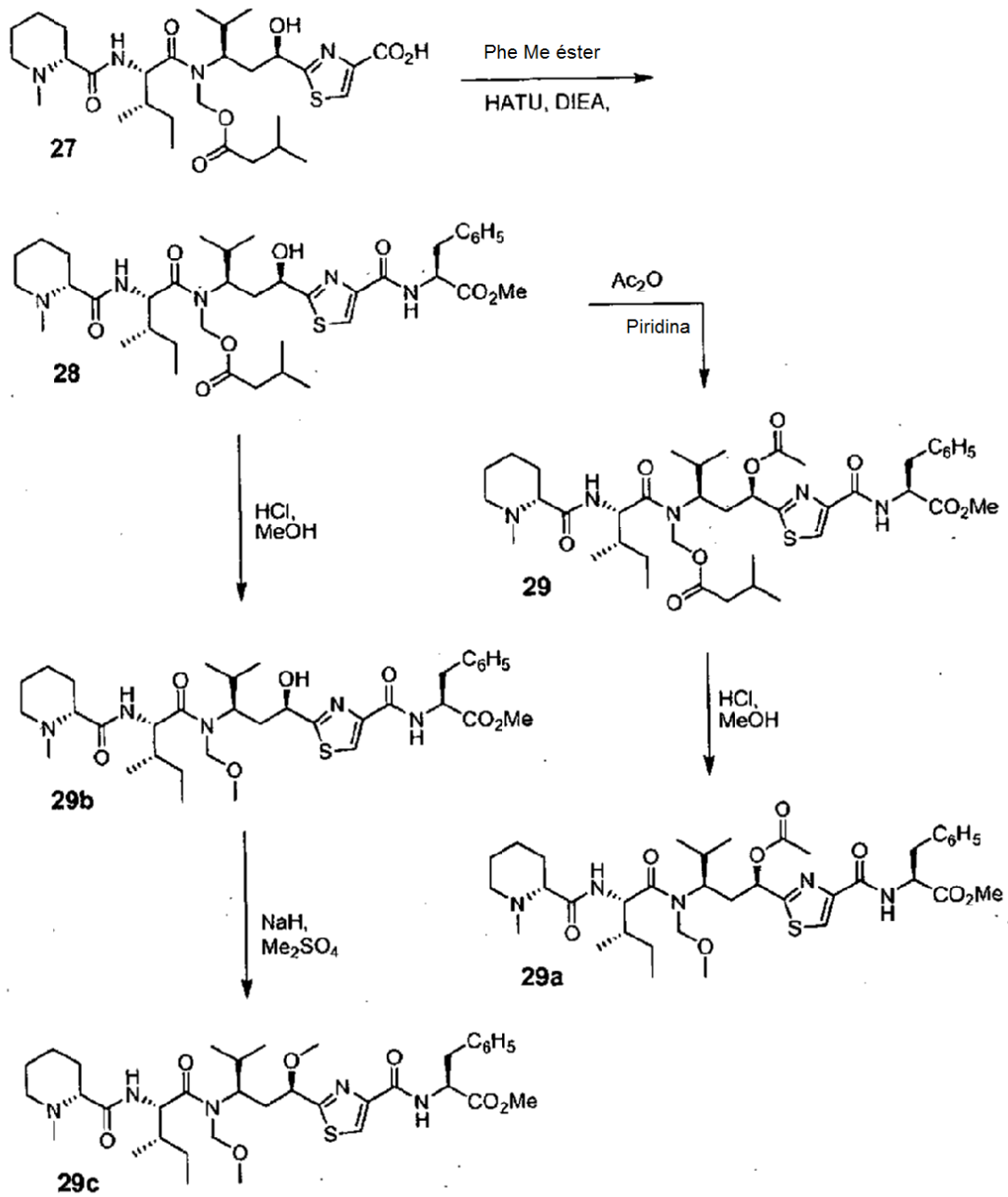


Fig. 3

Esquema 3

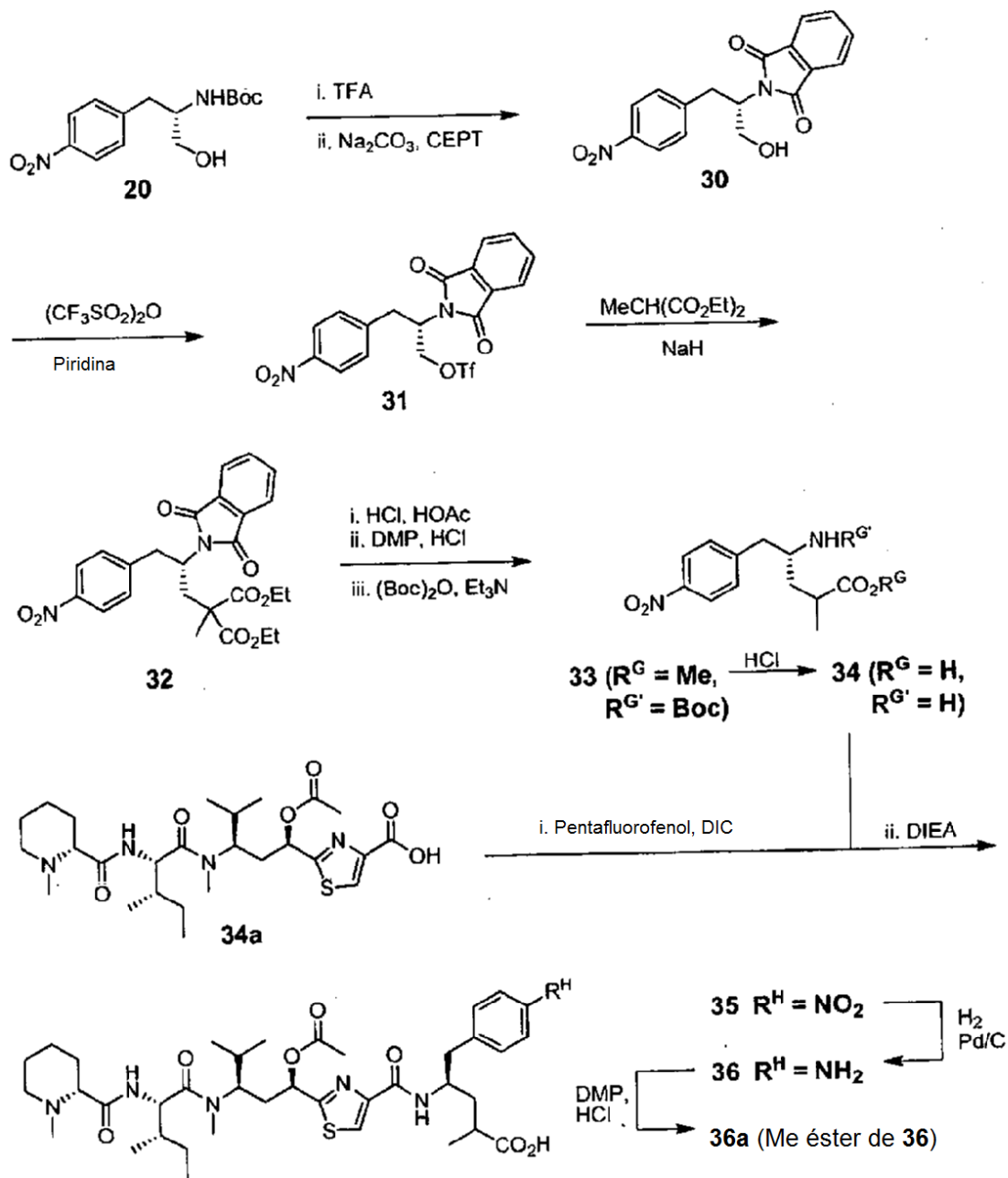


Fig. 4

Esquema 4

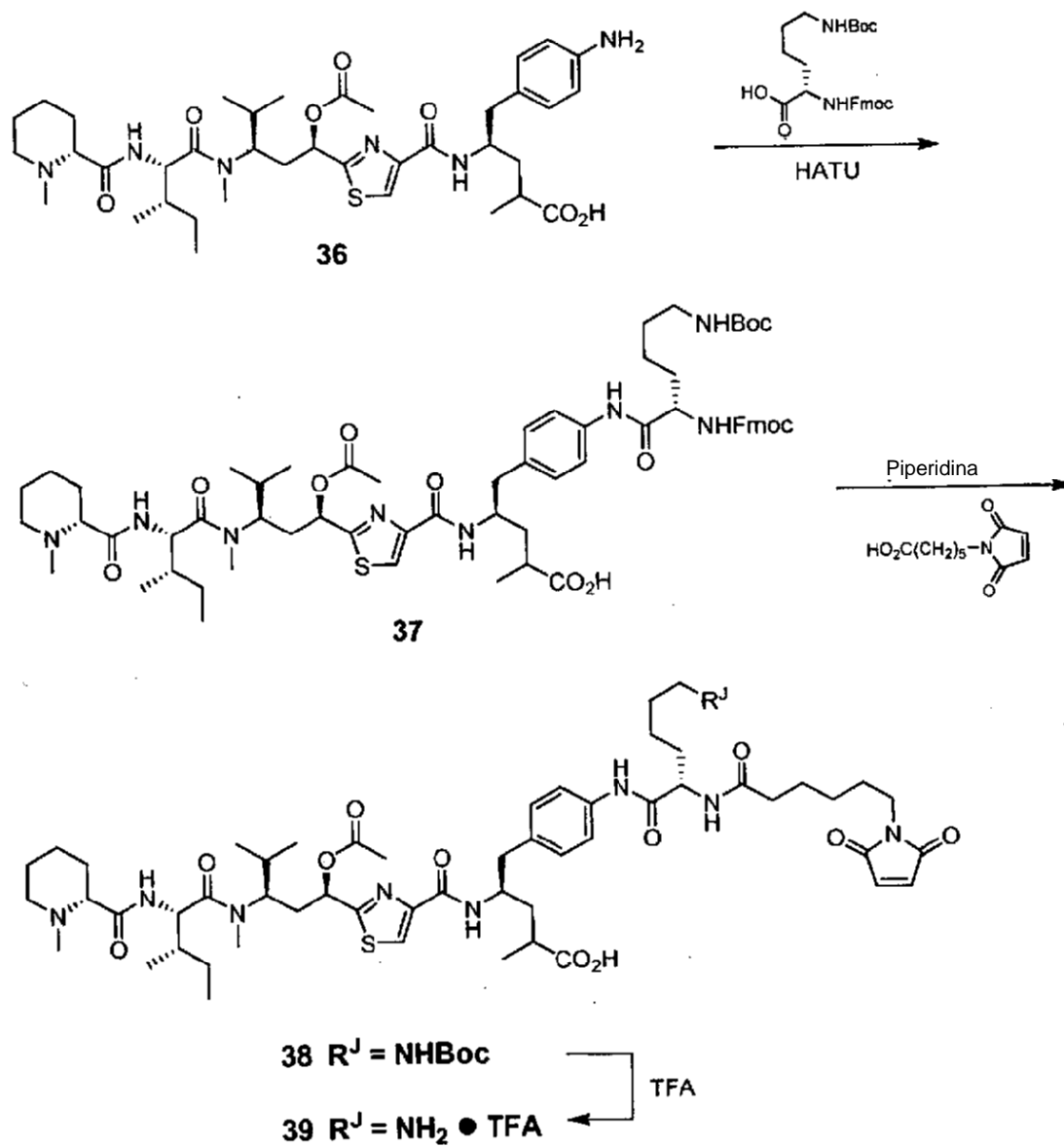


Fig. 5

Esquema 5

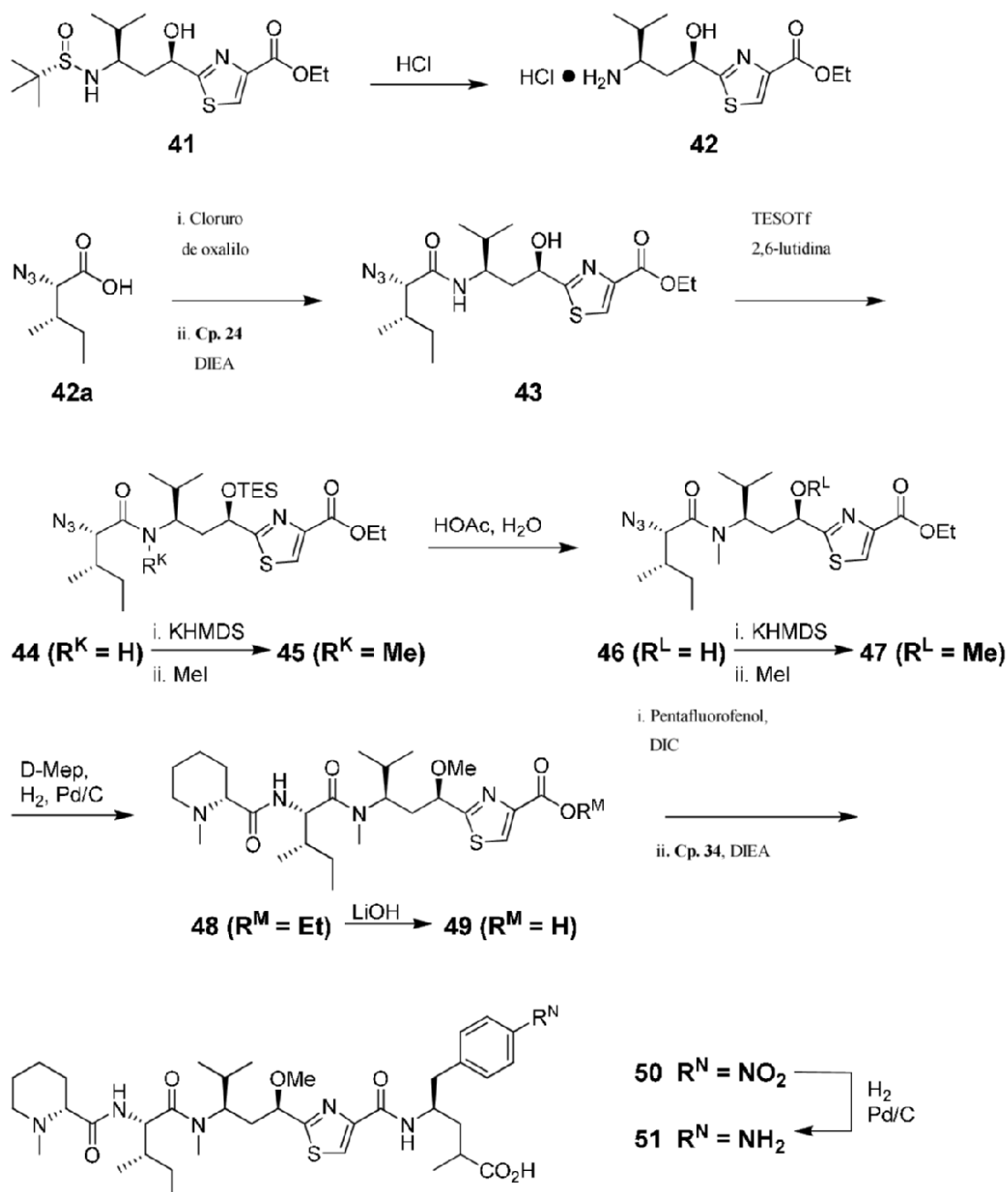


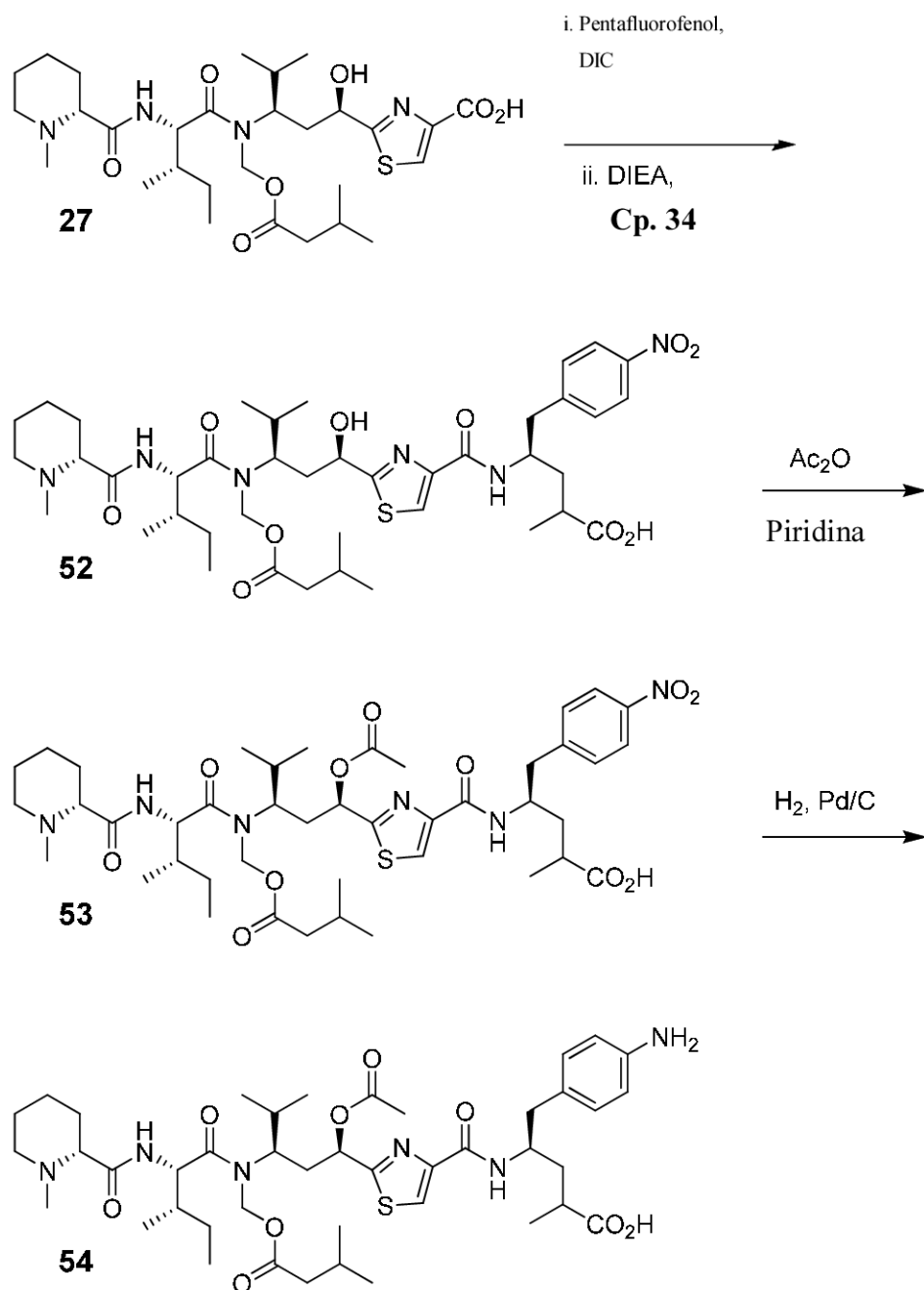
Fig. 6**Esquema 6**

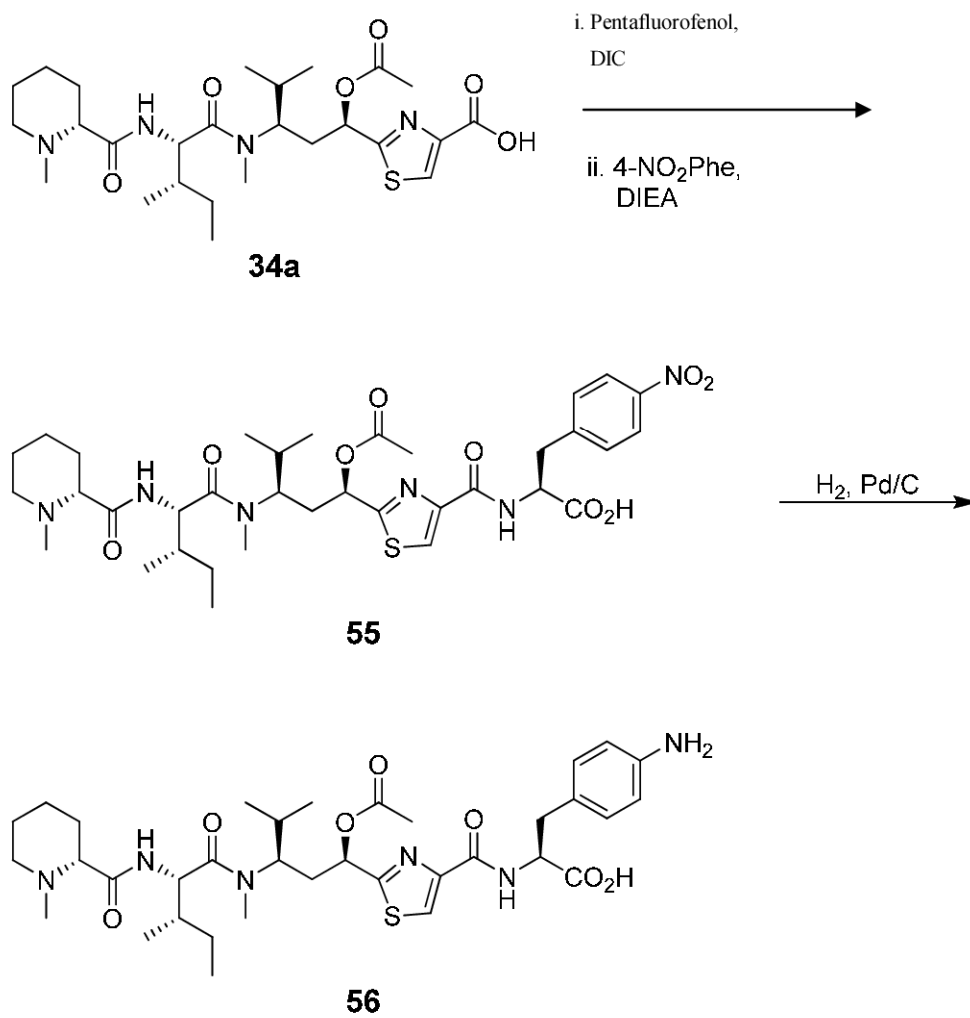
Fig. 7**Esquema 7**

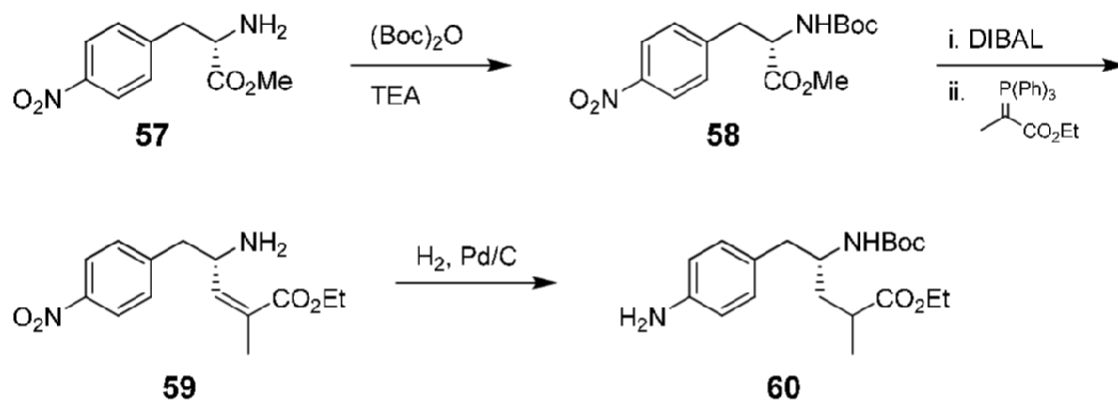
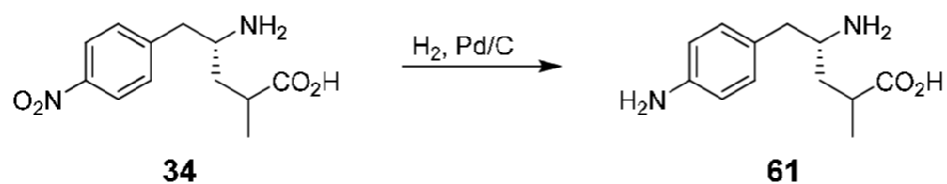
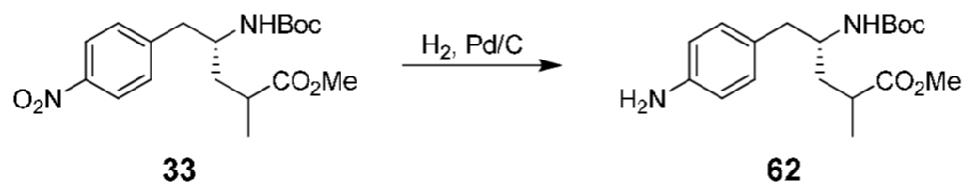
Fig. 8a**Esquema 8****Fig. 8b****Esquema 9****Fig. 8c****Esquema 10**

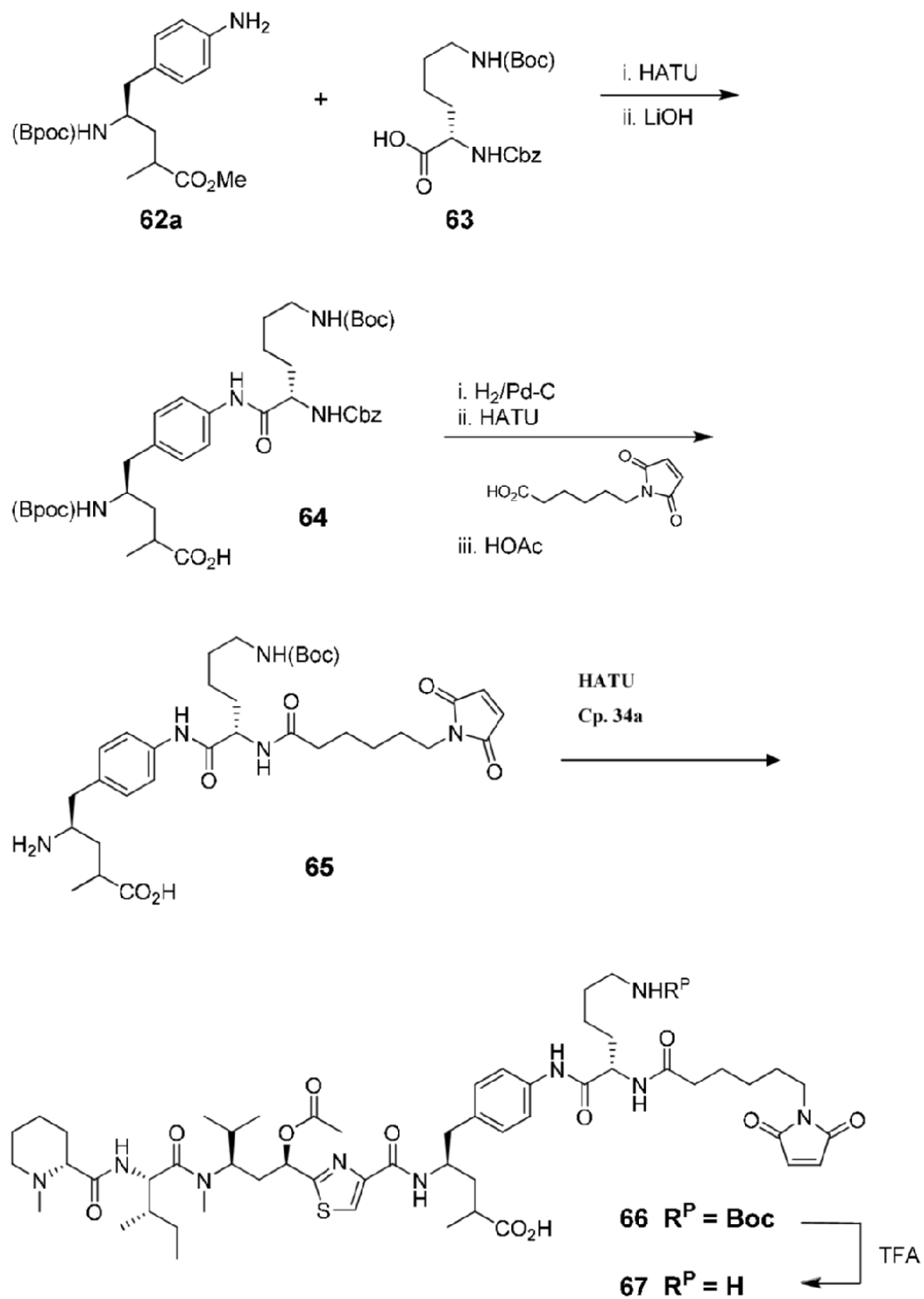
Fig. 9**Esquema 11**

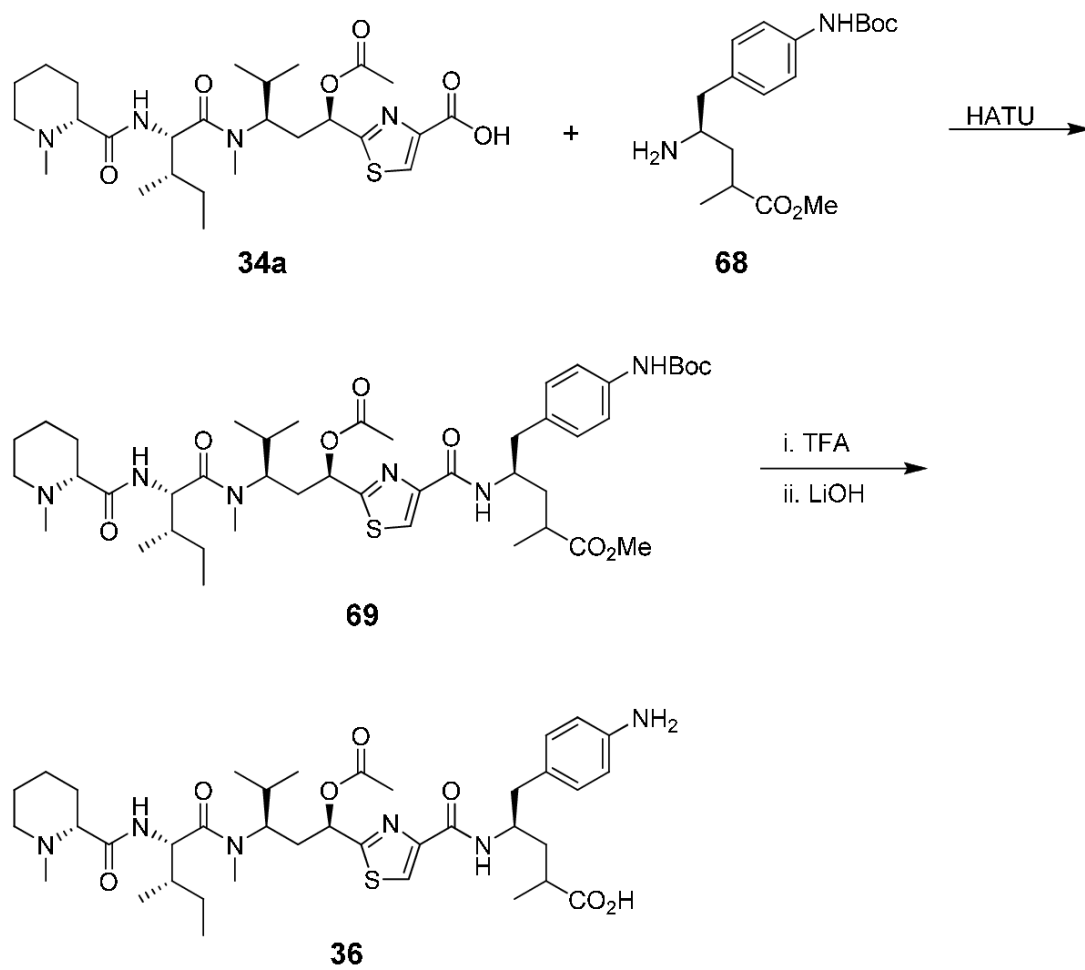
Fig. 10**Esquema 12**

Fig. 11a

Ensayo de Proliferación de HL-60 con ³H-Timidina

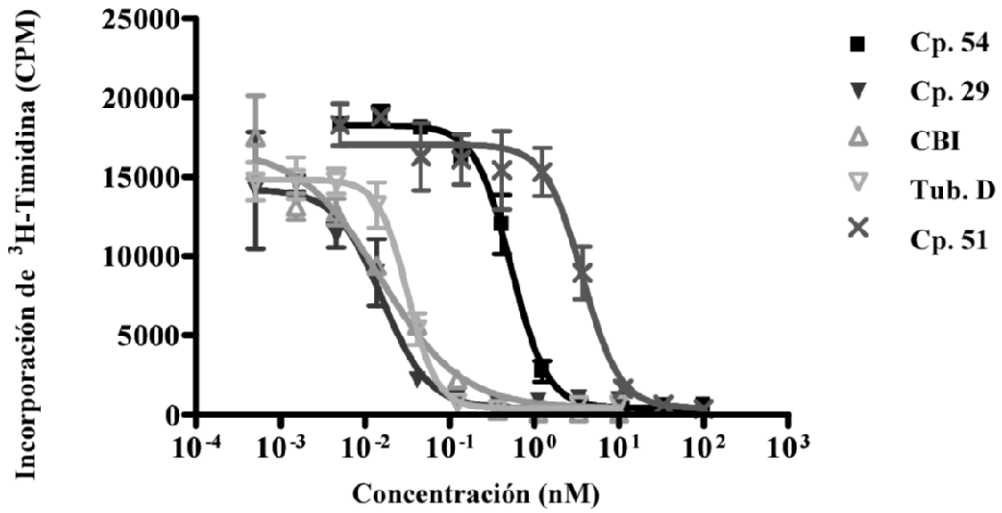


Fig. 11b

Ensayo de Proliferación de 786-0 con ³H-Timidina

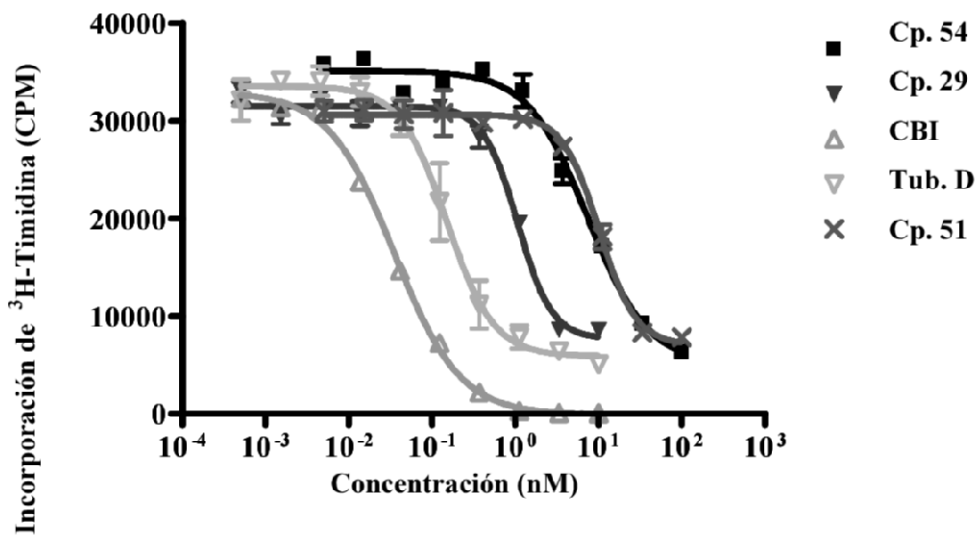


Fig. 12a

Ensayo de Luminiscencia de ATP de HL-60

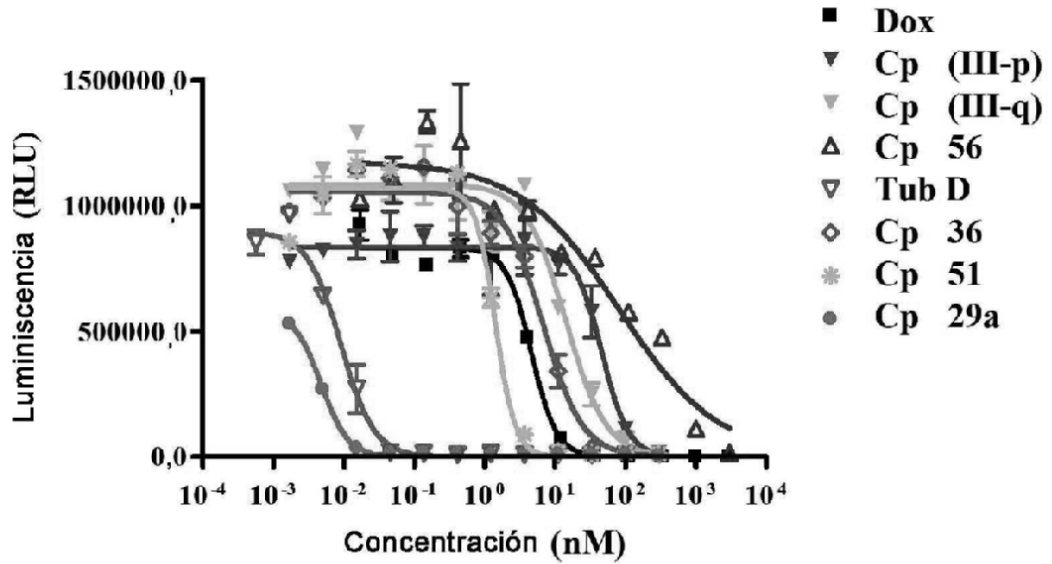


Fig. 12b

Ensayo de Luminiscencia de ATP de 786-0

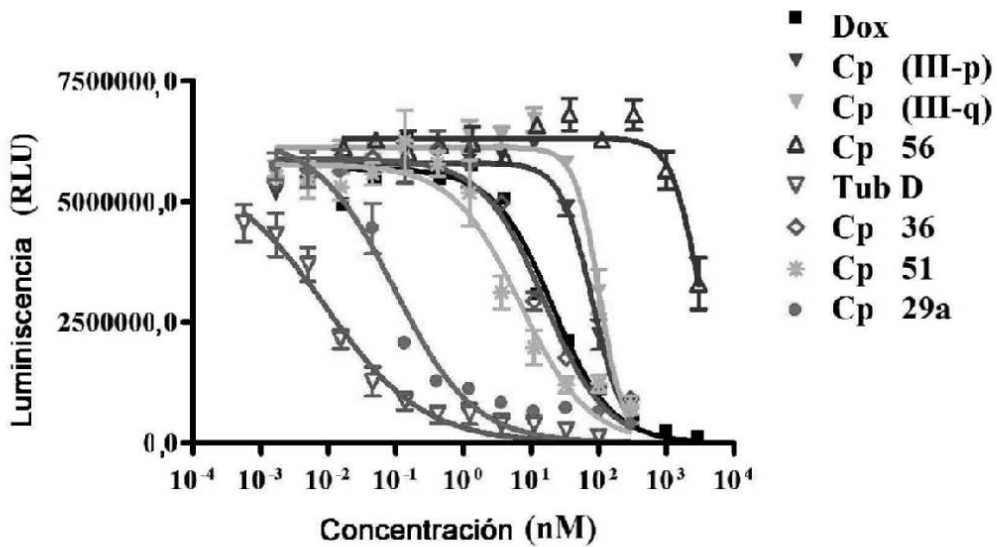


Fig. 12c

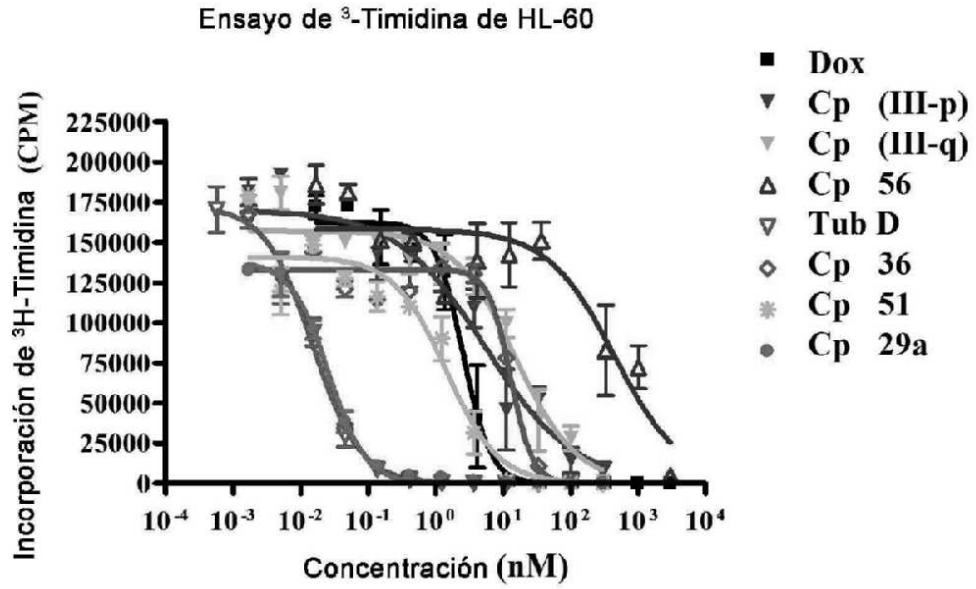


Fig. 12d

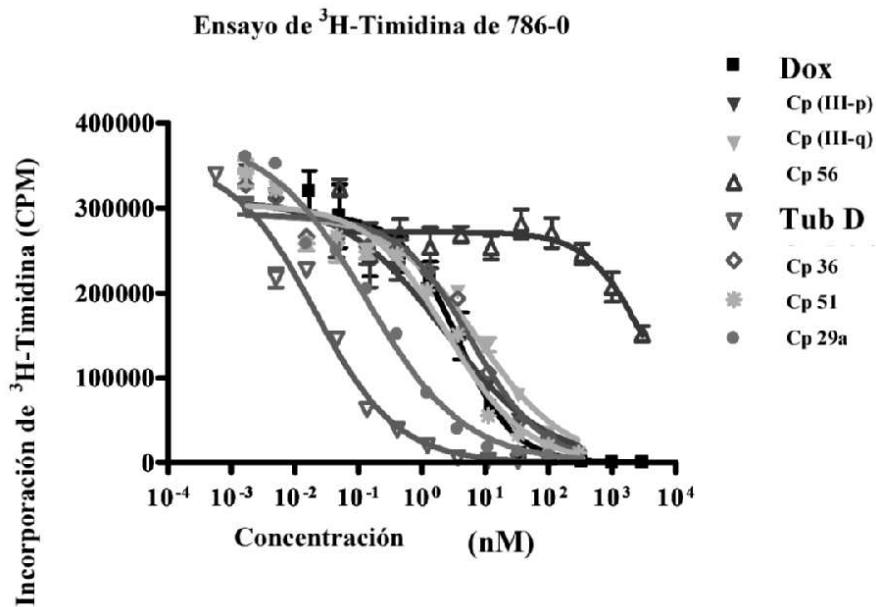


Fig. 13

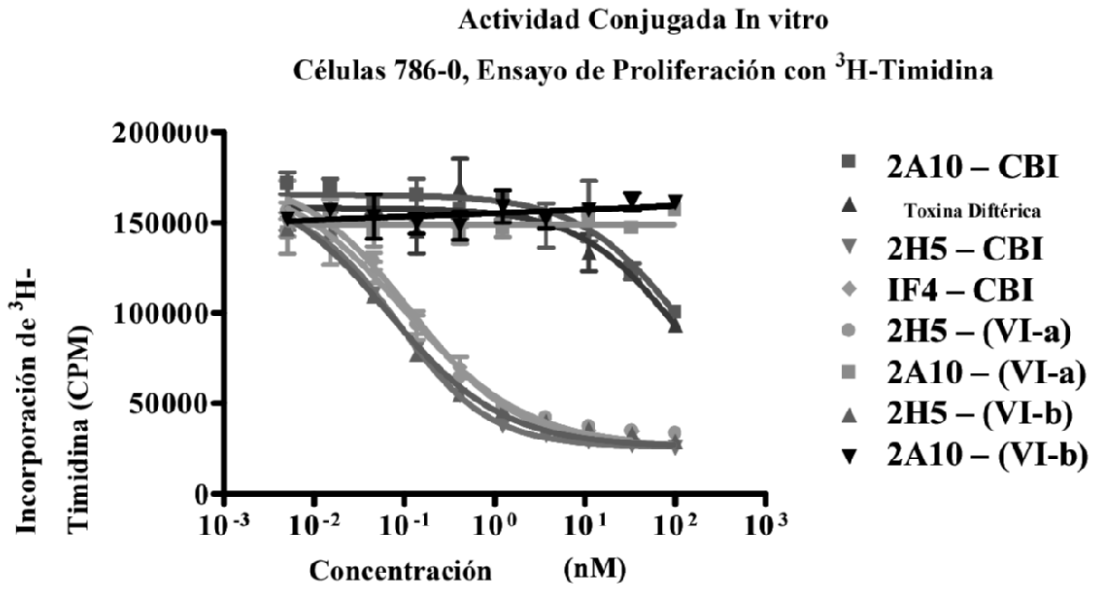


Fig. 14

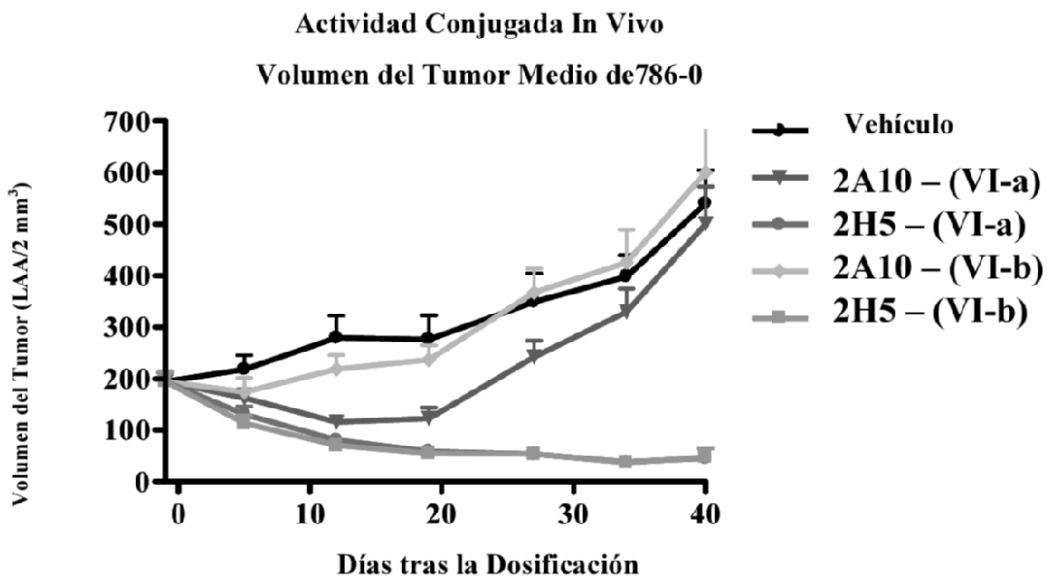


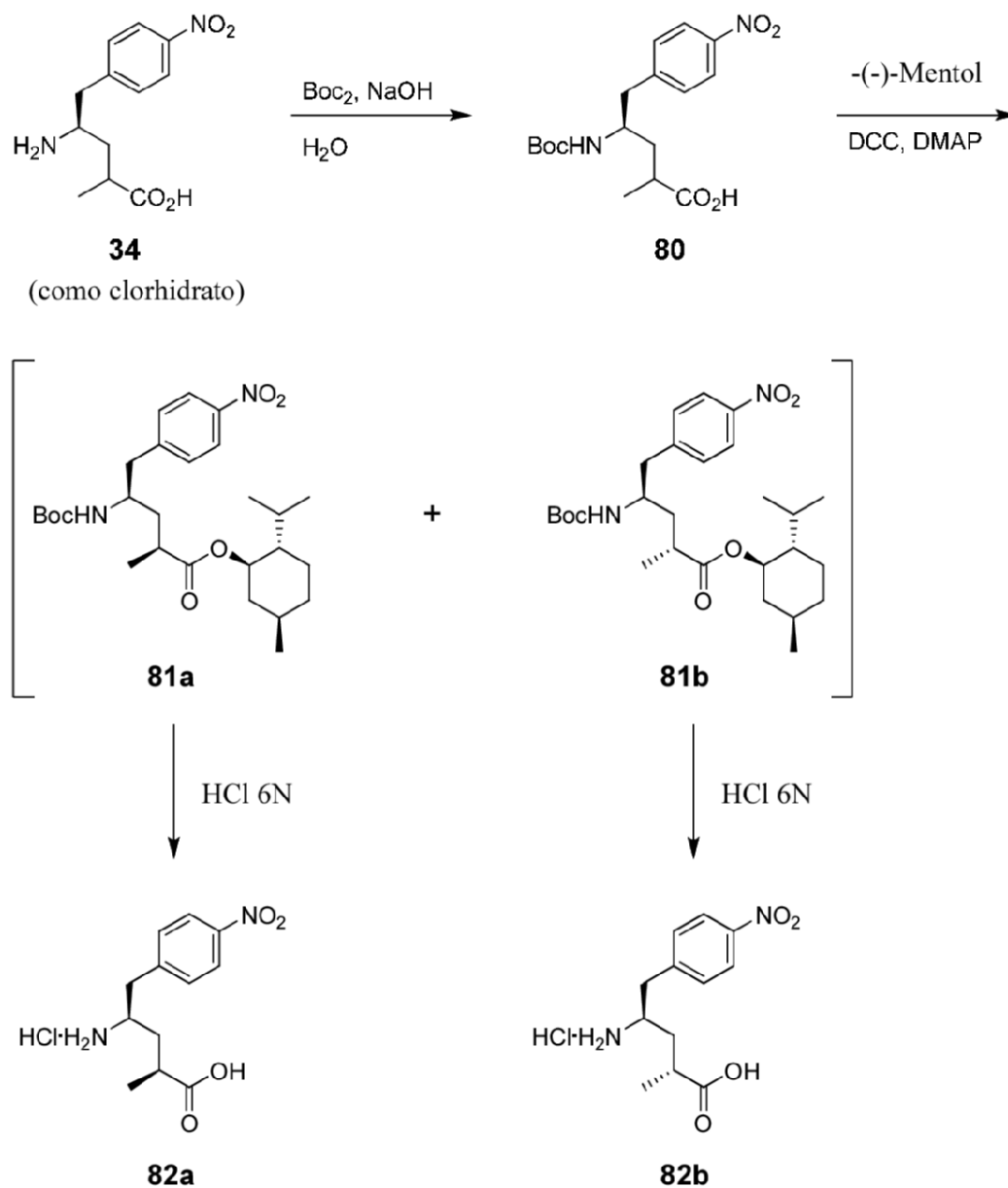
Fig. 15**Esquema 13**

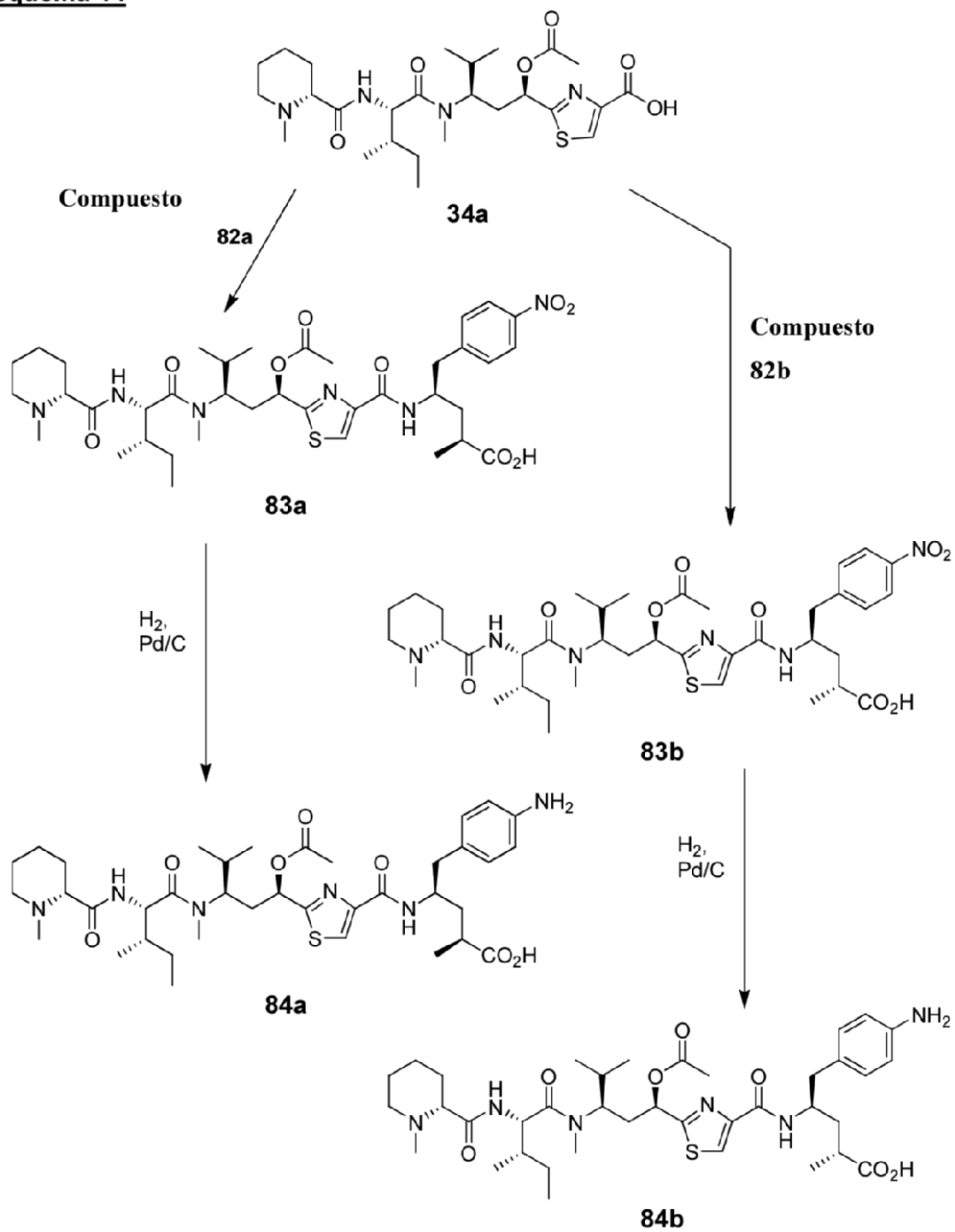
Fig. 16**Esquema 14**

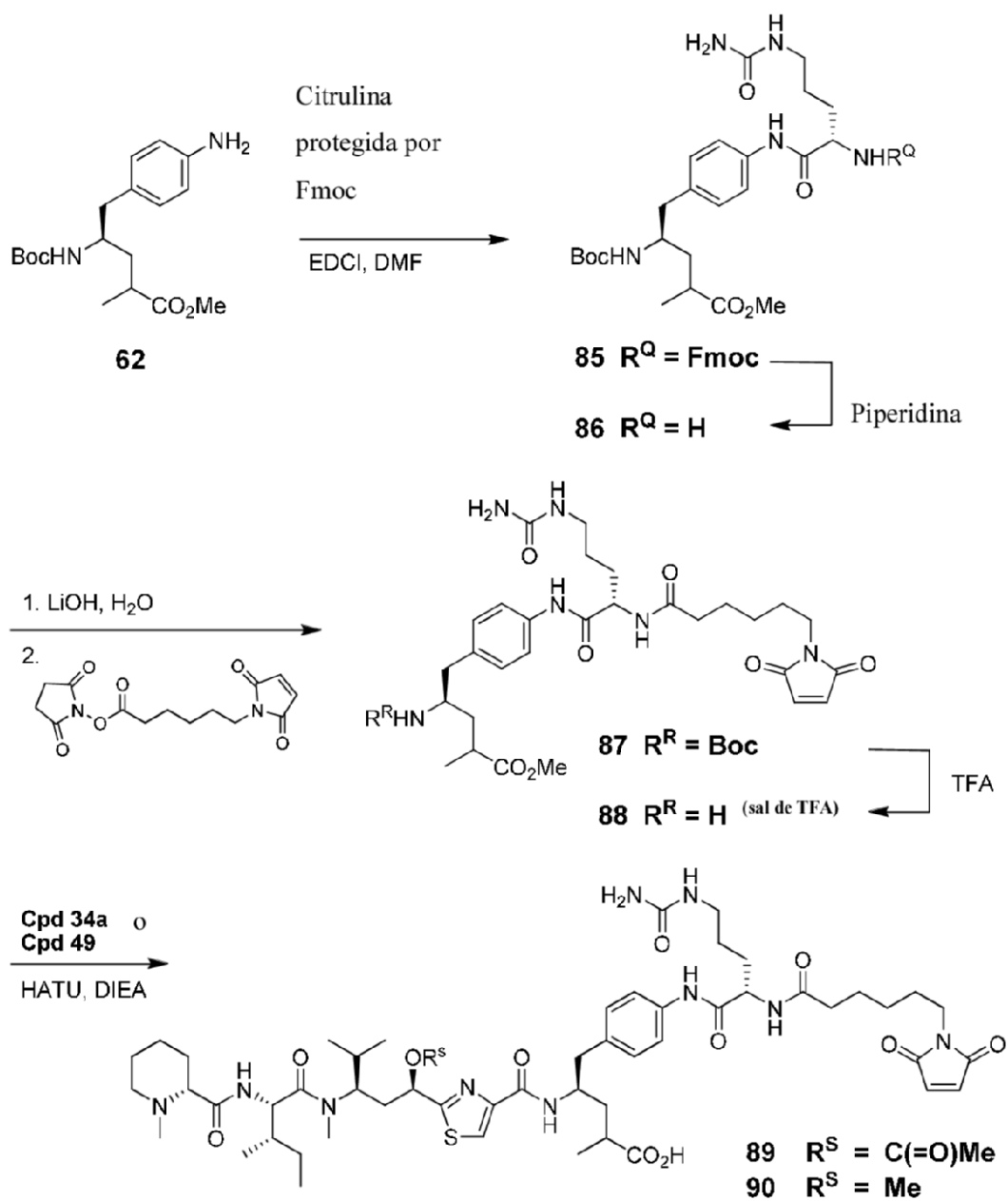
Fig. 17**Esquema 15**

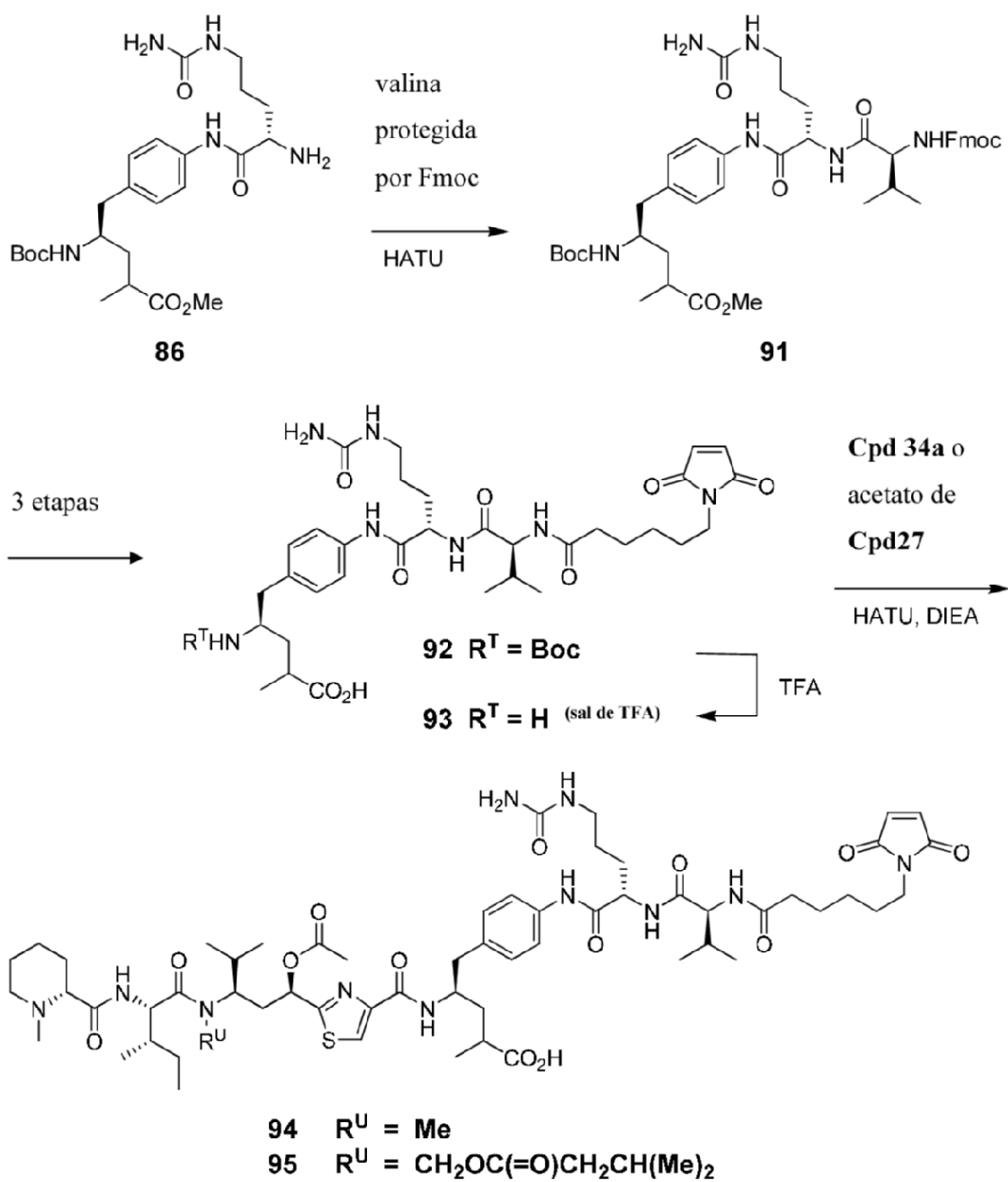
Fig. 18**Esquema 16**

Fig. 19
Esquema 17

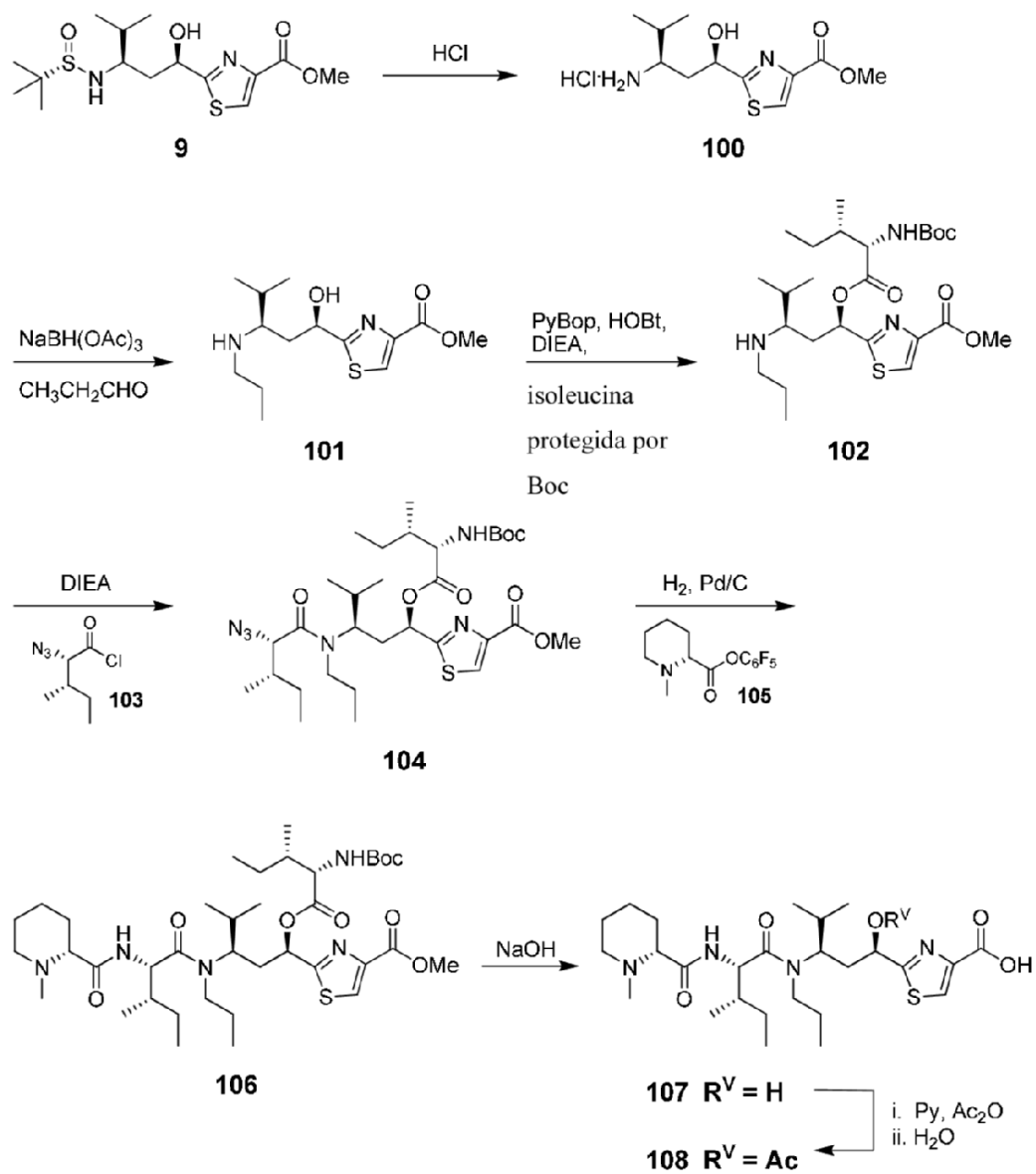


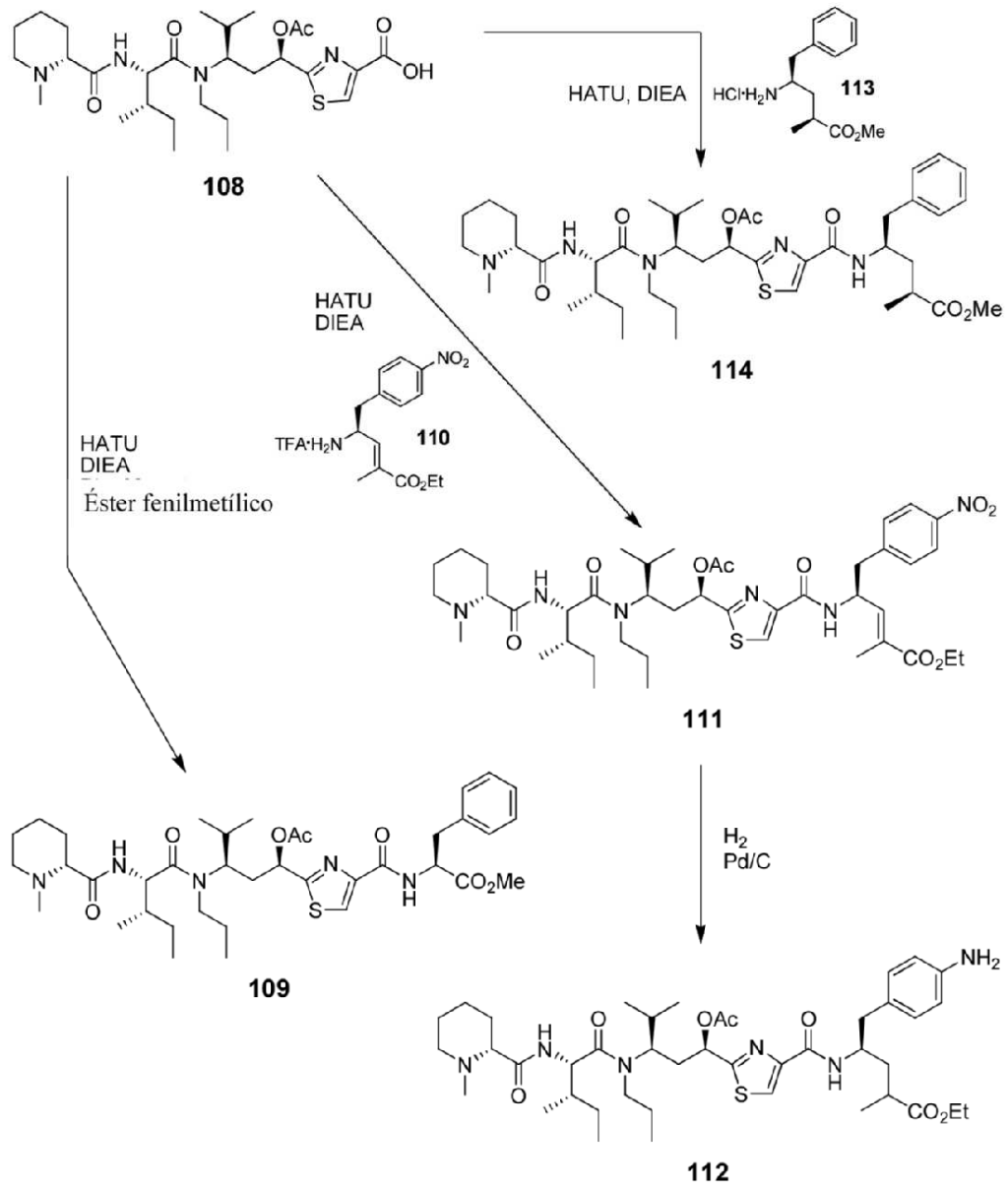
Fig. 20a**Esquema 18 (parte 1 de 2)**

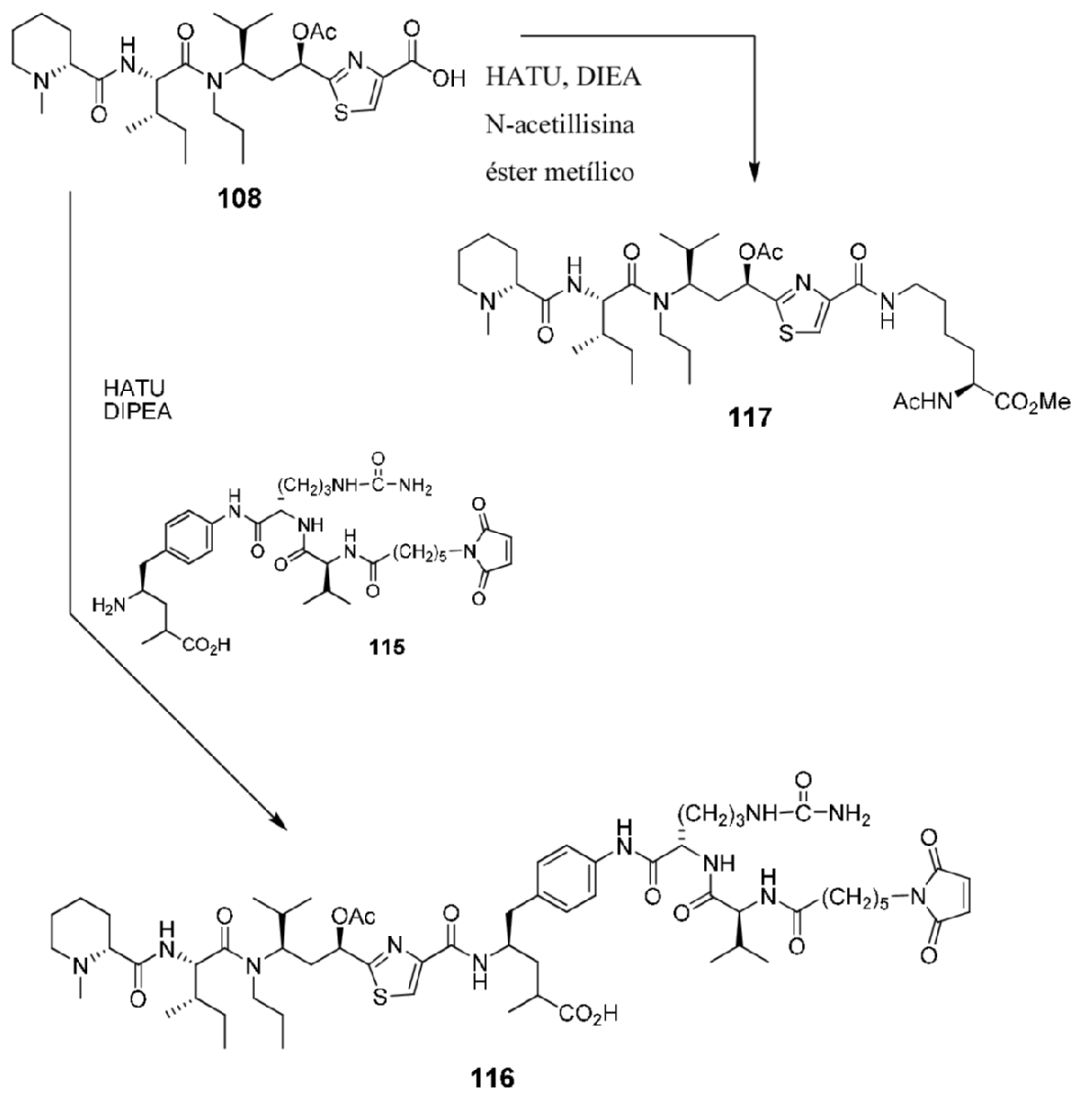
Fig. 20b**Esquema 18 (parte 2 de 2)**

Fig. 21

Esquema 19

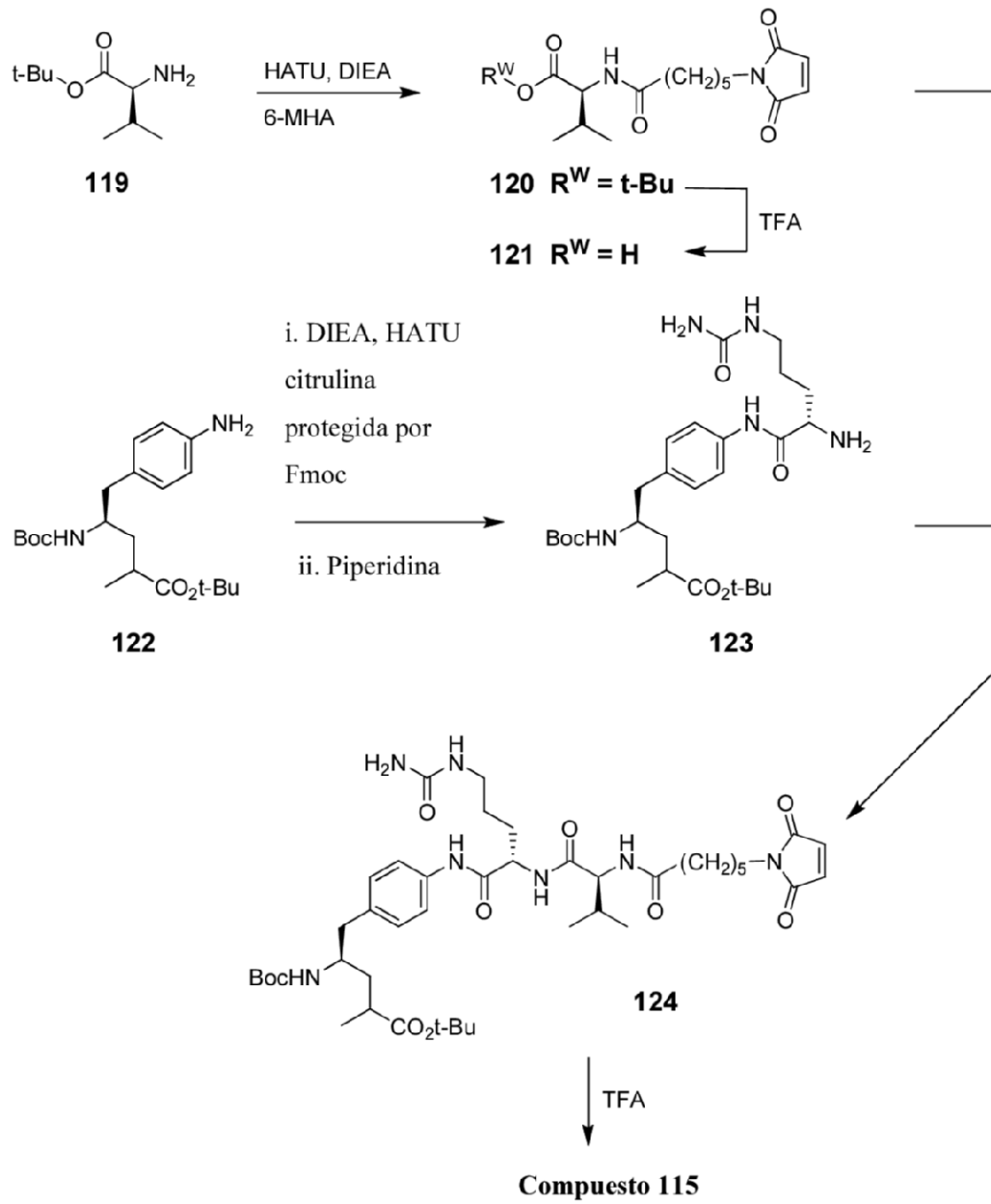


Fig. 22
Esquema 20

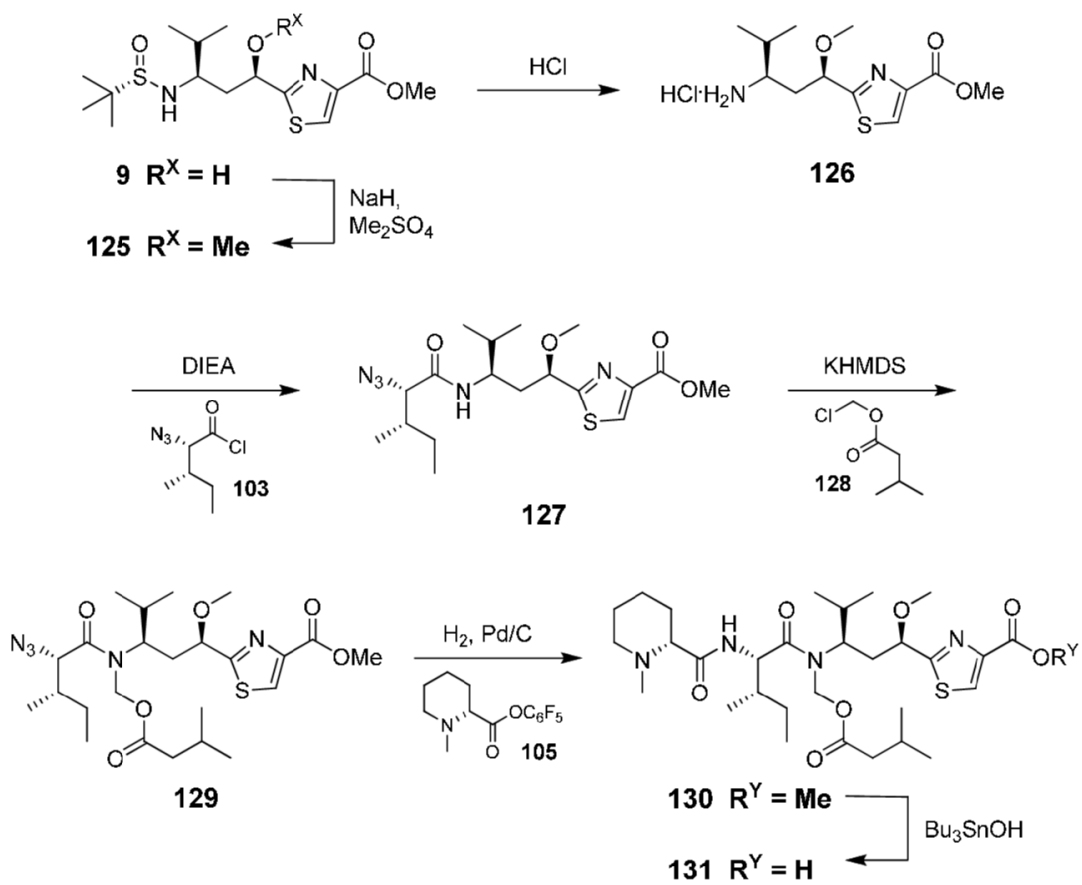


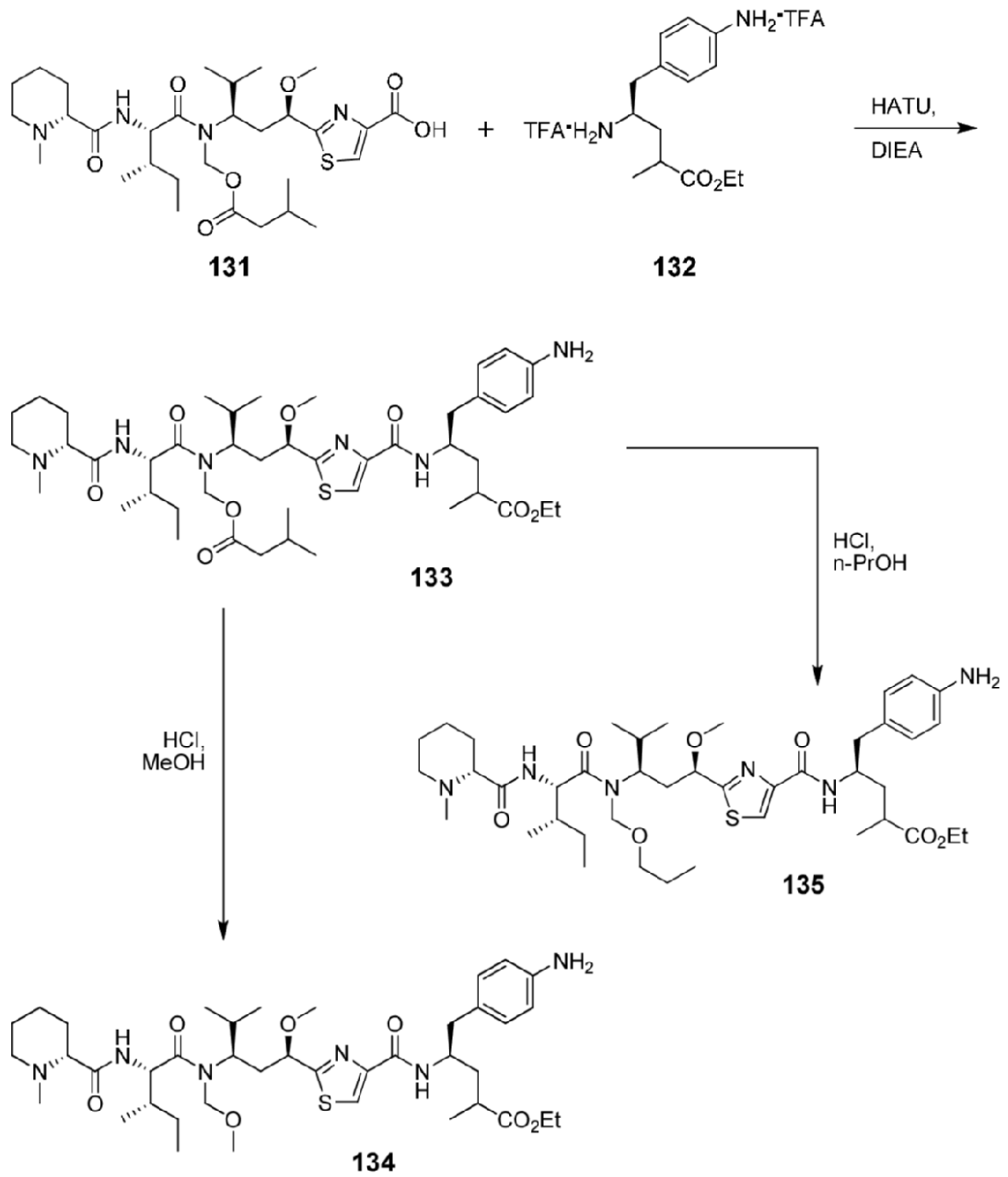
Fig. 23**Esquema 21**

Fig. 24

Esquema 22

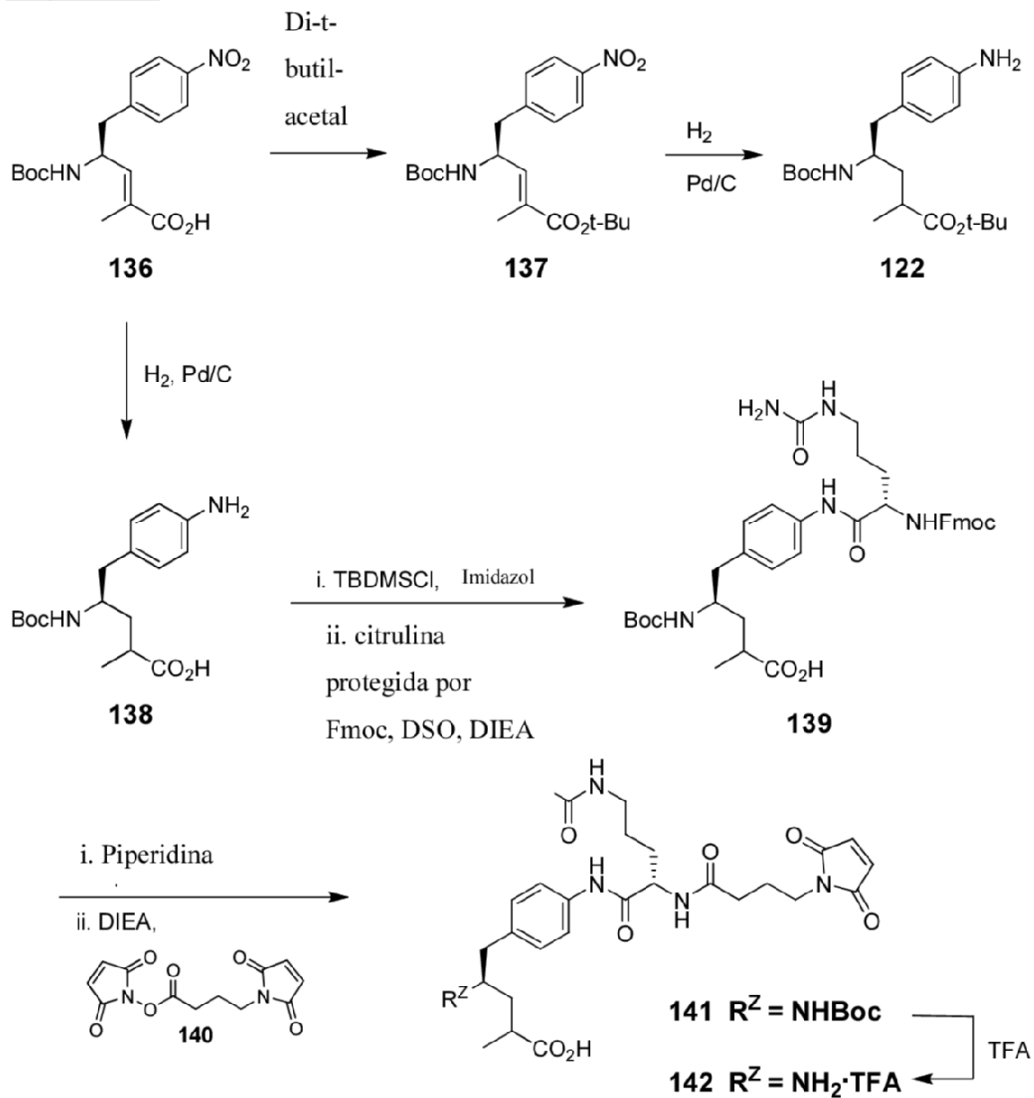


Fig. 25

Esquema 23

