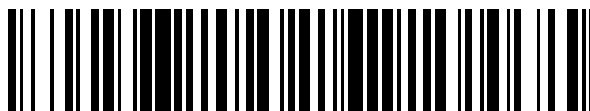


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 298**

51 Int. Cl.:

**C07D 309/10** (2006.01)

**C07D 405/12** (2006.01)

**C07D 493/20** (2006.01)

**A61K 31/35** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2013 PCT/IB2013/059553**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068443**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2013 E 13821520 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2917195**

54 Título: **Análogos de ayustoestatina**

30 Prioridad:

**05.11.2012 US 201261722769 P**

**07.11.2012 US 201261723645 P**

**31.05.2013 US 201361829409 P**

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

**26.02.2018**

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**DIRICO, KENNETH JOHN;  
EUSTAQUIO, ALESSANDRA S.;  
GREEN, MICHAEL ERIC;  
HE, HAIYIN;  
HE, MIN;  
KOEHN, FRANK ERICH;  
O'DONNELL, CHRISTOPHER JOHN;  
PUTHENVEETIL, SUJIET;  
RATNAYAKE, ANOKHA SAYANI;  
SUBRAMANYAM, CHAKRAPANI;  
TESKE, JESSE ALEXANDER y  
YANG, HUI YU**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 656 298 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

Análogos de ayustoestatina

**Campo de la invención**

5 La presente invención se dirige a novedosos compuestos derivados de productos naturales y/o basados en ayustoestatina de utilidad como cargas útiles en conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) y compuestos enlazadores de carga útil, útiles con respecto a los ADC. La presente invención se refiere además a composiciones que incluyen las cargas útiles anteriormente mencionadas, los enlazadores de carga útil, y los ADC, y a estas cargas útiles, enlazadores de carga útil y los ADC, para su uso en el tratamiento de patologías incluyendo cáncer.

**Antecedentes**

10 La conjugación de fármacos con anticuerpos, tanto directamente como mediante enlazadores, implica la consideración de una variedad de factores, incluyendo la identidad y la localización del grupo químico para la conjugación del fármaco, el mecanismo de liberación del fármaco, los elementos estructurales que proporcionan la liberación del fármaco, y la modificación estructural en el fármaco libre liberado. Además, si el fármaco se va a liberar tras la internalización del anticuerpo, el mecanismo de liberación del fármaco debe ser consonante con el tráfico intracelular del conjugado.

Aunque se han probado numerosas clases de fármacos diferentes para la administración mediante anticuerpos, solo unas pocas clases de fármacos han demostrado ser eficaces como conjugados de anticuerpo-fármaco, teniendo a la vez un perfil de toxicidad adecuado.

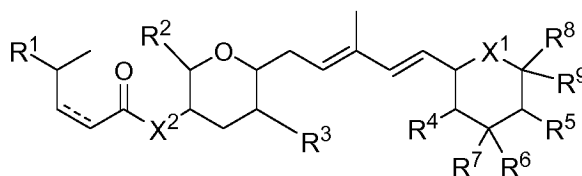
20 Se ha notificado que los productos naturales FR901463, FR901464, y FR901465 tienen potentes actividades inhibidoras frente a las líneas de células de cáncer humano y eficacias en algunos modelos de tumores xenoinjertados. (Journal of Antibiotics (1996), 49(12), 1204-1211). Se ha notificado recientemente que el producto natural FR901464 y su metil cetal, designado ayustoestatina A, inhiben el ayustosoma mediante interacción con SF3b, que es un componente del subcomplejo esencial, U2 ARNp. (Nature Chemical Biology (2007), 3(9), 576-583; Nature (Londres, Reino Unido) (2010), 468(7324), 664-668).

25 Se ha notificado la síntesis y la evaluación de algunos análogos sintéticos del producto natural FR901464 (Thompson y col., J. Am. Chem. Soc. (2001), 123, 9974-9983). En el documento WO 2011/106491 se desvelan productos naturales obtenidos, o derivados de especies de *Burkholderia*, incluyendo determinados análogos de ayustoestatina, y su uso como pesticidas. Se ha notificado una investigación de la actividad antitumoral de ayustoestatina A, un derivado metilado de FR901464, (Furumai y col., Cancer Sci. (2010), 101 (11), 2483-2489). Se ha notificado una evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de los análogos de FR901464 (Osman y col., Med Chem Comm. (2011), 2, 38-43). Se ha notificado una evaluación de los análogos de sudemicina de FR901464 (Fan y col., ASC Chem. Biol. (2011), 6, 582-589).

**Sumario de la invención**

35 La presente invención se refiere a compuestos y composiciones farmacéuticas que los contienen, a su preparación, y a usos para los compuestos, principal, pero no exclusivamente, agentes anticancerígenos.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (I):



(I)

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

40 cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

5 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

10 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

15 R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup> y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)-NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

20 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

25 en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y

30 cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

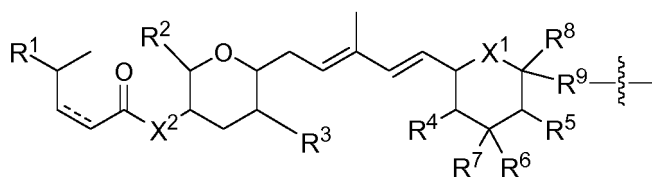
De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

35 L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P;

P es un radical de fórmula (I):



(I)

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-; cada X' es CR o N;

5 cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-; CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

10 R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

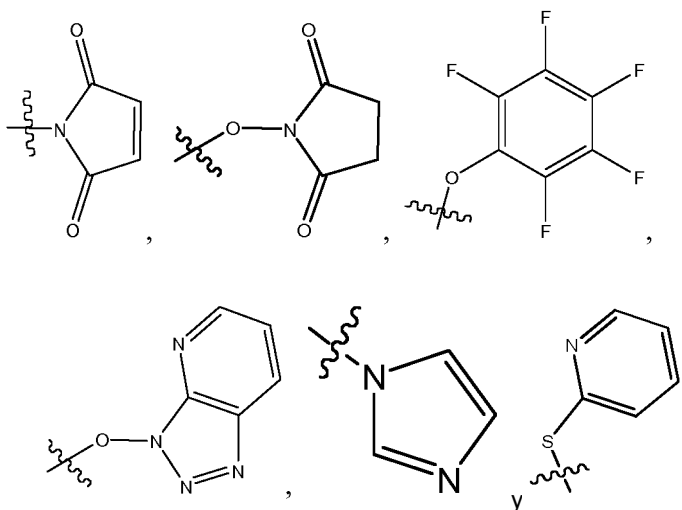
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

20 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-;

25 L<sup>1</sup> se selecciona entre: -halógeno, -NR<sub>2</sub>,



L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

30 - O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-

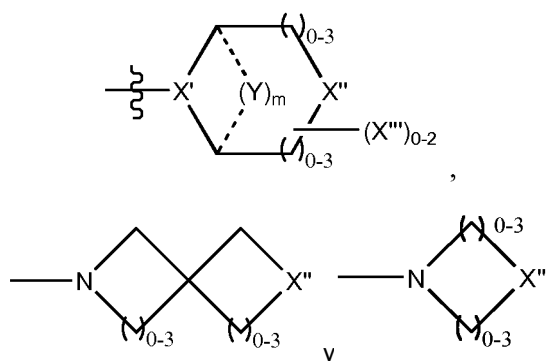
35

)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

5 L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-C(O)-,



10 o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

15 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

20 en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

25 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

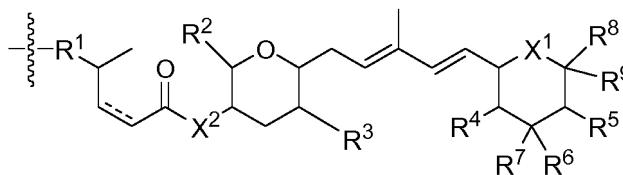
De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (II'):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

30 L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P';

P' es un radical de fórmula (I'):



(I')

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

5 cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-; cada X' es CR o N;

cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-; CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

10 Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -OR'', -OCOR<sup>13'</sup>, -OC(O)NRR<sup>14'</sup>, -OCON(R)N(R)- y -NR-

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14R15</sup> y oxo;

15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

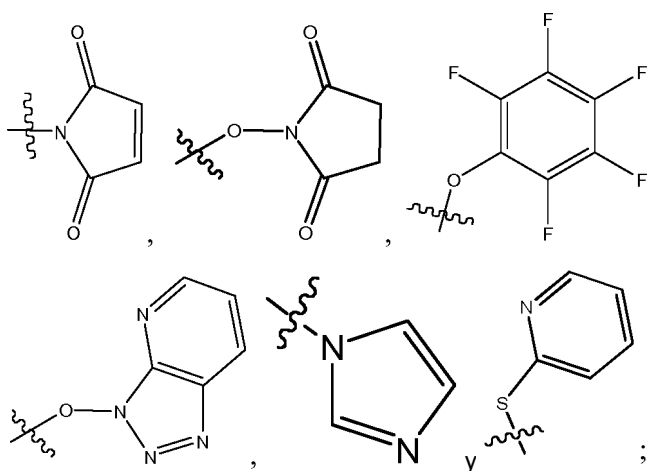
20 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

25 R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14R15</sup>, - -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: -halógeno, -NR<sub>2</sub>,



30

L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

- O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -

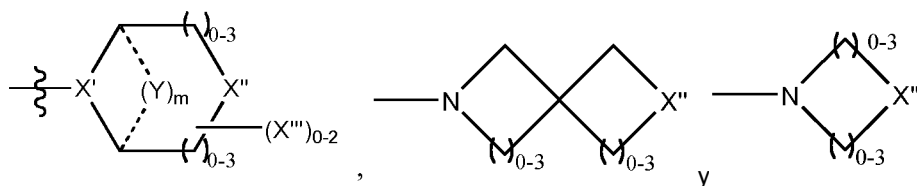
35

N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

5 L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil- C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13a</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace, -alquilen C<sub>1-6</sub>-, -carbocicliil C<sub>3-8</sub>-, -heterocicliil C<sub>3-8</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-aril C<sub>6-14</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-heteroaril C<sub>5-14</sub>-;

15 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -heterocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>-, arilo C<sub>6-14</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterocicliilo C<sub>3-10</sub>,

20 en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

30 cada R<sup>14a</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace, -NR-, -carbocicliil C<sub>3-10</sub>-, -heterocicliil C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR', -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR- y -alquilen C<sub>1-6</sub>-,

en el que R<sup>14a</sup> está opcionalmente sustituido con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

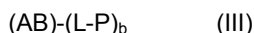
35 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>;

cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo;

cada R'' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace y -alquilen C<sub>1-6</sub>-; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

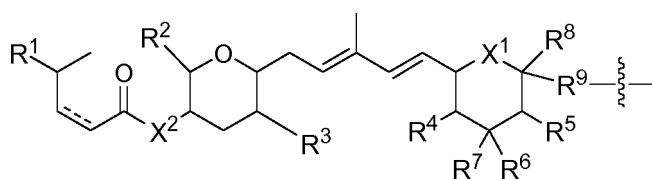
De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (III):



40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P;

P es un radical de fórmula (I):



(I)

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

AB es un anticuerpo;

5 cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X' es CR o N;

10 cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-; CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

15 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

20 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

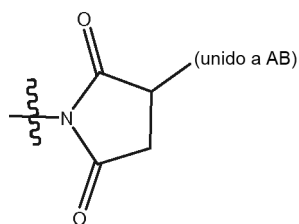
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

25 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



30

L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:



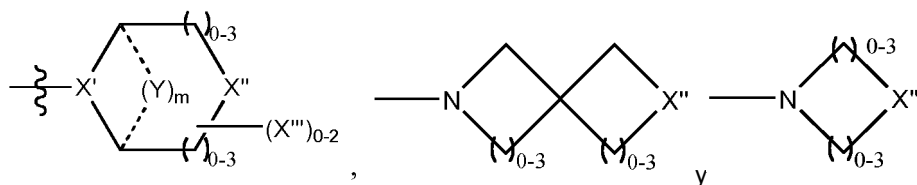
L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

- O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil- C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

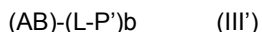
o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y b es 1-20; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

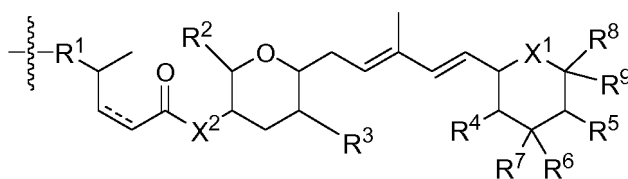
De acuerdo todavía con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (IN'):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P';

P' es un radical de fórmula (I'):



(I')

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

AB es un anticuerpo;

5 cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X' es CR o N;

10 cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-; CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -OR'', -OCOR<sup>13</sup>, -OCONRR<sup>14</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)N(R<sup>15</sup>)- y -NR<sup>14</sup>-

15 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

20 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

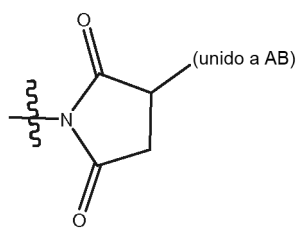
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

25 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;

30 L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

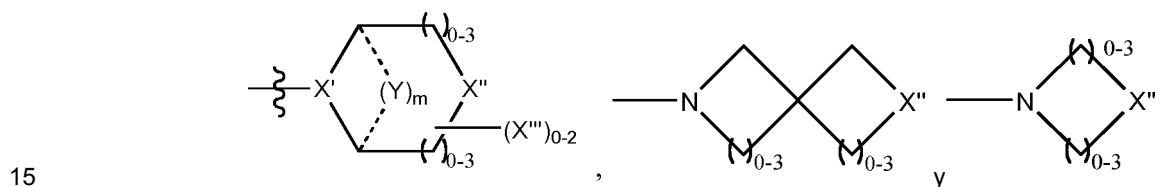
L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

- 5
- O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

10 L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil- C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13a</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace, -alquilen C<sub>1-6</sub>-, -carbociclil C<sub>3-8</sub>-, -heterociclil C<sub>3-8</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-aril C<sub>6-14</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-heteroaril C<sub>5-14</sub>;

20 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>-, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>-, arilo C<sub>6-14</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

25 o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>, en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

30 cada R<sup>14a</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace, -NR-, -carbociclil C<sub>3-10</sub>-, -heterociclil C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR', -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR- y -alquilen C<sub>1-6</sub>-,

35 en el que R<sup>14a</sup> está opcionalmente sustituido con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>;

cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo;

40 cada R'' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace y -alquilen C<sub>1-6</sub>-; y

b es 1-20; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmulas III o III' en el que el anticuerpo AB se selecciona entre: trastuzumab, mutantes de trastuzumab (por ejemplo, los mutantes de trastuzumab desvelados en el presente documento o en la solicitud de patente internacional PCT/IB2012/056234), oregovomab, edrecolomab, cetuximab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de vitronectina

( $\alpha_v\beta_3$ ), alemtuzumab, un anticuerpo humanizado dirigido contra HLA-DR para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, 1311 Lym-1, un anticuerpo murino dirigido contra HLA-Dr10 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, un mAb humanizado dirigido contra CD22 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o del linfoma no de Hodgkin, labetuzumab, bevacizumab, ibritumomab tiuxetan, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, ipilimumab, gemtuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de 5T4 y M1/70 de la proteína oncofeca (anticuerpo contra el receptor de CD11b) y otros anticuerpos.

Trastuzumab se refiere a: (INN; nombres comerciales Herclon, Herceptin) un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmulas II, II', III o III' en las que L comprende uno o más dirradicales de aminoácidos seleccionados de forma independiente, preferentemente uno o más dirradicales de aminoácidos seleccionados de forma independiente, seleccionados entre el grupo que consiste en valina, citrulina, fenilalanina, lisina, alanina y glicina.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmulas III o III' en las que L es capaz de escindirse a partir de P, o un radical que comprende P, mediante una proteasa intracelular. De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmulas III o III' en el que el anticuerpo se une a un dirradical aminoácido mediante un resto cisteína del anticuerpo mediante un azufre o enlace de azufre-azufre, un resto lisina del anticuerpo mediante un enlace amida, o un resto glutamina mediante un enlace amida. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo.

De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica de un compuesto o compuestos de fórmulas I, I', II, II', III o III', y/o una sal o sales de los mismos, que comprende una cantidad eficaz del(de los) compuesto(s) o sal(es) y un diluyente, transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas pueden incluir adicionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa, y un aglutinante del ADN.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmulas I, I', II, II', III o III', o una sal farmacéuticamente aceptable del(de los) mismo(s), para tratar el cáncer en un paciente.

Se desvela también un procedimiento para destruir o inhibir la proliferación de células tumorales o células cancerosas que comprende tratar células tumorales o células cancerosas en un paciente con una cantidad del compuesto de las fórmulas I, I', II, II', III o III', y/o una sal o sales de los mismos, siendo dicha cantidad eficaz para destruir o inhibir la proliferación de células tumorales o células cancerosas.

Se desvela también un procedimiento para utilizar una cantidad eficaz de uno cualquiera de los compuestos anteriormente mencionados y/o uno cualquiera de los conjugados de anticuerpo-fármaco anteriormente mencionados para tratar el cáncer administrando a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de dicho compuesto y/o conjugado.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Fig.1 es una representación esquemática de la relación filogenética determinada con las secuencias de ARNr de 16S casi completas de FERM BP-3421 con otra *Burkholderia* spp.

La Fig. 2 es un clúster de genes biosintéticos de las ayustoestatinas y la ruta biosintética propuesta resaltando las etapas de hidroxilación catalizadas por el citocromo P450 Fr9R y la dioxigenasa Fr9P dependiente de Fe(II)/ $\alpha$ -cetogluturato.

La Fig.3 es una gráfica que muestra los datos de xenoinjertos para los ADC 3, 4 y 5.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra los datos de xenoinjertos para los ADC 14 y 18.

### **Descripción detallada**

La presente invención se dirige a productos citotóxicos naturales que incluyen análogos de ayustoestatina citotóxicos, a conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden dichos productos citotóxicos naturales que incluyen análogos de ayustoestatina citotóxicos, y a procedimientos para utilizar los mismos para tratar el cáncer y otras patologías. La invención se refiere también a procedimientos para utilizar dichos compuestos y/o conjugados *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* para la detección, diagnóstico, o tratamiento de células de mamíferos, o las patologías asociadas.

### **Definiciones y abreviaturas**

Salvo que se indique otra cosa, se pretende que los siguientes términos y expresiones que se usan en el presente documento tengan los siguientes significados. Cuando se usan nombres comerciales en el presente documento, los

nombres comerciales incluyen la formulación del producto, el fármaco genérico, y el(los) principio(s) farmacéutico(s) activo(s) del producto del nombre comercial, salvo que el contexto indique otra cosa.

El término "anticuerpo" (o "Ab" o "AB") se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y abarca específicamente los anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada. Un anticuerpo intacto tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable se une e interactúa con un antígeno diana. La región variable incluye una región determinante de la complementariedad (CDR) que reconoce y se une a un sitio de unión específico de un antígeno concreto. La región constante puede reconocerse e interactuar con el sistema inmunitario (véase, por ejemplo, Janeway y col., 2001, *Immuno. Biology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo o clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). El anticuerpo puede derivarse de cualquier especie adecuada. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de origen humano o murino. Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, humano, humanizado o quimérico.

Las expresiones "se une específicamente" y "unión específica" se refieren a la unión de un anticuerpo con un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades poco importantes. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que requiere la producción del anticuerpo mediante algún procedimiento concreto.

El término "anticuerpos monoclonales" incluye específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Un "anticuerpo intacto" es aquel que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (C<sub>L</sub>) y dominios constantes de la cadena pesada, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> y C<sub>H4</sub>, según sea adecuado para la clase de anticuerpo. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencias negativas (por ejemplo, dominios constantes de secuencias naturales humanas) o variantes de secuencias de aminoácidos de los mismos.

Un anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", lo que se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia natural o una región Fc de la secuencia variante de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la citotoxicidad dependiente del complemento, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la unión al antígeno o a su región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, scFv, scFv-Fc, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpos, un(os) fragmento(s) producido(s) mediante una biblioteca de expresión de Fab, o fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno-específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de célula cancerosa, un antígeno vírico o un antígeno microbiano).

El término "variable", en el contexto de un anticuerpo, se refiere a determinadas porciones de los dominios variables del anticuerpo que difieren extensamente en la secuencia y que se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto por su antígeno particular. Esta variabilidad se concentra en tres segmentos denominados "regiones hipervariables" de los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las porciones más fuertemente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprende cuatro FR conectadas por tres regiones hipervariables.

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente los restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-

34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (L3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los restos de una "región hipervariable" (por ejemplo, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917). Los restos FR son aquellos restos del dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable tal como se definen en el presente documento.

Un fragmento de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprende los dominios V.sub.H y V.sub.L de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Normalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V.sub.H y V.sub.L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término "diacuerpo" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_h$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_l$ ) en la misma cadena polipeptídica. Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 0 404 097; el documento WO 93/11161; y Hollinger y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima parte de la secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en donde los restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o un primate no humano que tienen la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Por otro lado, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera opcional al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones y col., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann y col., 1988, Nature 332:323-329; y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596.

Como se usa en el presente documento, "aislado" significa separado de otros componentes de (a) una fuente natural, tales como una célula vegetal o animal o un cultivo de células, o (b) una mezcla de reacción química orgánica sintética. Como se usa en el presente documento, "purificado" significa que cuando se aísla, el aislado contiene al menos un 95 %, y en otro aspecto al menos un 98 %, de un compuesto (por ejemplo, un conjugado) en peso del aislado.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante el procedimiento de Lowry, y lo más preferido, más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia del extremo N o la secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción o sin reducción utilizando tinción con azul de Coomassie, o preferentemente, con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo que "induce la apoptosis" es aquel que induce la muerte celular programada como se determina mediante la unión de la anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción celular, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular, y/o la formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. Están disponibles diversos procedimientos para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la translocación de la fosfatidil serina (PS) mediante la unión a la anexina; se puede evaluar la fragmentación del ADN a través de la escalera de ADN; y se puede evaluar la condensación de la cromatina nuclear junto con la fragmentación del ADN mediante cualquier aumento en células hipodiploides.

- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede inhibir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento contra el cáncer, puede medirse la eficacia, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).
- La expresión "cantidad sustancial" se refiere a una mayoría, es decir, más del 50 % de una población, de una mezcla o una muestra.
- La expresión "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto resultante de un proceso o reacción metabólica en el interior de una célula sobre un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). El proceso o reacción metabólica puede ser un proceso enzimático tal como una escisión proteolítica de un enlazador peptídico del ADC. Los metabolitos intracelulares incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos y fármacos libres que han experimentado escisión intracelular después de la entrada, difusión, captación o transporte al interior de una célula.
- Las frases "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso o reacción metabólica en el interior de una célula sobre un ADC o similar, por lo cual el enlace covalente, por ejemplo, el enlazador, entre el resto de fármaco y el anticuerpo se rompe, dando como resultado el fármaco libre, u otro metabolito del conjugado disociado a partir del anticuerpo en el interior de la célula. Los restos escindidos del ADC son, por tanto, metabolitos intracelulares.
- El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, los niveles en sangre/plasma) de una cantidad dada de un fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición del tiempo (velocidad) y la cantidad total (extensión) del fármaco que alcanza la circulación general a partir de una forma farmacéutica administrada.
- La expresión "actividad citotóxica" se refiere a la destrucción de células, un efecto citostático o un efecto antiproliferativo de un ADC o un metabolito intracelular de dicho ADC. La actividad citotóxica puede expresarse como el valor de la  $CI_{50}$ , que es la concentración (molar o másica) por unidad de volumen a la cual la mitad de las células sobrevive.
- Un "trastorno" es cualquier dolencia que se beneficiaría del tratamiento con un fármaco o un conjugado de anticuerpo-fármaco. Esto incluye los trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas patologías que predisponen a un mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar en el presente documento incluyen cánceres benignos y malignos; leucemia y neoplasias malignas linfoides, neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicas y otros trastornos glandulares, macrofagales, epiteliales, estromales y blastocélicos; y los trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.
- Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la dolencia o trastorno fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas.
- Los ejemplos de un "paciente" incluyen, aunque no de forma limitativa, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, pájaros y aves. En una realización ilustrativa, el paciente es un ser humano.
- Los términos "tratar" o "tratamiento", salvo que el contexto indique otra cosa, se refieren a un tratamiento terapéutico y a las medidas profilácticas para evitar la recidiva, en el que el objeto es inhibir o ralentizar (atenuar) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, tal como el desarrollo o la diseminación del cáncer. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque no de forma limitativa, alivio de síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, una patología estabilizada (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización en la evolución de la enfermedad, mejora o paliación de la patología, y remisión (tanto parcial como total), tanto de forma detectable como indetectable. "Tratamiento" puede significar también prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que tienen ya la dolencia o el trastorno así como aquellos propensos a tener la dolencia o el trastorno.
- En el contexto del cáncer, el término "tratar" incluye cualquiera o todo de inhibir el crecimiento de las células tumorales, células cancerosas, o de un tumor; inhibir la replicación de las células tumorales o las células cancerosas, disminuir la carga tumoral total o disminuir el número de células cancerosas, y mejorar uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad.
- En el contexto de una enfermedad autoinmunitaria, el término "tratar" incluye cualquiera o todo de inhibir la replicación de las células asociadas con una patología autoinmunitaria incluyendo, aunque no de forma limitativa, las células que producen un anticuerpo autoinmunitario, disminuir la carga del anticuerpo autoinmunitario y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmunitaria.

En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de: inhibir el crecimiento, la multiplicación o la replicación del patógeno que produce la enfermedad infecciosa y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa.

5 El término "prospecto en el envase" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contiene información acerca de la indicación(ones), utilización, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "célula," "línea de células", y "cultivo celular" pueden usarse de forma indistinta y todas estas denominaciones incluyen la descendencia. Las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos o descendencia derivados de las anteriores sin considerar el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia no tiene por qué ser precisamente idéntica en cuanto a contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la seleccionada para la célula originalmente transformada. Cuando se propongan designaciones distintas, se desprenderá claramente del contexto.

15 A menos que se indique lo contrario, el término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro término se refiere a un hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada que tiene el número indicado de átomos de carbono (por ejemplo, alquilo "C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono). Cuando no se indica el número de átomos de carbono, el grupo alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono. Los alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> de cadena lineal representativos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y n-octilo; mientras que los alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> ramificados incluyen, pero sin limitación, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo y -2-metilbutilo; los alquilos C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> insaturados incluyen, pero sin limitación, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, acetilenilo, propinilo, 1-butenilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo y 3-metil-1-butenilo.

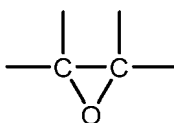
25 A menos que se indique lo contrario, "alquileno", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un radical hidrocarburo de cadena ramificada o lineal o cíclico del número indicada de átomos de carbono, típicamente de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes obtenidos por la retirada de dos átomos de hidrógeno de los mismos o de dos átomos de carbono diferentes de un alcano precursor. Los radicales alquileno típicos incluyen, pero sin limitación: metileno (-CH<sub>2</sub>-), 1,2-etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-propileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-butileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) y similares. Un alquileno de cadena lineal "C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>" es un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal de la fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-. Ejemplos de un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno. En determinadas realizaciones de la invención, los alquilenos tienen de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7 y de 1 a 6 carbonos.

35 A menos que se indique lo contrario, el término "heteroalquilo," por sí mismo o junto con otro término, significa, a menos que se indique otra cosa, un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada estable, o combinaciones de los mismos, totalmente saturados o que contienen de 1 a 3 grados de insaturación, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, N, Si, S y/o P, y en el que los átomos de nitrógeno y azufre puede oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede cuaternizarse opcionalmente. El (los) heteroátomo (s) de O, N y S pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. El heteroátomo de Si puede colocarse en cualquier posición del grupo heteroalquilo, que incluye la posición en la que el grupo alquilo se une al resto de la molécula. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos.

"Halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

"Halo(alquilo C<sub>1-6</sub>)" se refiere a grupos alquilo C<sub>1-6</sub> sustituidos con 1 a 3 o 1 a 2 grupos halo, en los que alquilo C<sub>1-6</sub> y halo son como se definen en el presente documento. El término incluye, por ejemplo, CF<sub>3</sub>.

45 El término "epoxi" o "grupo epoxi" o "residuo epoxi" se conoce por los expertos en la materia para referirse a un ribete de tres miembros que comprende átomos de carbono y un átomo de oxígeno unido por enlaces simples de la siguiente manera:



50 Por consiguiente, el término "epóxido" se refiere a un compuesto que comprende al menos un grupo epoxi como se ha definido anteriormente en el presente documento.

A menos que se indique lo contrario, el término "heteroalquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un grupo divalente obtenido a partir de heteroalquilo (como se ha abordado anteriormente). Para grupos heteroalquileno, los heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos extremos de la cadena.



A menos que se indique lo contrario, "arilo", por sí mismo o como parte de otro término, significa un radical hidrocarburo aromático, monovalente sustituido o sin sustituir de 6 a 20 átomos de carbono, preferentemente de 6 a 14 átomos de carbono, obtenidos por la retirada de un átomo de hidrógeno a partir de un átomo de carbono sencillo de un sistema de anillo aromático precursor. Los grupos arilo típicos incluyen, pero sin limitación, radicales obtenidos a partir de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares. Un grupo aromático sustituido (por ejemplo, un grupo arilo) puede sustituirse con uno o más, preferentemente 1 a 5, de los siguientes grupos: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en el que cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo, preferentemente arilo sin sustituir. En algunas realizaciones, un grupo aromático sustituido, puede incluir además uno o más de: -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -NHCONH<sub>2</sub>, -S(=O)<sub>2</sub>R' y -SR'.

El término "heteroarilo", como se usa en el presente documento se refiere a un anillo heterociclo aromático de 5 a 14 miembros, tal como de 5 a 6 miembros, que tiene al menos un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contiene al menos 1 átomo de carbono. Los heteroarilos pueden ser sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos. Los heteroarilos representativos son triazolilo, tetrazolilo, oxadiazolilo, piridilo, furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, quinolinilo, pirrolilo, indolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, imidazolilo, benzimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinnolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, pirimidilo, azepinilo, oxepinilo y quinoxalinilo. Los heteroarilos están opcionalmente sustituidos. Los sustituyentes típicos incluyen, pero sin limitación, -X, -R, -O-, -OR, -SR, -S-, -NR<sub>2</sub>, -NR<sub>3</sub>, =NR, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NRC(=O)R, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -AsO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=S)NR<sub>2</sub>, -C(=NR)NR<sub>2</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, un grupo protector o un resto profármaco, en el que cada X es independientemente un halógeno: -F, -Cl, -Br o -I; y cada R es independientemente -H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

Los términos "arileno", "heteroarileno" se refieren a versiones divalentes de "arilo" y "heteroarilo" respectivamente, y otros términos que incorporan "arilo" y "heteroarilo". "Hidroxi" se refiere al grupo -OH.

"Alquilo sustituido" significa un alquilo en el que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan independientemente con un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, pero sin limitación, -X, -R, -O-, -OR, -SR, -S-, -NR<sub>2</sub>, -NR<sub>3</sub>, =NR, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NRC(=O)R, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -AsO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=S)NR<sub>2</sub>, -C(=NR)NR<sub>2</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, un grupo protector o un resto profármaco, en el que cada X es independientemente un halógeno: -F, -Cl, -Br o -I; y cada R es independientemente -H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Un alquilo sustituido con un halógeno, a veces se denomina en el presente documento como un haloalquilo. Arilo, alquileno, heteroalquileno y otros grupos que contienen o no contienen un resto alquilo o alquileno como se describe en el presente documento también se puede sustituir de manera similar.

A menos que se indique lo contrario, "aralquilo" por sí mismo o como parte de otro término, significa un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, sustituido con un grupo arilo, tal como se define anteriormente.

A menos que se indique lo contrario, "heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un sistema de anillo monocíclico o bicíclico aromático o no aromático sustituido o sin sustituir, monovalente o bivalente que tiene de 3 a 8 átomos de carbono (también denominados miembros de anillo) y de uno a cuatro miembros de anillo del heteroátomo seleccionados independientemente de N, O, P o S, y obtenidos por la retirada de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un sistema de anillo precursor. De manera análoga, salvo que se indique de otra forma, "heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>" por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un sistema de anillo monocíclico o bicíclico aromático o no aromático sustituido o sin sustituir, monovalente o bivalente que tiene de 3 a 10 átomos de carbono (también denominados miembros de anillo) y de uno a cuatro miembros de anillo del heteroátomo seleccionados independientemente de N, O, P o S, y obtenidos por la retirada de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un sistema de anillo precursor. Pueden oxidarse uno o más átomos de N, C o S en el heterociclilo. El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. Los grupos heterociclilo con más de 10 carbonos, por ejemplo anillos o sistemas de anillos con 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 carbonos, también son posibles y están abarcados, junto con heterociclilos C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, cuando el término "heterociclilo" se emplea sin referencia a un número específico de carbonos. De manera análoga, grupos heterociclilo con menos de 3 carbonos, por ejemplo anillos con 1 o 2, son posibles y están abarcados cuando el término "heterociclilo" se emplea sin referencia a un número específico de carbonos. El término "heterocicloalquilo" se refiere a anillos de heterociclilo no aromáticos o sistemas de anillos en los que todos los átomos de carbono están saturados (es decir, unidos a un hidrógeno u otro sustituyente como se indica a continuación, sin dobles o triples enlaces). En ciertas realizaciones los grupos heterocicloalquilo tienen típicamente de 3 a 5 miembros y de 1 a 2 heteroátomos. En ciertas realizaciones heterocicloalquilo puede ser epoxi.

A menos que se indique otra cosa, el heterociclilo está unido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable. Los ejemplos representativos de un heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> incluyen, pero sin limitación, tetrahidrofuranilo, oxetanilo, piranilo, pirrolidinilo, piperidinilo, benzofuranilo,

benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, pirrolilo, tiofenilo (tiopeno), furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> o un heterociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, puede sustituirse con hasta siete grupos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -OR', arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(=O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en el que cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo. En algunas realizaciones, un heterociclilo sustituido también puede incluir uno o más de: -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -NHCONH<sub>2</sub>, -S(=O)<sub>2</sub>R' y -SR'.

A menos que se indique lo contrario, "heteroalquilo" por sí mismo o como parte de otro término, significa un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, sustituido con un grupo heterociclilo aromático, tal como se define anteriormente.

A menos que se indique lo contrario, "carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" por sí mismo o como parte de otro término, es un anillo carbocíclico monocíclico o bicíclico, no aromático, saturado o insaturado, sustituido o sin sustituir, monovalente o divalente, de 3, 4, 5, 6, 7, 8 miembros, obtenido por la retirada de un átomo de hidrógeno o dos átomos de hidrógeno de un átomo del anillo de un sistema de anillo precursor. De manera análoga, salvo que se indique de otra forma, "carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>" por sí mismo o como parte de otro término, es un anillo carbocíclico monocíclico o bicíclico, no aromático, saturado o insaturado, sustituido o sin sustituir, monovalente o divalente, de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 miembros, obtenido por la retirada de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un sistema de anillo precursor. Los carbociclilos C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> representativos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentadienilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 1,3-ciclohexadienilo, 1,4-ciclohexadienilo, cicloheptilo, 1,3-cicloheptadienilo, 1,3,5-cicloheptatrienilo, ciclooctilo, ciclooctadienilo, biciclo(111)pentano y biciclo(222)octano. Un grupo carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> o un grupo carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, puede estar sin sustituir o sustituido con hasta siete grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -OR', arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(=O)<sub>2</sub>R', -S(=O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en el que cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo. Los grupos carbociclilo con más de 10 carbonos, por ejemplo sistemas de anillo con 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 carbonos, también son posibles y están abarcados, junto con carbociclilos C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, cuando el término "carbociclilo" se emplea sin referencia a un número específico de carbonos. El término "cicloalquilo" se refiere a anillos carbociclilo o sistemas de anillos en los que todos los átomos de carbono están saturados (es decir, unidos a un hidrógeno u otro sustituyente como se indica a continuación, sin dobles o triples enlaces).

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no ser superponibles en la pareja de la imagen especular, mientras el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles en la pareja de la imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen idéntica constitución química, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse en procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento generalmente se basan en S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, McGraw-Hill Book Company, Nueva York (1984); y Eliel and Wilen, Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994). Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para denotar la configuración absoluta de la molécula sobre su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, con (-) o l que significa que el compuesto es levógiro. Un compuesto prefijado con (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que son imágenes especulares el uno del otro. Un estereoisómero específico también puede denominarse enantiómero, y una mezcla de tales isómeros a menudo se denomina mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se conoce como una mezcla racémica o un racemato, que puede ocurrir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o procedimiento químico. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

Un "derivado" de aminoácido incluye un aminoácido que tiene sustituciones o modificaciones por unión covalente de un aminoácido original, tal como, por ejemplo, por alquilación, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Se incluye además, dentro de definición de "derivado", por ejemplo, uno o más análogos de un aminoácido con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Un "aminoácido natural" se refiere a arginina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptófano, lisina, glicina, alanina, histidina, serina, prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, treonina, cisteína, metionina, leucina, asparagina, isoleucina y valina, a menos que se indique otra cosa mediante el contexto.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto. El compuesto típicamente contiene al menos un grupo amino, y, en consecuencia, las sales de adición de ácido se pueden formar con este grupo amino. Las sales ejemplares incluyen, pero sin limitación, sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraion. El contraion puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto original. Por otro lado, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. De este modo, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Las expresiones "carga" o "carga de fármaco" o "carga útil" representan o se refieren al número promedio de cargas útiles ("carga útil" y "cargas útiles" se utilizan de manera indistinta en el presente documento con "fármaco" y "fármacos") por anticuerpo en una molécula de ADC. La carga de fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos por anticuerpo. Esto se denomina algunas veces DAR o relación de fármaco a anticuerpo. Las composiciones de los ADC descritas en el presente documento tienen normalmente valores DAR comprendidos entre 1-20 y, en determinadas realizaciones, entre 1-8, entre 2-8, entre 2-6, entre 2-5 y entre 2-4. Los valores DAR típicos son 2, 4, 6 y 8. El número promedio de fármacos por anticuerpo, o el valor DAR, puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopía UV/visible, espectrometría de masas, ensayo ELISA, y HPLC. Se puede determinar también el valor DAR cuantitativo. En algunos casos, se puede conseguir la separación, purificación, y caracterización de los ADC homogéneos que tienen un valor DAR concreto por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis. El valor DAR puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un enlace cisteína tiol, un anticuerpo puede tener solo uno o algunos grupos cisteína tiol, o puede tener solo uno o algunos grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir una unidad enlazadora. En algunas realizaciones, la cisteína tiol es un grupo tiol de un resto cisteína que forma un enlace disulfuro intercadena. En algunas realizaciones, la cisteína tiol es un grupo tiol de un resto cisteína que no forma un enlace disulfuro intercadena. Normalmente, se conjugan menos que el máximo teórico de restos de fármaco con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos lisina que no reaccionan con un enlazador o un intermedio enlazador. Solo los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador reactivo.

Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, en caso de haberlos, grupos cisteína tiol libres y reactivos que pueden unirse a un fármaco mediante un enlazador. La mayoría de restos cisteína tiol en los anticuerpos existe como puentes disulfuro y debe reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitól (DTT). El anticuerpo puede someterse a condiciones de desnaturalización para desvelar los grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína. La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, incluyendo: (i) limitar el exceso molar de fármaco-enlazador con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo de la reacción de conjugación o la temperatura, y (iii) las condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación de la cisteína tiol. Cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un fármaco-enlazador, a continuación, el producto resultante es una mezcla de ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco por anticuerpo. Puede calcularse el número promedio de fármacos por anticuerpo a partir de la mezcla mediante, por ejemplo, un doble ensayo de anticuerpos ELISA, específico del anticuerpo y específico del fármaco. Los ADC individuales pueden identificarse en la mezcla mediante espectroscopía de masas, y separarse mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba.

A continuación se presenta una lista de abreviaturas y definiciones que sin embargo no se definen o describen en esta solicitud: DMSO (se refiere a dimetilsulfóxido), EMAR (se refiere espectrometría de masas de alta resolución), DAD (se refiere a detección de matriz de diodos), TFA (se refiere a ácido 2,2,2-trifluoroacético o ácido trifluoroacético), TFF (se refiere a filtración en flujo tangencial), EtOH (se refiere a etanol), PM (se refiere a peso molecular), HPLC (se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento), HPLC prep (se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa), etc. (se refiere a, y así sucesivamente), tritilo (se refiere a 1,1',1"-etano-1,1,1-tritilbenceno), THF (se refiere a tetrahidrofurano), NHS (se refiere a 1-hidroxi-2,5-pirrolidinadiona), Cbz (se refiere a carboxibencilo), eq. (se refiere a equivalente), n-BuLi (se refiere a n-butilitio), OAc (se refiere a acetato), MeOH (se refiere a metanol), i-Pr (se refiere a isopropilo o propan-2-ilo), NMM (se refiere a 4-metilmorfolina), y "-" (en una tabla se refiere a datos no disponibles en este momento).

Como se usa en el presente documento, "H/C" se refiere a trastuzumab (nombre comercial HERCEPTIN®), que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de sus restos cisteína (a un enlazador o un compuesto de la invención).

Como se usa en el presente documento, "H/K" se refiere a trastuzumab, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de uno de sus restos lisina (a un enlazador o un compuesto de la invención).

Como se usa a lo largo de esta solicitud, la numeración del resto aminoácido (por ejemplo: alanina en la posición 114) se basa en el índice UE del procedimiento de Kabat.

5 Como se usa en el presente documento, "H/TG1-(Q)" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de uno de sus restos naturales o diseñados mediante ingeniería genética que está en la etiqueta del péptido sustrato transglutaminasa (TG1) incluida en el anticuerpo (a un enlazador o un compuesto de la invención).

10 Como se usa en el presente documento, "H-A114C/C114" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de una de sus cisteínas diseñadas mediante ingeniería genética que se substituyó por alanina en la posición 114 de la cadena pesada (a un enlazador o un compuesto de la invención).

15 Como se usa en el presente documento, "H-K392C+L443C/C392+C443" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de uno o ambos de sus restos cisteína diseñados mediante ingeniería genética que fueron substituidos por lisina en la posición 392 de la cadena pesada y por leucina en la posición 443 de la cadena pesada (a un enlazador o un compuesto de la invención).

20 Como se usa en el presente documento, "H-E388C+N421C/C388+C421" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de uno o ambos de sus restos cisteína diseñados mediante ingeniería genética que fueron substituidos por ácido glutámico en la posición 388 y por asparagina en la posición 421 de la cadena pesada (a un enlazador o un compuesto de la invención).

25 Como se usa en el presente documento, "H-Q347C+K392C/C347+C392" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de uno o ambos de sus restos cisteína diseñados mediante ingeniería genética que fueron substituidos por glutamina en la posición 347 y lisina en la posición 392 de la cadena pesada (a un enlazador o un compuesto de la invención).

30 Como se usa en el presente documento, "H-L443C+kK183C/C443+kC183" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de una o ambas de sus cisteínas diseñadas mediante ingeniería genética que fueron substituidos por leucina en la posición 443 de la cadena pesada y por lisina en la posición 183 de la cadena ligera (kappa) (a un enlazador o un compuesto de la invención).

35 Como se usa en el presente documento, "H-Q347C+L443C/C347+C443" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través de una o ambas de sus cisteínas diseñadas mediante ingeniería genética que fueron substituidos por glutamina en la posición 347 y por leucina en la posición 443 de la cadena pesada (a un enlazador o un compuesto de la invención).

40 Como se usa en el presente documento, "H-kK183C/kC183" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través su cisteína diseñada mediante ingeniería genética que se substituyó por lisina en la posición 183 de la cadena ligera (kappa) (a un enlazador o un compuesto de la invención).

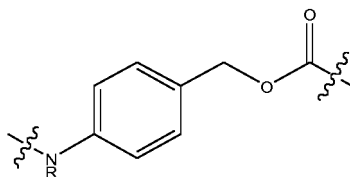
45 Como se usa en el presente documento, "H-N421C/C421" se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través su cisteína diseñada mediante ingeniería genética que se substituyó por la asparagina en la posición 421 de la cadena pesada (a un enlazador o un compuesto de la invención).

50 Generalmente, tal como se usa en el presente documento, "H-(AA1)####(AA2)/(AA2)####" (donde (AA1) y (AA2) son un primer y un segundo aminoácido) se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética, que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través su (AA2) diseñado mediante ingeniería genética que se substituyó en (AA1) en la posición ### de la cadena pesada a un compuesto de la invención, donde ### representa la posición del(de los) aminoácido(s) relevante(s). La notación similar con referencia a "k" o kappa" indicaría una sustitución de la cadena ligera.

55 De manera análoga, tal como se usa en el presente documento, "H-(AA1)####(AA2)+(AA3)#####(AA4)/(AA2)####+(AA4)#####" (donde (AA1), (AA2), (AA3) y (AA4) son el primer, segundo, tercer y cuarto aminoácidos) se refiere a trastuzumab diseñado mediante ingeniería genética que es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu, unido a través su (AA2) diseñado mediante ingeniería genética que se substituyó en (AA1) en la posición ### de la cadena pesada a un compuesto de la invención, donde ### representa la posición del(de los) aminoácido(s) relevante(s), y la unión también a través de su (AA4) diseñado mediante ingeniería genética con sustitución en (AA3) en la posición ##### de la cadena pesada del compuesto de la invención, donde ##### representa la posición del(de los) aminoácido(s) relevante(s). La notación similar con

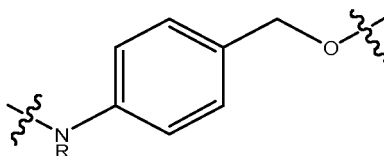
referencia a "k" o kappa" indicaría una sustitución de la cadena ligera.

Como se usa en el presente documento, "-PABC-" o "PABC" se refiere a la estructura:



o variantes de la misma.

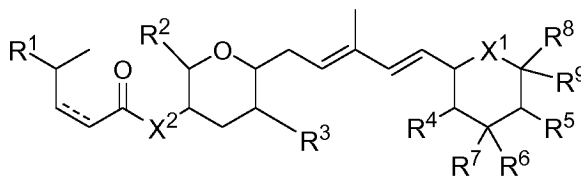
5 Como se usa en el presente documento, "-PABA-" o "PABA" se refiere a la estructura:



o variantes de la misma.

### Compuestos y conjugados de fármacos anticuerpo de los mismos

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (I):



10 (I)

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

15 R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

20 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

25 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;

5 R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

10 o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

15 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

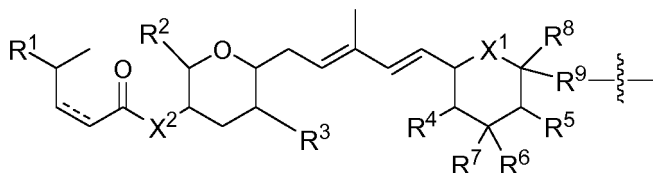
20 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P;

P es un radical de fórmula (I):



25 (I)

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

30 cada X' es CR o N;

cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub> C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

35 Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

5 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

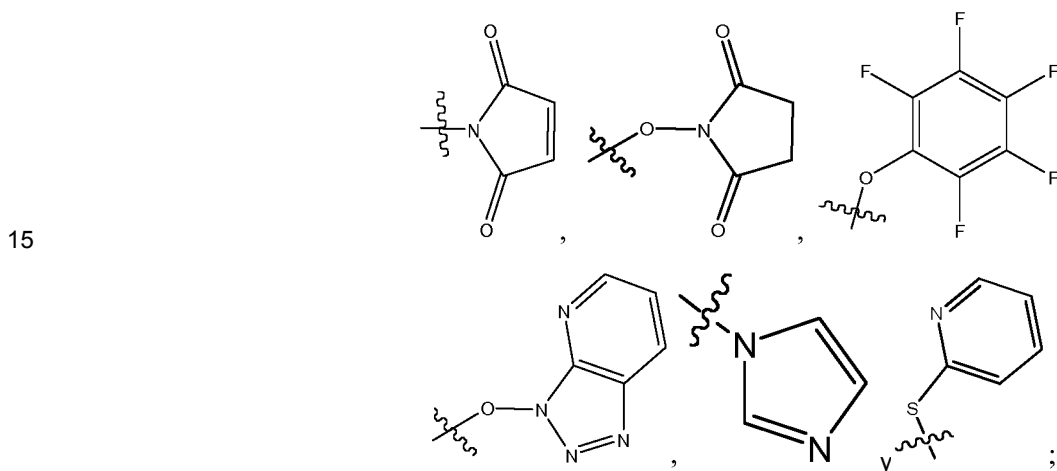
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

10 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: -halógeno, -NR<sub>2</sub>,



L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

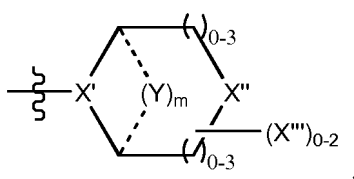
20 - O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil- O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

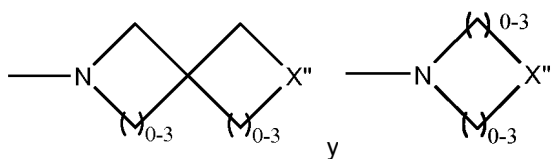
25

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

30 L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil- C(O)-,





o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

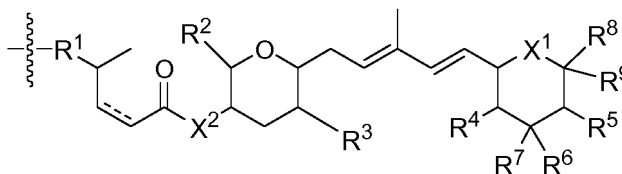
De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (I'):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P';

P' es un radical de fórmula (I'):



(I')

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X' es CR o N;

cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;



R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -OR<sup>n</sup>, -OCOR<sup>13'</sup>, -OC(O)NRR<sup>14'</sup>, -OCON(R)N(R)- y -NR-

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

5 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

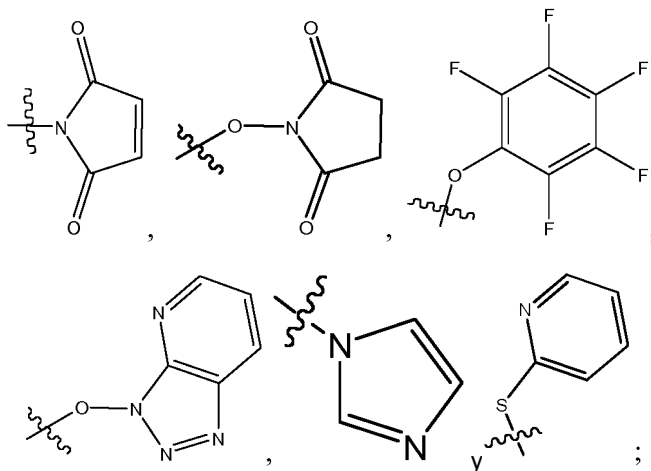
10 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

15 R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub> C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: -halógeno, -NR<sub>2</sub>,



20

L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

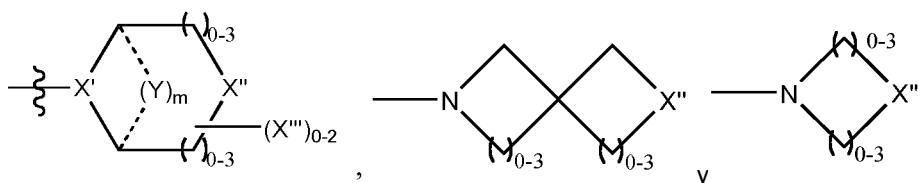
L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

25 - O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil- O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

30 L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

35 L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil- C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13a</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace, -alquilen C<sub>1-6</sub>-, -carbociclil C<sub>3-8</sub>-, -heterociclil C<sub>3-8</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-aril C<sub>6-14</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-heteroaril C<sub>5-14</sub>-;

5 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>-, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

10 en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

15 cada R<sup>14a</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace, -NR-, -carbocicl C<sub>3-10</sub>-, -heterociclil C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR', -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR- y -alquilen C<sub>1-6</sub>-;

20 en el que R<sup>14</sup> está opcionalmente sustituido con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

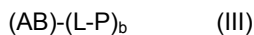
cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>;

25 cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1-6</sub>, heteroalquilo C<sub>1-6</sub> y arilo;

cada R'' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace y -alquilen C<sub>1-6</sub>-; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

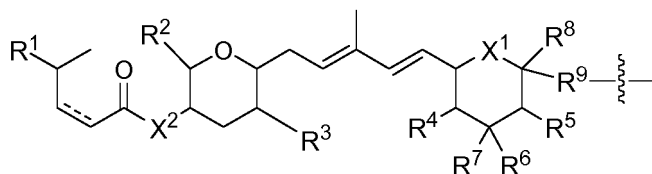
De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (III):



30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P;

P es un radical de fórmula (I):



(I)

en la que:

35 una línea discontinua representa un enlace opcional;

AB es un anticuerpo;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X' es CR o N;

- 5 cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-; CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

- 10 R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R-, -OR-, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR-, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

- 15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

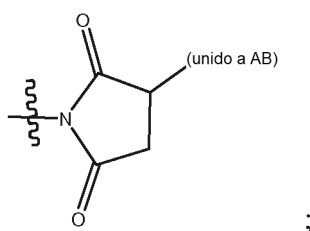
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

- 20 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

- 25 R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

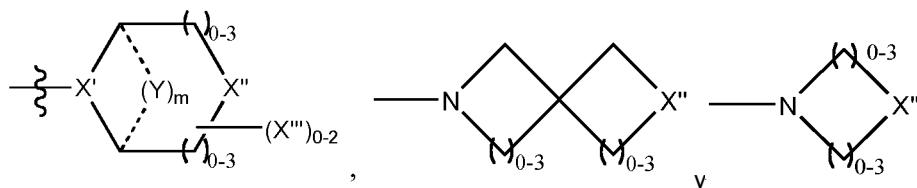
- 30 - O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil- O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;
- 35

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -

NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-C(O)-,



5 o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

10 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

15 en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

20 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y

b es 1-20; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

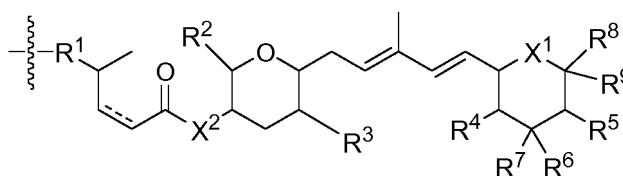
De acuerdo todavía con otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto o compuestos de fórmula (III'):

25 (AB)-(L-P)<sub>b</sub> (III')

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P';

P' es un radical de fórmula (I'):



(I')

30 en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

AB es un anticuerpo;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

35 cada X' es CR o N;

cada X" es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-; CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X" se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X'" es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X'" se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

5 Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -OR", -OCOR<sup>13'</sup>, -OCONRR<sup>14'</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)N(R<sup>15</sup>)- y -NR<sup>14</sup>-

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

10 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

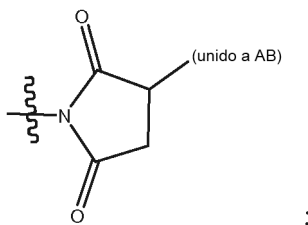
15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

20 R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



25 L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

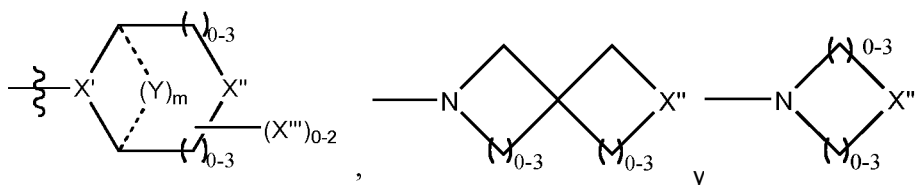
L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

30 - O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil- O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

35 L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil- C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13'</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace, -alquilen C<sub>1-6</sub>-, -carbociclilo C<sub>3-8</sub>-, -heterociclilo C<sub>3-8</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>-;

- 5 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

- 10 en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

- 15 cada R<sup>14'</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace, -NR-, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>-, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR', -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR- y -alquilen C<sub>1-6</sub>-;

- 20 en el que R<sup>14'</sup> está opcionalmente sustituido con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>;

- 25 cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1-6</sub>, heteroalquilo C<sub>1-6</sub> y arilo;

cada R'' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace y -alquilen C<sub>1-6</sub>-; y

b es 1-20; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

- 30 Debe notarse que las variables divalentes recitadas en lo anterior están destinadas a representar, cuando sea adecuado, el posicionamiento de tales radicales en múltiples orientaciones dentro de la molécula. Por lo tanto, por ejemplo, para citar, pero un solo a modo de ejemplo, el resto L<sup>2</sup> "-PABC-Cit-Val-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-" entre L<sup>1</sup> y L<sup>3</sup> puede posicionarse como L<sup>1</sup>-PABC-Cit-Val-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-L<sup>3</sup> o como L<sup>1</sup>-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-Val-Cit-PABC-L<sup>3</sup>. De manera análoga, L<sub>2</sub> se define en el presente documento como que comprende L<sub>2A</sub>- L<sub>2B</sub>-L<sub>2C</sub>, cuya construcción también puede colocarse en múltiples orientaciones.

- 35 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se proporciona un ADC de la fórmula III o III' que tiene la siguiente secuencia de componentes:

AB-L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>-P;

AB-L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>-P';

AB-L<sup>1</sup>-L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup>-L<sup>3</sup>-P; o

- 40 AB-L<sup>1</sup>-L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup>-L<sup>3</sup>-P.

Se prefieren ciertos grupos químicos y restos descritos en el presente documento, dependiendo de las circunstancias. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la invención, incluso con respecto a las diversas cargas útiles, carga útil del enlazador y ADC descritas y reivindicadas en el presente documento, se pueden aplicar una o más (o todas, o ninguna) de las siguientes:

En ciertas realizaciones de la invención X<sup>1</sup> es preferentemente -O-.

En ciertas realizaciones de la invención X<sup>2</sup> es preferentemente -NR-.

En ciertas realizaciones de la invención R<sup>1</sup> se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en: -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>.

5 En ciertas realizaciones de la invención R<sup>2</sup> es preferentemente alquilo C<sub>1-6</sub> y más preferentemente es metilo.

En ciertas realizaciones de la invención R<sup>3</sup> es preferentemente alquilo C<sub>1-6</sub> y más preferentemente es metilo.

En ciertas realizaciones de la invención R<sup>4</sup> es preferentemente hidrógeno o -OR.

En ciertas realizaciones de la invención R<sup>5</sup> es preferentemente hidrógeno o -OR.

10 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> cada uno se seleccionen independientemente entre el grupo que consiste en: hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre y halógeno, o R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R.

15 En ciertas realizaciones de la invención R<sup>8</sup> es preferentemente hidrógeno o -OR.

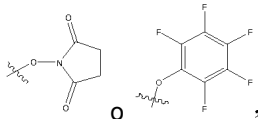
En ciertas realizaciones de la invención R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>.

En ciertas realizaciones de la invención R<sup>13</sup> se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>.

20 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>; o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>; en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR.

25 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que m sea 0. En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que m sea 1. En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que m sea 2. En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que m sea 3.

30 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que X<sup>2</sup> sea -NH-, X<sup>1</sup> sea -O-, R<sup>1</sup> sea -OCOR<sup>13</sup>, OH o -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> sea -OH, R<sup>5</sup> sea hidrógeno, R<sup>8</sup> sea hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos forman epóxido, R<sup>9</sup> sea -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-, R<sup>13</sup> sea alquilo C<sub>1-6</sub> (más preferentemente metilo), R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, formen un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>, L<sup>1</sup> sea



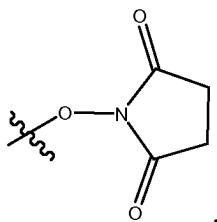
y L<sup>2A</sup>, L<sup>2B</sup>, L<sup>2C</sup> y L<sup>3</sup> estén todos ausentes. Como alternativa R<sup>6</sup> es -OH y R<sup>7</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre un halógeno, siendo el cloro el más preferido.

40 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que X<sup>2</sup> sea -NH-, X<sup>1</sup> sea -O-, R<sup>1</sup> sea -OCOR<sup>13</sup>, OH o -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, R<sup>2</sup> sea metilo, R<sup>3</sup> sea metilo, R<sup>4</sup> sea -OH, R<sup>5</sup> sea hidrógeno, R<sup>8</sup> sea hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos formen epóxido, R<sup>9</sup> sea -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-, R<sup>13</sup> sea alquilo C<sub>1-6</sub> (más preferentemente metilo), R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, formen un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>, L<sup>1</sup> sea un halógeno, L<sup>3</sup> sea -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR con siendo R más preferentemente hidrógeno y siendo el grupo alquilo más preferentemente etilo, L<sup>2A</sup> sea -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>- y L<sup>2B</sup> y L<sup>2C</sup> están ausentes.

45 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que X<sup>2</sup> sea -NH-, X<sup>1</sup> sea -O-, R<sup>1</sup> sea -OCOR<sup>13</sup> en el que R<sup>13</sup> es más preferentemente hidrógeno, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> sea -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos forman epóxido, R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-, R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> (más preferentemente metilo), R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>, L<sup>1</sup> es un halógeno, L<sup>3</sup> es -NR-alquil C<sub>1-</sub>

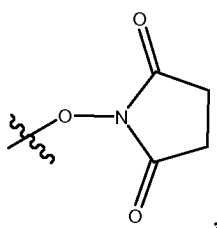
$_6$ -NR con siendo R más preferentemente hidrógeno y siendo el grupo alquilo más preferentemente etilo,  $L^{2A}$  es -C(O)-alquil  $C_{1-6}$ - y  $L^{2B}$  y  $L^{2C}$  están ausentes.

- 5 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $R^1$  sea -OCOR<sup>13</sup> o -OR en el que R es más preferentemente hidrógeno,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es metilo,  $R^4$  es -OH,  $R^5$  es hidrógeno,  $R^8$  es hidrógeno,  $R^6$  y  $R^7$  forman un epóxido,  $R^9$  es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-,  $L^3$  es -NR-NR- en el que cada R es más preferentemente hidrógeno o metilo o los dos sustituyentes R forman juntos un anillo de 6 miembros,  $L^1$  es un halógeno, -NR<sup>2</sup> o



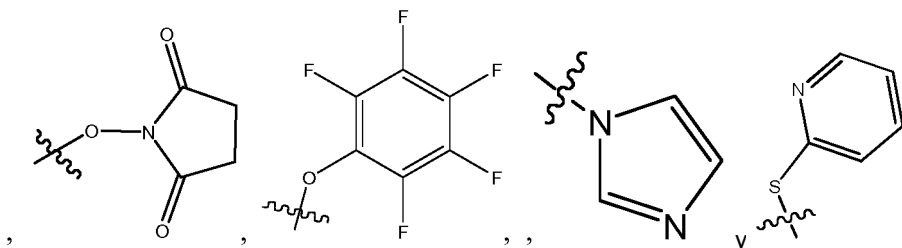
$L^{2C}$  es PABC,  $L^{2B}$  es -Cit-Val-,  $L^{2A}$  es -C(O)-alquil  $C_{1-6}$ -NRC(O)alquil  $C_{1-6}$ -.

- 10 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $R^1$  sea -OCOR<sup>13</sup> o -OR en el que R es más preferentemente hidrógeno,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es metilo,  $R^4$  es -OH,  $R^5$  es hidrógeno,  $R^8$  es hidrógeno,  $R^6$  y  $R^7$  forman un epóxido,  $R^9$  es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-,  $L^3$  es -NR-NR- en el que cada R es más preferentemente hidrógeno o metilo o los dos sustituyentes R forman juntos un anillo de 6 miembros,  $L^1$  es un halógeno, -NR<sup>2</sup> o



$L^{2C}$  está ausente;  $L^{2B}$  es -Ala-Val- y  $L^{2A}$  es -C(O)-alquil  $C_{1-6}$ -NRC(O)alquil  $C_{1-6}$ - o -C(O)alquil  $C_{1-6}$ -.

- 15 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $L^1$  se seleccione entre: -halógeno, -NR<sub>2</sub>



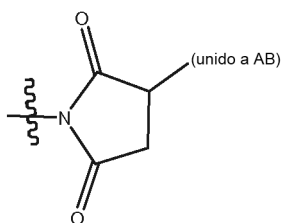
En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $R^1$  sea -OCOR<sup>13'</sup>,  $R^2$  sea metilo,  $R^3$  sea metilo,  $R^4$  sea -OH,  $R^5$  sea hidrógeno,  $R^8$  sea hidrógeno,  $R^9$  sea -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> en el que  $R^{14}$  y  $R^{15}$  sean más preferentemente hidrógeno,  $R^{13}$  sea un enlace,  $L^3$  es



en el que m sea 0,  $X^1$  sea N,  $X''$  sea -N- y  $X'''$  esté ausente,  $L^1$  sea un halógeno,  $L^{2C}$  sea PABC,  $L^{2B}$  sea -Cit-Val- y  $L^{2A}$  es -C(O)-alquil  $C_{1-6}$ -NRC(O)alquil  $C_{1-6}$ -.

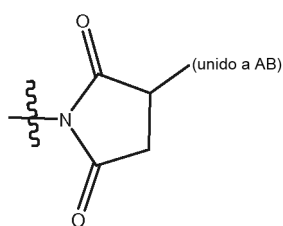
- 25 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $X^2$  sea -NH-,  $X^1$  es -O-,  $R^1$  es -OCOR<sup>13</sup>, OH o -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es metilo,  $R^4$  es -OH,  $R^5$  es hidrógeno,  $R^8$  es hidrógeno,  $R^6$  y  $R^7$  juntos forman epóxido,  $R^9$  es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-,  $R^{13}$  es alquilo  $C_{1-6}$  (más preferentemente metilo),  $R^{14}$  y  $R^{15}$ , junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo  $C_{3-10}$ ,  $L^1$  se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y





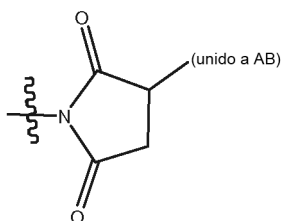
y  $L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{2C}$  y  $L^3$  están todos ausentes. Como alternativa  $R^6$  es -OH y  $R^7$  es alquilo  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre un halógeno, siendo el cloro el más preferido.

- 5 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $X^2$  sea -NH-,  $X^1$  es -O-,  $R^1$  es -OCOR<sup>13</sup>, OH o -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es metilo,  $R^4$  es -OH,  $R^5$  es hidrógeno,  $R^8$  es hidrógeno,  $R^6$  y  $R^7$  juntos forman epóxido,  $R^9$  es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-,  $R^{13}$  es alquilo  $C_{1-6}$  (más preferentemente metilo),  $R^{14}$  y  $R^{15}$ , junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo  $C_{3-10}$ ,  $L^1$  se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



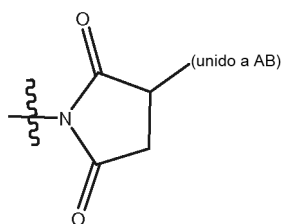
- 10  $L^3$  es -NR-alquil  $C_{1-6}$ -NR con siendo R más preferentemente hidrógeno y siendo el grupo alquilo más preferentemente etilo,  $L^{2A}$  es -C(O)-alquil  $C_{1-6}$ - y  $L^{2B}$  y  $L^{2C}$  están ausentes.

- 15 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $X^2$  sea -NH-,  $X^1$  sea -O-,  $R^1$  sea -OCOR<sup>13</sup> en el que  $R^{13}$  sea más preferentemente hidrógeno,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es metilo,  $R^4$  sea -OH,  $R^5$  sea hidrógeno,  $R^8$  sea hidrógeno,  $R^6$  y  $R^7$  juntos formen epóxido,  $R^9$  sea -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-,  $R^{13}$  sea alquilo  $C_{1-6}$  (más preferentemente metilo),  $R^{14}$  y  $R^{15}$ , junto con el átomo o átomos a los que están unidos, formen un anillo heterociclilo  $C_{3-10}$ ,  $L^1$  se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



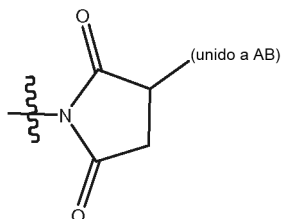
,  $L^3$  es -NR-alquil  $C_{1-6}$ -NR siendo R más preferentemente hidrógeno y siendo el grupo alquilo más preferentemente etilo,  $L^{2A}$  es -C(O)-alquil  $C_{1-6}$ - y  $L^{2B}$  y  $L^{2C}$  están ausentes.

- 20 En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $R^1$  sea -OCOR<sup>13</sup> o -OR en el que R es más preferentemente hidrógeno,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es metilo,  $R^4$  es -OH,  $R^5$  es hidrógeno,  $R^8$  es hidrógeno,  $R^6$  y  $R^7$  forman un epóxido,  $R^9$  es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-,  $L^3$  es -NR-NR- en el que cada R es más preferentemente hidrógeno o metilo o los dos sustituyentes R forman juntos un anillo de 6 miembros,  $L^1$  se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



$L^{2C}$  es PABC,  $L^{2B}$  es -Cit-V<sub>a</sub>-,  $L^{2A}$  es -C(O)-alquil  $C_{1-6}$ -NRC(O)alquil  $C_{1-6}$ -.

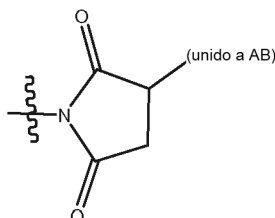
En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $R^1$  sea  $-\text{OCOR}^{13}$  o  $-\text{OR}$  en el que  $R$  es más preferentemente hidrógeno,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es metilo,  $R^4$  es  $-\text{OH}$ ,  $R^5$  es hidrógeno,  $R^8$  es hidrógeno,  $R^6$  y  $R^7$  forman un epóxido,  $R^9$  es  $-(\text{C}(\text{R})_2)_m-\text{C}(\text{O})-$ ,  $L^3$  es  $-\text{NR}-\text{NR}-$  en el que cada  $R$  es más preferentemente hidrógeno o metilo o los dos sustituyentes  $R$  forman juntos un anillo de 6 miembros,  $L^1$  se selecciona entre: un enlace a AB,  $-\text{NR}-$ (unido a AB) y



5

$L^{2C}$  está ausente;  $L^{2B}$  es  $-\text{Ala}-\text{Val}-$  y  $L^{2A}$  es  $-\text{C}(\text{O})-\text{alquil } C_{1-6}-\text{NRC}(\text{O})\text{alquil } C_{1-6}-$ .

En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que  $L^1$  se seleccione entre: un enlace a AB,  $-\text{NR}-$ (unido a AB) y



10 En determinadas realizaciones de la invención se prefiere que el anticuerpo se seleccione entre trastuzumab, el (C392 + L443) trastuzumab mutante, y el (C392 + C443) trastuzumab mutante.

15 En determinadas realizaciones de la invención se prefiere que el anticuerpo unido mediante un polipéptido que contiene Fc o un polipéptido que contiene Fab diseñado mediante ingeniería genética con un donante de acilo que contiene una etiqueta glutamina (por ejemplo, etiquetas peptídicas que contienen Gln o etiquetas Q) o una glutamina endógena convertida en reactiva (es decir, la capacidad de formar un enlace covalente como donante de acilo en presencia de una amina y una transglutaminasa) mediante un polipéptido diseñado mediante ingeniería genética (por ejemplo, mediante la delección, inserción, sustitución, mutación de un aminoácido o cualquiera combinación de las mismas), en presencia de transglutaminasa.

20 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo-fármaco anteriormente mencionados y las definiciones acompañantes, en las que el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 compuestos de la invención.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a cualquiera de los conjugados de anticuerpo-fármaco anteriormente mencionados y las definiciones acompañantes, en las que el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende 3 o 4 compuestos de la invención.

25 Los compuestos que contienen normalmente carboxilo y/o amino de la presente invención tienen ventajas distintas y únicas sobre los compuestos que no contienen carboxilo. Una de dichas ventajas radica en la mejora de la solubilidad en agua. Otra ventaja es la estabilidad química mejorada en agua y en fluidos biológicos tales como suero, sangre, líquido cefalorraquídeo y formulaciones de fármaco. Otra ventaja más es la capacidad de preparar fácilmente formas salinas de compuestos de carboxilato emparejándolas con un anión adecuado tal como cloruro, acetato y otros contraiones. Además, los compuestos de carboxilato de la presente invención pueden utilizarse fácilmente para preparar derivados de amida y derivados de éster que tienen una citotoxicidad potente y mejorada contra las líneas de células cancerosas y cánceres. Los compuestos que contienen carboxilato tienen adicionalmente una ventaja en su capacidad de unirse a anticuerpos, ya que el grupo de ácido carboxílico puede hacerse reaccionar con moléculas enlazadoras modificadas adecuadamente que soportan amina, alcohol y otros grupos para obtener enlazadores de carga útil. Los compuestos de ácido carboxílico pueden también funcionalizarse directamente para obtener derivados de ácido carboxílico activados, que se pueden conjugar posteriormente con los anticuerpos sin añadir enlazadores adicionales. Por ejemplo, el ácido carboxílico inventivo que contiene los compuestos puede hacerse reaccionar con N-hidroxisuccinimida para obtener ésteres de carboxil-NHS activados. Los ésteres de carboxil-NHS y los enlazadores de carga útil preparados pueden por tanto hacerse reaccionar a continuación anticuerpos para producir conjugados de anticuerpo-fármaco.

40

**La unidad de anticuerpo (Ab o AB)**

Como se ha indicado anteriormente, el término "anticuerpo" (o "Ab" o "AB") se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada. Además, aunque determinados aspectos de la invención descritos en el presente documento se refieren a conjugados de anticuerpo-fármaco, además se prevé que la porción de anticuerpos del conjugado puede sustituirse con cualquier cosa que se una específicamente o que se asocie o compleje reactivamente con un receptor, antígeno u otro resto receptor asociado con una población de células diana dada. Por ejemplo, en vez de contener un anticuerpo, un conjugado de la invención podría contener una molécula directora que se une a, se compleja con, o reacciona con un receptor, antígeno u otro resto receptor de una población celular previsto para ser modificado terapéutica o biológicamente de otra manera. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen proteínas, polipéptidos o péptidos, lectinas, glucoproteínas, no péptidos, vitaminas, moléculas transportadores de nutrientes (tales como, aunque no de forma limitativa, transferrina) de peso molecular pequeño o cualesquiera otras moléculas o sustancias de unión a células. En determinados aspectos, el anticuerpo u otra molécula de direccionamiento de este tipo actúa para administrar un fármaco a la población de células diana concreta con la cual el anticuerpo u otra molécula de direccionamiento interactúa.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco de fórmulas III o III' en el que el anticuerpo AB se selecciona entre: trastuzumab, mutantes de trastuzumab (por ejemplo, los mutantes de trastuzumab desvelados en el presente documento o en la solicitud de patente internacional PCT/IB2012/056234), oregovomab, edrecolomab, cetuximab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de vitronectina ( $\alpha_v\beta_3$ ), alemtuzumab, anticuerpos dirigidos contra HLA-DR que incluyen un anticuerpo humanizado dirigido contra HLA-DR para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, 131I Lym-1, anticuerpos dirigidos contra HLA-Dr10 que incluyen un anticuerpo murino dirigido contra HLA-Dr10 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, anticuerpos dirigidos contra cd33, anticuerpos dirigidos contra cd22 que incluyen un mAb dirigido contra CD22 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o del linfoma no de Hodgkin, labetuzumab, bevacizumab, ibritumomab tiuxetan, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, ipilimumab, y gemtuzumab.

Los heteroátomos que pueden estar presentes en una unidad de anticuerpo incluyen azufre (en una realización, a partir de un grupo sulfhidrido de un anticuerpo), oxígeno (en una realización, a partir de un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un anticuerpo) y nitrógeno (en una realización, a partir de un grupo amino primario o secundario de un anticuerpo). Estos heteroátomos pueden estar presentes en el anticuerpo en el estado natural del anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de origen natural, o se puede introducir en el anticuerpo mediante modificación química.

En una realización, una unidad de anticuerpo tiene un grupo sulfhidrido y la unidad de anticuerpo se une mediante el átomo de azufre del grupo sulfhidrido.

En otra realización, el anticuerpo tiene restos lisina que pueden reaccionar con ésteres activados (dichos ésteres incluyen, aunque no de forma limitativa, ésteres de N-hidroxisuccinimida, pentafluorofenilo, y p-nitrofenilo) y de esta manera forman un enlace amida que consiste en el átomo de nitrógeno de la unidad de anticuerpo y un carbonilo.

En otro aspecto más, la unidad de anticuerpo tiene uno o más restos lisina que se pueden modificar químicamente para introducir uno o más grupos sulfhidrido. Los reactivos que se pueden usar para modificar las lisinas incluyen, aunque no de forma limitativa, S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (reactivo de Traut).

En otra realización, la unidad de anticuerpo puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que se pueden modificar químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrido.

En otra realización más, la unidad de anticuerpo puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que se pueden oxidar para proporcionar un grupo aldehído (véase, por ejemplo, Laguzza, y col., 1989, J. Med. Chem. 32(3):548-55). El aldehído correspondiente puede formar un enlace con el sitio reactivo tal como, por ejemplo, hidrazina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de las proteínas para la unión o asociación de fármacos se describen en Coligan y col., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002).

Cuando los conjugados comprenden proteínas no inmunorreactivas, los polipéptidos, o las unidades peptídicas en vez de un anticuerpo, las proteínas, polipéptidos, o unidades peptídicas no inmunorreactivas útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, transferrina, factores de crecimiento ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformante ("TOP"), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), factores de crecimiento I y II de la insulina y análogos a insulina, somatostatina, lectinas y apoproteínas procedentes de una lipoproteína de baja densidad.

Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico concreto (por ejemplo, un antígeno de células cancerosas, un antígeno vírico, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un producto químico, un ácido nucleico o sus fragmentos). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (mAb) para un antígeno de interés utilizando cualquier

técnica conocida en la materia que se proporciona para la producción de moléculas de anticuerpo por líneas de células continuas en cultivo.

Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos, o anticuerpos monoclonales quiméricos. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, Teng y col., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:7308-7312; Kozbor y col., 1983, Immunology Today 4:72-79; y Olsson y col., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).

El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos y se describen más abajo.

El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo de un anticuerpo funcionalmente activo que se une inmuno-específicamente a unas células diana (por ejemplo, antígenos de células cancerosas, antígenos víricos, o antígenos microbianos) u otros anticuerpos que se unen a células o a la matriz tumoral. A este respecto, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de estimular anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo reconocido. Específicamente, en una realización ilustrativa, se puede potenciar la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina mediante la delección de las secuencias marco y de las CDR que están en el extremo C de la secuencia de la CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de las CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de las CDR en los ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier procedimiento de ensayo de unión conocido en la materia (por ejemplo, el ensayo BIA core) (para la localización de las secuencias de la CDR, véanse, por ejemplo, Kabat y col., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, Doctor en medicina; Kabat E y col., 1980, J. Immunology 125(3):961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, aunque no de forma limitativa, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fab, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, scFv, scFv-Fv, o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

Además, los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que pueden prepararse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como, por ejemplo, las que tienen una región variable derivada de regiones constantes de inmunoglobulina monoclonal de murino y de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y patente de Estados Unidos n.º 4.816.397) Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.585.089) Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante las técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, utilizando, por ejemplo, los procedimientos descritos en la publicación internacional n.º WO 87/02671; publicación de patente europea n.º 0 184 187; publicación de patente europea n.º 0 171 496; publicación de patente europea n.º 0 173 494; publicación internacional n.º WO 86/01533; patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; publicación de patente europea n.º 012 023; Berter y col., 1988, Science 240:1041-1043; Liu y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu y col., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura y col., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood y col., 1985, Nature 314:446-449; y Shaw y col., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi y col., 1986, BioTechniques 4:214; patente de Estados Unidos n.º 5.225.539; Jones y col., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan y col., 1988, Science 239:1534; y Beidler y col., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Son particularmente deseables los anticuerpos completamente humanos y se pueden producir utilizando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar los genes de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar los genes de la cadena pesada y ligera humana. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, toda o una parte de un polipéptido de la invención. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno utilizando la tecnología del hibridoma convencional. Los transgenes de la inmunoglobulina humana contenidos por los ratones transgénicos se redisponen durante la diferenciación de los linfocitos B y experimentan posteriormente cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una revisión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93. Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806, en su totalidad. Se pueden obtener otros anticuerpos humanos comercialmente de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (actualmente Amgen, Freemont, Calif.) y Medarex (Princeton, N.J.).

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada". En esta estrategia, se usa un anticuerpo monoclonal no humano

seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Véase, por ejemplo, Jespers y col., 1994, *Biotechnology* 12:899-903). Se pueden producir también anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo las bibliotecas de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Quan y Carter, 2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics*, En *Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu and Fick, eds., Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., Capítulo 20, págs. 427-469).

En otras realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionalmente activos, por ejemplo, en el que el anticuerpo se fusiona mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), tanto en el extremo N como en el extremo C de una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una de sus porciones, preferentemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no procede de un anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento del mismo está unido covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que bien pueden estar modificados, es decir, mediante el enlace covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicho enlace covalente permita al anticuerpo retener su inmunoespecificidad de unión a antígeno. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, aunque no de forma limitativa, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos pueden tener modificaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con los receptores Fc. En particular, los anticuerpos pueden tener modificaciones en restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio dirigido contra Fc y el receptor de FcRn (véase, por ejemplo, publicación internacional n.º WO 97/34631).

Se pueden obtener anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa comercialmente o producirse mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinantes. Se pueden obtener las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa, por ejemplo, de la base de datos del GenBank o de una base de datos similar a esta, publicaciones bibliográficas o mediante clonación y secuenciación rutinarias.

En una realización específica, se pueden usar anticuerpos conocidos para el tratamiento del cáncer. Se pueden obtener anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa comercialmente o producirse mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante. Se pueden obtener las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa, por ejemplo, de la base de datos del GenBank o de una base de datos similar a esta, las publicaciones bibliográficas, o por clonación y secuenciación rutinarias. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa, OVAREX que es un anticuerpo de murino para el tratamiento del cáncer de ovario; PANOREX (Glaxo Wellcome, NC) que es un anticuerpo IgG<sub>2a</sub> de murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; Cetuximab ERBITUX (Imclone Systems Inc., NY) que es un anticuerpo quimérico dirigido contra EGFR IgG para el tratamiento de cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico, tales como cánceres de cabeza y cuello; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; CAMPATH 1/H (Leukosite, MA) que es un anticuerpo IgG<sub>1</sub> humanizado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC); SMART ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra HLA-DR para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; ONCOLYM (Techniclone, Inc., CA) que es un anticuerpo de murino radiomarcado dirigido contra HLA-Dr10 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; ALLOMUNE (BioTransplant, CA) que es un mAb humanizado dirigido contra CD2 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o del linfoma no de Hodgkin; y CEACIDE (Immunomedics, NJ) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra CEA para el tratamiento del cáncer colorrectal.

En intentos para descubrir las dianas celulares eficaces para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, los investigadores han tratado identificar los polipéptidos transmembrana u otros polipéptidos asociados a tumores de otra forma que se expresan específicamente sobre la superficie de uno o más tipo(s) particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosa(s) normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente sobre la superficie de células cancerosas en comparación a sobre la superficie de células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antigénicos superficiales celulares asociados a tumores ha proporcionado una sensibilización a la capacidad de hacer diana de manera específica en las células cancerosas para los tratamientos basados en anticuerpos mediante la destrucción.

#### **La unidad enlazadora (L)**

Un enlazador (denominado algunas veces "[enlazador]" en el presente documento) es un compuesto bifuncional que se puede utilizar para unirse a un fármaco y un anticuerpo para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC).

Dichos conjugados son útiles, por ejemplo, en la formación de inmunocombinados dirigidos contra antígenos asociados a tumores. Dichos conjugados permiten la administración selectiva de fármacos citotóxicos a células tumorales.

En un ADC, el enlazador sirve para unir la carga útil al anticuerpo.

- 5 En un aspecto, se introduce una segunda sección de la unidad enlazadora que tiene un segundo sitio reactivo, por ejemplo, un grupo electrófilo que es reactivo con un grupo nucleófilo presente en una unidad de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo). Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en una unidad enlazadora y forma un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para la unión del anticuerpo.

- 15 En otra realización, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de una unidad enlazadora puede reaccionar con un grupo electrófilo de un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en una unidad enlazadora incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida. El grupo electrófilo de un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a una unidad enlazadora.

- 20 Los grupos aminofuncionales son también sitios reactivos útiles para una unidad enlazadora ya que pueden reaccionar con ácido carboxílico, o ésteres activados de un compuesto para formar un enlace amida. Normalmente, los compuestos basados en péptidos de la invención pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase, por ejemplo, Schroder y Lubke, "The Peptides", volumen 1, págs. 76 -136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

- 25 En el contexto de la invención, pero sin limitarse de forma concreta a componentes enlazadores tales como  $L^1$ ,  $L^2$  (incluyendo  $L^{2A}$ ,  $L^{2B}$  y  $L^{2C}$ ) y  $L^3$ , la redacción "seleccionado entre uno o más de" o "uno o más de" indica que múltiples componentes, que puede ser iguales o diferentes, están o pueden disponerse secuencialmente. Por lo tanto, por ejemplo,  $L^3$  puede ser -alquilo  $C_{1-6}$ , -NR- o los otros componentes relacionados individualmente, pero también -alquilo  $C_{1-6}$ -NR-, o cualquier combinación diferente de 2 o más componentes relacionados.

### 30 **Síntesis de compuestos y sus conjugados de anticuerpo-fármaco**

- Pueden prepararse los compuestos y conjugados de la invención utilizando los procedimientos sintéticos reseñados a continuación en la ilustración. Como se describe con más detalle a continuación, se pueden preparar los compuestos y conjugados de la invención utilizando una sección de una unidad enlazadora que tiene un sitio reactivo para la unión al compuesto. En un aspecto, se introduce una segunda sección de la unidad enlazadora que tiene un segundo sitio reactivo, por ejemplo, un grupo electrófilo que es reactivo con un grupo nucleófilo presente en una unidad de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo). Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en una unidad enlazadora y forma un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para la unión del anticuerpo.

- 45 En otra realización, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de una unidad enlazadora puede reaccionar con un grupo electrófilo de un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en una unidad enlazadora incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida. El grupo electrófilo de un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a una unidad enlazadora.

- 50 Los grupos aminofuncionales son también sitios reactivos útiles para una unidad enlazadora ya que pueden reaccionar con ácido carboxílico, o ésteres activados de un compuesto para formar un enlace amida. Normalmente, los compuestos basados en péptidos de la invención pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase, por ejemplo, Schroder y Lubke, "The Peptides", volumen 1, págs. 76 -136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

- 55 Como se describe con más detalle a continuación, se pueden preparar los conjugados utilizando una sección del enlazador que tiene un sitio reactivo para unión a un compuesto de la invención e introducir otra sección de la unidad enlazadora. En un aspecto, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo con un grupo nucleófilo presente en una unidad de anticuerpo, tal como un anticuerpo. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para la unión del anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo

incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en una unidad enlazadora y forma un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos maleimida y haloacetamida.

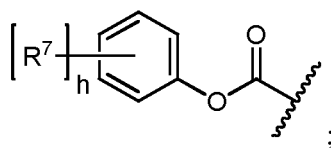
- 5 En otra realización, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente en una unidad de anticuerpo. El grupo electrófilo de un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque no de forma limitativa, grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de una unidad enlazadora puede reaccionar con un grupo electrófilo de un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en una unidad enlazadora incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida.

### Conjugación con transglutaminasa

- 15 En determinadas realizaciones, un compuesto de la invención puede reticularse covalentemente a un polipéptido que contiene Fc o que contiene Fab diseñado mediante ingeniería genética con un donante de acilo que contiene una etiqueta glutamina (por ejemplo, etiquetas peptídicas que contienen Gln o etiquetas Q) o una glutamina endógena convertida en reactiva (es decir, la capacidad de formar un enlace covalente como donante de acilo en presencia de una amina y una transglutaminasa) mediante un polipéptido diseñado mediante ingeniería genética (por ejemplo, mediante la delección, inserción, sustitución, mutación de un aminoácido o cualquier combinación de las mismas en el polipéptido), en presencia de transglutaminasa, con la condición de que el compuesto de la invención comprende un agente donante de amina (por ejemplo, una molécula pequeña que comprende o está unida a una amina reactiva), formando por tanto una población estable y homogénea de un conjugado polipeptídico que contiene Fc diseñado mediante ingeniería genética con el agente donante de amina que es específico de sitio conjugado con el polipéptido que contiene Fc o que contiene Fab a través de la etiqueta que contiene la glutamina donante de acilo o la glutamina endógena expuesta/accesible/reactiva. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden conjugarse como se describe en la solicitud de patente internacional con n.º de serie PCT/IB2011/054899. En determinadas realizaciones, para facilitar la conjugación del compuesto de la invención a un polipéptido que contiene Fc o que contiene Fab diseñado mediante ingeniería genética con una etiqueta que contiene una glutamina donante de acilo o una glutamina endógena preparada reactiva mediante el polipéptido diseñado mediante ingeniería genética en la presencia de transglutaminasa, Z es NH<sub>2</sub>.

### 30 Conjugación con la región constante del dominio Kappa de la cadena ligera humana

- En determinadas realizaciones, un compuesto de la invención puede unirse covalentemente a la cadena secundaria de K<sup>188</sup> de región constante del dominio kappa de la cadena ligera humana (CL<sub>k</sub>) (numeración de la cadena ligera completa de acuerdo con Kabat). Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden conjugarse como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos con número de serie 13/180.204. En determinadas realizaciones, para facilitar la conjugación con K<sup>188</sup> CL<sub>k</sub>, Z es



R<sup>7</sup> se selecciona independientemente para cada incidencia entre el grupo que consiste en F, Cl, I, Br, NO<sub>2</sub>, CN y CF<sub>3</sub>; y h es 1, 2, 3, 4 o 5.

- 40 En determinadas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención conjugado covalentemente a un anticuerpo (o su porción de unión a antígeno), en el que al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente 60 %, o al menos aproximadamente 70 %, o al menos aproximadamente 80 %, o al menos aproximadamente 90 % del compuesto de la invención en la composición se conjuga con el anticuerpo o su porción de unión a antígeno a K<sup>188</sup> CL<sub>k</sub>.

- 45 En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención pueden conjugarse con el sitio de combinación de un anticuerpo catalítico, tal como anticuerpos dirigidos contra la aldolasa, o porciones de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos dirigidos contra la aldolasa contienen porciones de sitios de combinación que, cuando no están apantallados (por ejemplo, mediante conjugación), catalizan una reacción de adición de aldol entre un donante de cetona alifática y un aceptor de aldehído. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2006/205670 en las páginas concretas 78-118 que describen los enlazadores y los párrafos [0153]-[0233] que describen los anticuerpos, fragmentos útiles, variantes y modificaciones de los mismos, h38C2, los sitios de combinación y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), y la tecnología de anticuerpos relacionada. La expresión "sitio de combinación" incluye las CDR y los restos de marcos adyacentes que están implicados en la unión del antígeno.

**Composiciones y procedimientos de administración**

5 En otras realizaciones, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz de un compuesto de la invención y/o uno de sus conjugados de anticuerpo-fármaco y un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, las composiciones son adecuadas para la administración veterinaria o humana.

10 Las presentes composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un sólido o líquido. Las rutas de administración típicas incluyen, sin limitación, parenteral, ocular e intratumoral. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intravenosa, la inyección intramuscular o intraesternales o técnicas de infusión. En un aspecto, las composiciones se administran por vía parenteral. En una realización específica, las composiciones se administran por vía intravenosa.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de tal manera que permitan a un compuesto de la invención y/o a un conjugado de anticuerpo-fármaco estar biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más dosis unitarias, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una dosis unitaria individual, y un recipiente de un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco de mismo en forma líquida puede contener una pluralidad de dosis unitarias.

20 Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden no ser tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para las personas normalmente expertas en la materia que la dosificación óptima del(de los) principio(s) activo(s) en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, ser humano), la forma particular del compuesto de la invención y/o de su conjugado de anticuerpo-fármaco, la forma de administración, y la composición empleada.

El transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser sólido o estar en forma de partículas, de tal manera que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimido o polvo. El(los) transportador(es) puede(n) ser líquido(s). Además, el(los) transportador(es) puede(n) estar en forma de partículas.

25 La composición puede estar en la forma de un líquido, por ejemplo, una solución, emulsión o suspensión. En una composición para la administración mediante inyección, se puede incluir también uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

30 Las composiciones líquidas, tanto si son soluciones, como suspensiones u otras formas similares, pueden incluir también uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, solución salina, preferentemente fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos, tales como monoglicéridos o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos, fosfatos o aminoácidos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La composición parenteral se puede introducir en ampollas, una jeringuilla desechable o un vial de múltiples dosis fabricado de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante ilustrativo. Una composición inyectable es preferentemente estéril.

40 La cantidad de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo que es eficaz para el tratamiento de un trastorno o dolencia concreto dependerá de la naturaleza del trastorno o dolencia, y se puede determinar mediante técnicas clínicas normalizadas. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos in vitro o in vivo para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en las composiciones dependerá también de la ruta de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con el criterio del especialista a cargo del tratamiento y de las circunstancias del paciente.

45 Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de la invención y/o un conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos aproximadamente un 0,01 % de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo en peso de la composición. En una realización ilustrativa, las composiciones farmacéuticas se preparan de tal manera que una dosis unitaria parenteral contenga de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 % en peso del compuesto de la cantidad de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

50 Para administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo por kg de peso corporal del paciente. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo por kg de peso corporal del paciente. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.



Generalmente, a dosificación de un compuesto de la invención y/o de conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo administrada a un paciente es normalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal del paciente. En un aspecto, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En otro aspecto, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En otro aspecto más, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal del paciente. En otro aspecto más la dosificación administrada está entre aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal del paciente. En otro aspecto más, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal del paciente.

Se puede administrar un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen varios sistemas de administración, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y se pueden usar para administrar un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo. En determinadas realizaciones, se administra a un paciente más de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos localmente en la zona que necesita tratamiento. Esto se puede lograr, a modo de ejemplo pero no como limitación, mediante infusión local durante la cirugía; aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía; mediante inyección; por medio de un catéter; o mediante un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico. En otra realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmunitaria.

En otra realización más, el compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo pueden administrarse en un sistema de liberación controlada, tal como, aunque no de forma limitativa, una bomba, o se pueden usar varios materiales poliméricos. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana del compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo, por ejemplo, el hígado, requiriendo de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citada anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Se pueden utilizar otros sistemas de liberación controlada descritos en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el cual se administra un compuesto o su conjugado de anticuerpo-fármaco. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos aquellos cuyo origen es petróleo, animal, vegetal o sintético. Los transportadores pueden ser soluciones salinas, y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes y otros agentes. En una realización, cuando se administran a un paciente, el compuesto o el conjugado y los transportadores farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un transportador ilustrativo cuando el compuesto o conjugado se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, aglomerados, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Se describen otros ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

En una realización, el compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se formulan de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a animales, particularmente seres humanos. Normalmente, los transportadores o vehículos para la administración intravenosa son soluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones pueden incluir también un agente solubilizante. Las composiciones para la administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran bien por separado o bien mezclados entre sí en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o como un concentrado exento de agua en un recipiente hermético tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de principio activo. Cuando un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con un frasco para infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando el compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de tal forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

La composición puede incluir varios materiales que modifican la forma física de una dosis unitaria sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una envoltura de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la envoltura de revestimiento son normalmente inertes, y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, shellac, y otros agentes de revestimiento entéricos. Como alternativa, los principios activos pueden incluirse en una cápsula de gelatina.

Ya sea en forma sólida como líquida, las presentes composiciones pueden incluir un agente farmacológico utilizado en el tratamiento del cáncer.

#### **Usos terapéuticos de los compuestos y conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos**

Otro aspecto de la invención se refiere a los compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos para el tratamiento del cáncer.

Los compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa, produciendo la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Por consiguiente, los compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos se pueden usar en una variedad de escenarios para el tratamiento de cánceres animales. Dichos conjugados se pueden usar para administrar un compuesto de la invención a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, en una realización, el anticuerpo del conjugado se une a o se asocia con un antígeno asociado a una célula cancerosa o a una célula tumoral, y el conjugado se puede capturar (internalizar) en el interior de una célula tumoral o una célula cancerosa mediante endocitosis mediada por receptor u otro mecanismo de internalización. El antígeno puede unirse a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. En determinadas realizaciones, una vez en el interior de la célula, una o más secuencias peptídicas específicas se escinden enzimáticamente o hidrolíticamente por una o más proteasas asociadas a células tumorales o células cancerosas, dando como resultado la liberación de un compuesto de la invención a partir del conjugado. El compuesto liberado de la invención queda entonces libre para migrar al interior de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. El conjugado también puede escindirse por una proteasa intracelular para liberar un compuesto de la invención. En una realización alternativa, el compuesto de la invención se escinde a partir del conjugado fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el compuesto de la invención penetra posteriormente en la célula.

En determinadas realizaciones, los conjugados proporcionan el direccionamiento del fármaco al tumor o al cáncer específico de la conjugación, reduciendo de esta manera la toxicidad general de los compuestos de la invención.

En otra realización, la unidad de anticuerpo se une a la célula tumoral o a la célula cancerosa.

En otra realización, la unidad de anticuerpo se une a un antígeno de célula tumoral o célula cancerosa que está sobre la superficie de la célula tumoral o la célula cancerosa.

En otra realización, la unidad de anticuerpo se une a un antígeno de una célula tumoral o célula cancerosa que es una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.

La especificidad de la unidad de anticuerpo por una célula tumoral o célula cancerosa concreta puede ser importante para determinar aquellos tumores o cánceres que se tratan más eficazmente.

Los tipos concretos de cánceres que se pueden tratar con un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo, incluyen, aunque no de forma limitativa, carcinomas de la vejiga, mama, cuello de útero, colon, endometrio, riñón, pulmón, esófago, ovario, próstata, páncreas, piel, estómago y testículos; y cánceres de la sangre que incluyen, aunque no de forma limitativa, leucemias y linfomas.

*Tratamiento multimodal para el cáncer.* Los cánceres, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un tumor, metástasis, u otra enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado, pueden tratarse o inhibirse mediante la administración de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

En otras realizaciones, los compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos para tratar el cáncer se pueden administrar en combinación con un agente quimioterapéutico. En una realización, el agente quimioterapéutico es uno para el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea refractario. En una realización, el agente quimioterapéutico es uno fármaco para el que se ha encontrado que el del tratamiento cáncer es refractario. Un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se puede administrar a un paciente que se ha sometido también a cirugía como tratamiento para el cáncer.

En algunas realizaciones, los compuestos de la invención y su conjugado de anticuerpo-fármaco se pueden administrar para tratar el cáncer con un tratamiento adicional, tal como radioterapia. En una realización específica, el compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo se administra de forma simultánea con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. En otra realización específica, el agente quimioterapéutico o

radioterapia se administra antes o después de la administración de un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo.

Se puede administrar un agente quimioterapéutico durante una serie de sesiones. Se puede administrar cualquiera o una combinación de los agentes quimioterapéuticos, tales como un(os) agente(s) quimioterapéutico(s) de un tratamiento convencional.

Además, se proporciona un compuesto de la invención y/o conjugado de anticuerpo-fármaco del mismo para el tratamiento del cáncer como una alternativa a la quimioterapia o la radioterapia cuando la quimioterapia o la radioterapia han demostrado ser demasiado tóxicas, por ejemplo, dando como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. El paciente que se está tratando puede, opcionalmente, tratarse con otro tratamiento contra el cáncer como la cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de qué tratamiento se considera aceptable o soportable.

Los compuestos de la invención y/o conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos pueden utilizarse también de una manera in vitro o ex vivo, tal como para el tratamiento de determinados cánceres, incluyendo, aunque no de forma limitativa leucemias y linfomas, implicando dicho tratamiento los trasplantes de citoblastos autólogos. Esto puede implicar un procedimiento multietapa en el que los hemocitoblastos autólogos se extraen y se limpian de todas las células cancerosas, a continuación se erradica la población de células de médula ósea restante del animal mediante la administración de un compuesto de la invención y/su conjugado de anticuerpo-fármaco con o sin radioterapia de dosis elevadas acompañante y el injerto de citoblastos se infunde posteriormente en el animal. A continuación, se proporciona tratamiento de soporte mientras se restaura la función de la médula ósea y se recupera el paciente.

La invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes, que no están previstos para limitar el alcance de la invención.

### Especies liberadas

También se divulgan las especies químicas liberadas, dentro o en las proximidades de la célula cancerosa o célula tumoral por lo que se cree que es la escisión enzimática y/o hidrolítica por una o más proteasas asociadas a células cancerosas o asociadas a células tumorales. Tales compuestos incluyen las especies descritas en el presente documento, y también incluyen compuestos tales como los descritos en la estructura:

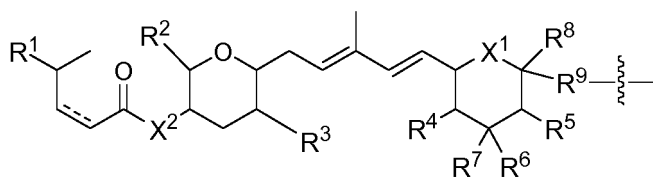
Un compuesto o compuestos de fórmula (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce  $L^1-L^2-L^3$ , en el que  $L^3$  está unido a P;

P es un radical de fórmula (I):



(I)

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

cada  $X^1$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada  $X^2$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada  $X^i$  es CR o N;

cada  $X''$  es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si  $X''$  se une a  $L^2$  o a un adicional  $L^3$ , o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada  $X'''$  es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si  $X'''$  se une a  $L^2$ , o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -CONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -CON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

5 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

10 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

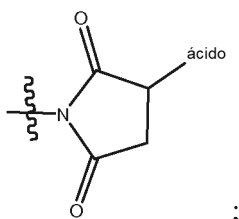
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: -ácido, -NR-ácido y



20

L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

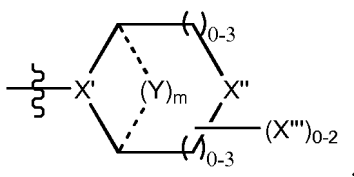
25 - O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

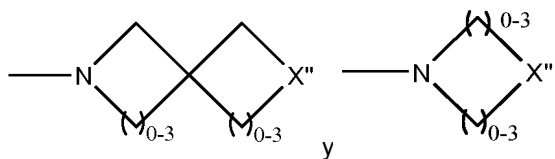
30

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

35 L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-C(O)-,





o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

ácido es un residuo de aminoácido seleccionado entre -SCH<sub>2</sub>CH(COOH)(NH<sub>2</sub>), -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(COOH)(NH<sub>2</sub>) y -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH(COOH)(NH<sub>2</sub>);

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

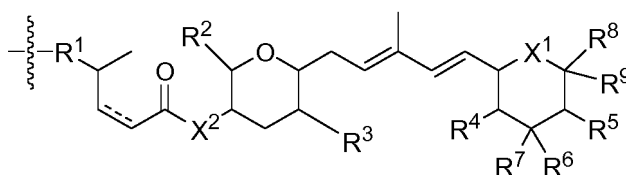
Adicionalmente, un compuesto o compuestos de fórmula (I'):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P';

P' es un radical de fórmula (I'):



(I')

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>i</sup> es CR o N;

cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -OR<sup>n</sup>, -OCOR<sup>13'</sup>, -OC(O)NRR<sup>14'</sup>-, OCON(R)N(R)- y -NR-

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

5 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

10 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

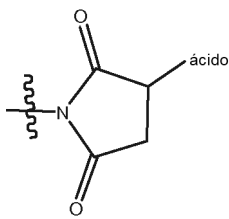
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede sustituirse opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>-, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: -ácido, -NR-ácido y



20

L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

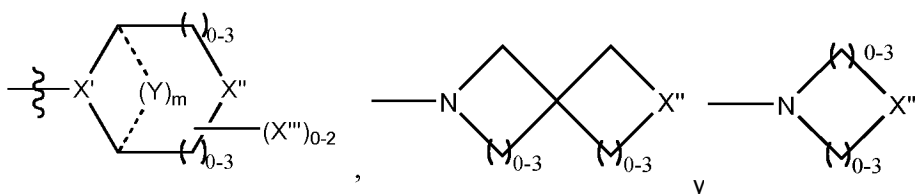
25 - O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

30

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

35 L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se juntan para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13'</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace, -alquilen C<sub>1-6</sub>-, -carbociclil C<sub>3-8</sub>-, -heterociclil C<sub>3-8</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-aril C<sub>6-14</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-heteroaril C<sub>5-14</sub>-;

cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

5 -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,

10 en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

15 cada R<sup>14</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace, -NR-, -carbociclil C<sub>3-10</sub>-, -heterociclil C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR', -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR- y -alquilen C<sub>1-6</sub>-,

20 en el que R<sup>14</sup> está opcionalmente sustituido con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

ácido es un residuo de aminoácido seleccionado entre -SCH<sub>2</sub>CH(COOH)(NH<sub>2</sub>), -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(COOH)(NH<sub>2</sub>) y -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH(COOH)(NH<sub>2</sub>);

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>;

25 cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo;

cada R'' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace y -alquilen C<sub>1-6</sub>-; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

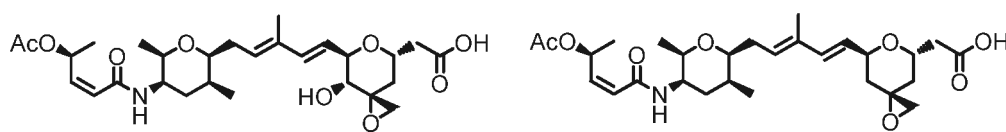
## Ejemplos

### Producción de productos naturales

30 Los siguientes procedimientos reseñan la producción de "productos naturales" útiles como cargas útiles en la presente invención. La expresión "producto natural denota que el producto se produce mediante un proceso de fermentación, pero no sugiere que estos productos se conozcan o puedan encontrarse en la naturaleza. Los productos naturales se señalan a continuación con el prefijo "PN".

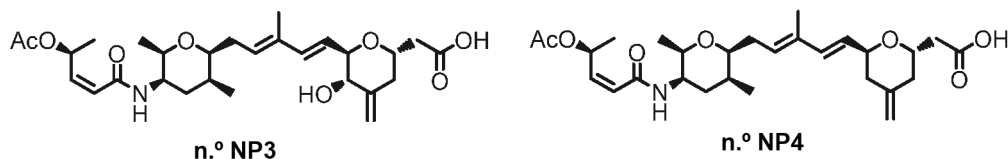
#### Ejemplo 1

35 **Fermentación, Extracción y Aislamiento de:** Ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º NP1); ácido [(3S,5S,7S)-7-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º NP2); ácido [(2S,5S,6R)-6-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-1[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-5-hidroxi-4-metilidenotetrahidro-2H-piran-2-il]acético (n.º NP3); ácido [(2S,6S)-6-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-4-metilidenotetrahidro-2H-piran-2-il]acético (n.º NP



n.º NP1

n.º NP2



*Etapa 1:* Fermentación usando *Pseudomonas* sp. N.º 2663, (Cepa FERM BP-3421):

5 *Pseudomonas* sp. N.º 2663, (Cepa FERM BP-3421), se adquirió del International Patent Organism Depository (IPOD) en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba, Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japón). Los estudios taxonómicos posteriores llevados a cabo mediante el análisis bioquímico de secuencia del ARNr de 16S (BBL Crystal Kit) desvelaron que FERM BP-3421 era una *Burkholderia* sp.

10 Se cultivaron aislados de colonias individuales mediante dilución sembrando en placas un cultivo congelado de FERM BP-3421 natural en placas de agar nutriente. Se inocularon varios matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio de siembra (polipeptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl al 0,5 %) con agar de cultivo en crecimiento y se incubaron a 30 °C con agitación a 220 rpm durante 18-20 horas. Se inoculó el cultivo de siembra en 500 ml de medio de producción (almidón soluble al 1 %, glicerina al 1 %, glucosa al 0,5 %, peptona de soja HySoy al 1 %, licor de maíz fermentado al 0,5 %, sulfato de amonio al 0,2 %, sulfato de magnesio al 0,006 %, 6H<sub>2</sub>O CaCO<sub>3</sub> al 0,2 %, pH 7,0) por matraz Fernbach de 2,8 l sin deflectores al 2,5 % (v/v). Se incubó la fermentación a 25 °C con agitación a 200 rpm durante 72 horas.

15 *Etapa 2.* Extracción del caldo de fermentación: Al final de la fermentación de la etapa 1 del ejemplo se añadieron 1,50 g/l de resina DIAION HP-20 húmeda al sobrenadante de la fermentación de producción y la mezcla se agitó a 100 rpm durante 30 minutos. La HP-20 se recogió mediante centrifugación y a continuación se extrajo con acetato de etilo a temperatura ambiente. Con más detalle, se llevó a cabo una fermentación de 13 l de FERM BP-3421 a 25 °C durante 72 horas de acuerdo con la etapa 1 del Ejemplo 1. Se centrifugó el caldo completo a 3800 rpm durante 30 minutos. Se descartaron las células y se mezcló el sobrenadante con una resina HP20 húmeda prelavada (260 g de peso seco). La suspensión resultante se agitó en un agitador a temperatura ambiente durante 1 hora. Se extrajo la resina HP20 unida al compuesto dos veces con acetato de etilo (1 l cada vez) y se filtró la solución de acetato de etilo sobre Celite seguido por evaporación a presión reducida para dar como resultado un extracto bruto de color claro (2,4 g).

20 *Etapa 3:* Aislamiento y Caracterización de ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º **NP1**); ácido [(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º **NP2**): El extracto en bruto de la etapa 2 del ejemplo 1 se disolvió en una mezcla de acetonitrilo/dimetilsulfóxido 1:1 (14 ml en total). La solución viscosa se filtró y después se purificó por HPLC preparativa: (Columna: Waters C18 DELTA PAK (WAT011801), 300 X 50 mm, 15 µm, 100 Å; Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % (p) en 1:1 de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O; Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % (v/v) en 3:1 de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O y fase móvil C: ácido acético al 0,02 % (v/v) en acetonitrilo. Gradiente: A al 100 % durante 5 min, A al 0 % a B al 100 % durante 18 min y B a la 100 % a C al 100 % durante 2 min, y C al 100 % durante 2 min. Caudal: 50 ml/min.). Las fracciones con tiempos de retención de 13,5 y 18,0 min se recogieron y liofilizaron para proporcionar n.º **NP1** (172,5 mg) y n.º **NP2** (227,2 mg), respectivamente, como polvos de color blanco. Las fracciones con tiempos de retenciones de 14,8 minutos y 20,5 minutos también se recogieron y se secaron por congelación para producir dos polvos de color grisáceos semi-purificados I y II.

25 n.º **NP1**: HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,36 minutos (pureza del 92,5 %); HRESIMS (protocolo O) *m/z* 536,2837 [M+H]<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 12,20 (s a, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,80 (d, *J* = 7,9, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,35 (dc, *J* = 6,0, 6,0, 1H), 6,32 (d a, *J* = 15,6, 1H), 6,10 (d, *J* = 11,2, 1H), 5,85 (dd, *J* = 11,8, 7,4, 1H), 5,58 (dd, *J* = 15,5, 5,8, 1H), 5,49 (dd a, *J* = 7,0, 7,0, 1H), 4,24 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,49 (ddd, *J* = 5,5, 5,5, 2,5, 1H), 3,24 (d, *J* = 6,0, 1H), 2,74 (d, *J* = 3,5, 1H), 2,57 (d, *J* = 3,5, 1H), 2,55 (dd, *J* = 16,4, 8,5, 1H), 2,46 (m, 1H), 2,28 (m, 1H), 2,18 (m, 1H), 1,97 (s, 3H), 1,82 (m, 1H), 1,79 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,56 (m), 1,23 (d, *J* = 6,4, 3H), 1,06 (d, *J* = 6,5, 3H), 0,93 (d, *J* = 7,0, 3H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 172,15, 169,66, 164,55, 142,76, 136,22, 133,88, 128,84, 123,73, 122,83, 79,90, 76,93, 74,88, 70,35, 68,10, 67,93, 57,36, 49,63, 46,39, 39,09, 35,21, 33,91, 31,71, 28,67, 21,02, 19,96, 17,79, 14,22, 12,41.

30 n.º **NP2**: HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,93 minutos (pureza del 90,4 %); HRESIMS (Protocolo O) *m/z* 520,2895 [M+H]<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 12,13 (s a, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,80 (d, *J* = 7,9, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,35 (dc, *J* = 6,0, 6,0, 1H), 6,27 (d a, *J* = 15,8, 1H), 6,10 (d, *J* = 11,2, 1H), 5,85 (dd, *J* = 11,8, 7,3, 1H), 5,57 (dd, *J* = 15,6, 5,8, 1H), 5,50 (dd a, *J* = 7,0, 7,0, 1H), 4,50 (ddd, *J* = 5,5, 5,5, 5,5, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,63 (m, 2H), 3,48 (m, 1H), 2,61 (s, 2H), 2,58 (dd, *J* = 16,0, 8,5, 1H), 2,49 (m,



1H), 2,28 (m, 1H), 2,18 (m, 1H), 1,96 (s, 3H), 1,79 (m, 2H), 1,76 (m, 1H), 1,68 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,63 (m, 1H), 1,40 (dd,  $J = 11,5, 7,2$ , 1H), 1,24 (d,  $J = 6,4$ , 3H), 1,06 (d,  $J = 6,4$ , 3H), 0,94 (d,  $J = 7,0$ , 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) 172,88, 169,64, 164,56, 142,75, 135,37, 133,74, 128,99, 126,57, 122,84, 79,97, 74,90, 70,36, 68,16, 68,11, 54,71, 52,25, 46,40, 39,08, 37,22, 36,46, 35,23, 31,72, 28,71,21,01, 19,95, 17,78, 14,23, 12,40.

**Etapa 4:** Aislamiento de ácido [(2S,5S,6R)-6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-5-hidroxi-4-metilidenotetrahidro-2H-piran-2-il]acético (n.º **NP3**).

El polvo semipurificado I aislado en la etapa 2 del ejemplo 1 se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa (Columna: YMC-Pack-ODS-A, 250 X 30 mm, S-10  $\mu\text{m}$ , 12 nm: Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua; Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo: Sistema de gradiente: B del 30 % al 100 % durante 23 min y se mantuvo B al 100 % durante 1 min. Caudal: . 20 ml/min) para proporcionar n.º **NP3** (7,6 mg.) en forma de un polvo de color blanco.

n.º **NP3:** HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,9 minutos (pureza del 94,2 %); HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  520,2910 [M+H] $^+$ ; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,76 (d,  $J = 7,9$ , 1H, D $_2$ O intercambiable), 6,35 (dc,  $J = 6,4, 6,4$ , 1H), 6,22 (d a,  $J = 15,8$ , 1H), 6,10 (d,  $J = 11,0$ , 1H), 5,85 (dd,  $J = 11,8, 7,4$ , 1H), 5,57 (dd,  $J = 15,5, 5,8$ , 1H), 5,48 (dd a,  $J = 7,0, 7,0$ , 1H), 5,04 (s a, 1H), 4,80 (s a, 1H), 4,18 (m, 1H), 3,88 (dd,  $J = 5,8, 5,8$ , 1H), 3,63 (m, 2H), 3,49 (ddd,  $J = 6,0, 6,0, 2,5$ , 1H), 2,37 (m, 2H), 2,33 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,23 (m, 1H), 2,17 (m, 1H), 1,97 (s, 3H), 1,79 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,24 (d,  $J = 6,4, 3H$ ), 1,06 (d,  $J = 6,5, 3H$ ), 0,94 (d,  $J = 7,0, 3H$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172,35, 169,57, 164,50, 144,64, 142,64, 136,08, 133,77, 128,74, 125,24, 122,81, 108,88, 79,95, 76,97, 74,84, 72,37, 69,47, 68,02, 46,34, 38,09, 36,97, 35,17, 31,67, 28,70, 20,95, 19,91,17,72, 14,20, 12,34.

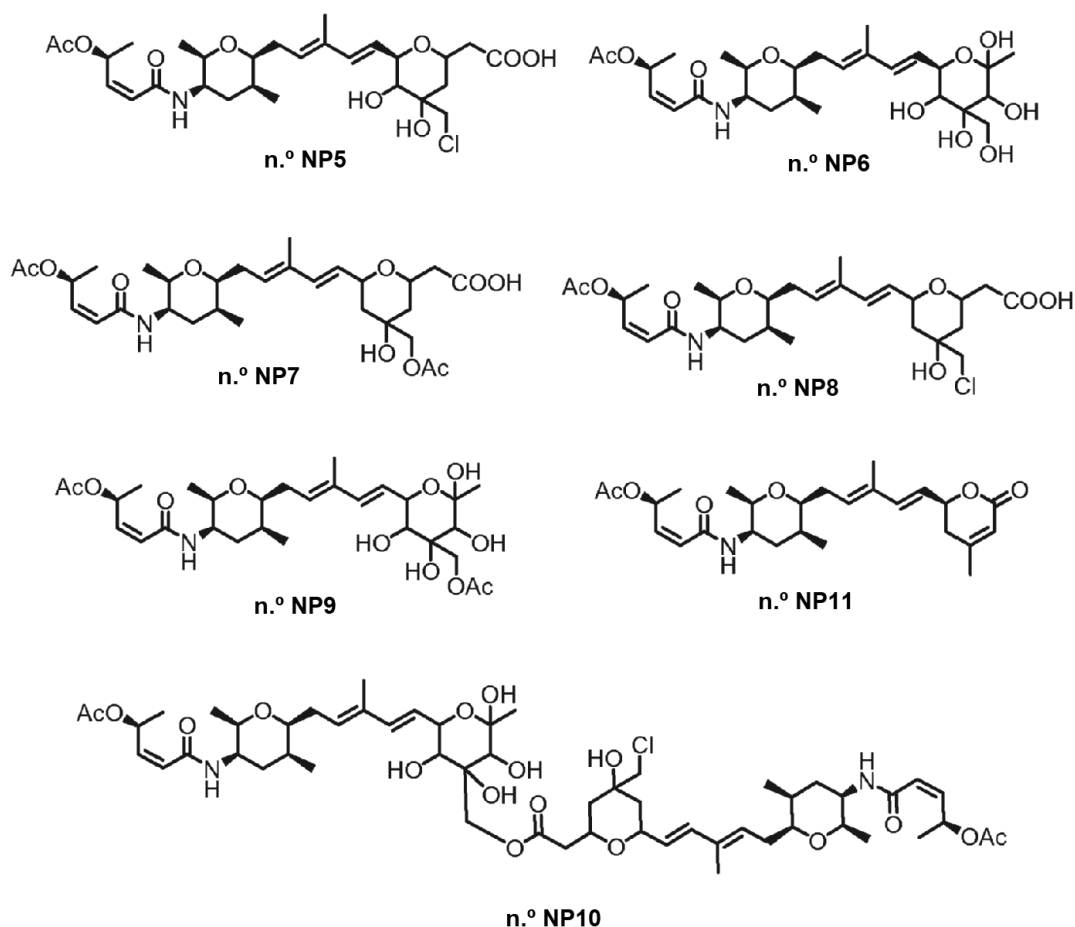
**Etapa 5:** Aislamiento de ácido [(2S,6S)-6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-metilidenotetrahidro-2H-piran-2-il]acético (n.º **NP4**).

El polvo semipurificado II aislado en la etapa 2 del ejemplo 1 se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa (Columna: YMC-Pack-ODS-A, 250 X 30 mm, S-10  $\mu\text{m}$ , 12 nm: Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua; Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo: Sistema de gradiente: B del 30 % al 100 % durante 23 min y se mantuvo B al 100 % durante 1 min. Caudal: . 20 ml/min) para proporcionar n.º **NP4** (12,2 mg) en forma de un polvo de color blanco.

n.º **NP4:** HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 12,7 minutos (pureza del 96,5 %); HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  504,2959 [M+H] $^+$ . RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,75 (d,  $J = 7,9$ , 1H, D $_2$ O intercambiable), 6,37 (dc,  $J = 7,5, 6,4$ , 1H), 6,23 (d a,  $J = 16,0$ , 1H), 6,10 (d,  $J = 11,8$ , 1H), 5,85 (dd,  $J = 11,8, 7,5$ , 1H), 5,53 (dd,  $J = 16,0, 5,6$ , 1H), 5,51 (dd,  $J = 6,5, 6,5$ , 1H), 4,80 (s a, 1H), 4,76 (s a, 1H), 4,32 (ddd,  $J = 5,6, 5,5, 5,5$ , 1H), 4,13 (m, 1H), 3,63 (m, 2H), 3,49 (ddd,  $J = 6,0, 6,0, 2,5$ , 1H), 2,38 (m, 2H), 2,36 (dd,  $J = 11,5, 5,0$ , 1H), 2,32 (m, 1H), 2,29 (m, 1H), 2,18 (dd a,  $J = 11,9, 6,5$ , 1H), 2,13 (dd,  $J = 11,5, 5,9$ , 1H), 2,00 (dd,  $J = 10,5, 7,0$ , 1H), 1,97 (s, 3H), 1,79 (m, 2H), 1,67 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,24 (d,  $J = 6,4, 3H$ ), 1,05 (d,  $J = 6,3, 3H$ ), 0,94 (d,  $J = 7,0, 3H$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172,11, 169,61, 164,54, 142,69, 141,40, 135,72, 133,71,129,01, 126,48, 122,83, 110,53, 79,94, 74,86, 71,99, 68,76, 68,06, 46,37, 38,97, 38,92, 38,70, 35,19, 31,70, 28,71,20,97, 19,92, 17,74, 14,21, 12,36.

## Ejemplo 2

**Fermentación, extracción y aislamiento de análogos de producto natural:** (5R)-5-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-1-(carboximetil)-3-C-(clorometil)-2-deoxipentitol(n.º **NP5**); (6R)-6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]aminol-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-deoxi-4-C-(hidroximetil)hex-2-ulopiranososa (n.º **NP6**); ácido (4-[(acetiloxi)metil]-6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-hidroxitetrahidro-2H-piran-2-il)acético (n.º **NP7**); ácido [6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-(clorometil)-4-hidroxitetrahidro-2H-piran-2-il]acético (n.º **NP8**); 4-C-[(acetiloxi)metil]-6-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-1[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-deoxihex-2-ulopiranososa (n.º **NP9**); 6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-1[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-C-[(6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-(clorometil)-4-hidroxitetrahidro-2H-piran-2-il]acetil)oxi)metil]-1-deoxihex-2-ulopiranososa (n.º **NP10**); acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-((2E,4E)-3-metil-5-[(2S)-4-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il]penta-2,4-dien-1-il)tetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **NP11**).



*Etapa 1:* Extracto sólido en bruto (3,7 g) preparado como en la etapa 2, el Ejemplo 1 se disolvió en metanol y se fraccionó en una columna Sephadex LH20 usando metanol, con eluyentes recogidos en intervalos de 15 minutos usando un recolector automático de fracciones durante un periodo de 15,0 horas (total de 65 fracciones recolectadas). La fracción 19 a partir de esto se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa (Columna: YMC-Pack-ODS-A, 250 x 30 mm, S-10  $\mu$ m, 12 nm; Fase móvil A: 0. acetato amónico al 2 % (P/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo; Gradiente: B al 30 % a B al 60 % durante 20 minutos, a B al 100 % durante 5 minutos y se mantuvo B al 100 % durante 4 minutos y B al 100 % a B al 30 % durante 2 minutos; Caudal: 20 ml/min.) para producir trece fracciones: Fracción A (4,3-6,4 min), B (10,8-11,9 min), C (12,5-13,5 min), D (13,5-14,6 min), E (15,0-16,1 min), F (16,5-17,8 min), G (19,0-19,8 min), H (19,8-21,0 min), I (21,8-23,0 min), J (23,3-25,4 min), J1 (25,4-26,2 min), K (27,9-28,5 min), L (28,7-29,5 min)

*Etapa 2:* Aislamiento de (5R)-5-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,5-anhidro-1-(carboximetil)-3-C-(clorometil)-2-deoxipentitol (n.º **NP5**): (6R)-6-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1-deoxi-4-C-(hidroximetil)hex-2-ulopiranososa (n.º **NP6**); ácido (4-[(acetiloxi)metil]-6-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-4-hidroxitetrahydro-2H-piran-2-il)acético (n.º **NP7**) Fracción D de la etapa 1 del Ejemplo 2 se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa (Columna, Columna: C18-Phenomenex; Luna 10 $\mu$ M; 250 x 10 mm.; Fase móvil A: acetato de amonio al 0,2 % en agua (P/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo; Gradiente: B al 25 % a B al 35 % durante 5 minutos, a B al 45 % durante 17 minutos, a B al 70 % durante 2 minutos; Caudal: 2,5 ml/minuto) y fracciones que eluían a los 13, 14 y 15 minutos se recogieron y se secaron por congelación. La fracción que eluía a los 13 minutos produjo n.º **NP5**: Rendimiento: 1,0 mg: HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  572,2614 (M+H)<sup>+</sup>,  $m/z$  594,2438 (M+Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,80 (d,  $J$  = 8,0, 1H), 6,36 (m, 1H), 6,23 (d,  $J$  = 15,8, 1H), 6,11 (dd,  $J$  = 1,3, 11,7, 1H), 5,86 (dd,  $J$  = 7,5, 11,6, 1H), 5,63 (dd,  $J$  = 5,6, 15,8, 4H), 5,47 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 4,10 (dd,  $J$  = 5,6, 8,3, 1H), 3,64 (m, 2H), 3,62 (d,  $J$  = 10,6, 1H), 3,49 (m, 1H), 3,42 (d,  $J$  = 10,6, 1H), 3,16 (d,  $J$  = 8,3, 1H), 2,68 (m, 1H), 2,57 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,83 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,24 (d,  $J$  = 6,5, 3H), 1,06 (d,  $J$  = 6,3, 3H), 0,95 (d,  $J$  = 7,3, 2H). RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  173,3, 170,1, 165,0, 143,1, 135,6, 134,4, 128,5, 126,8, 123,2, 80,2, 75,1, 71,7, 71,3, 70,0, 68,6, 68,2, 50,4, 46,6, 39,9, 35,2, 35,0, 31,9, 29,0, 21,0, 20,1, 17,9, 14,4, 12,5.

Etapa 3: Aislamiento de 6R)-6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-deoxi-4-C-(hidroximetil)hex-2-ulopiranososa (n.º **NP6**): la fracción recogida en el tiempo de retención 14,0 minutos anterior de la etapa 2 del Ejemplo 2 se purificó adicionalmente usando HPLC de fase inversa (Columna: Chromolith: RP 18e, 100-10 mm. Fase móvil A: acetato de amonio al 0,2 % en agua (P/V); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo; Gradiente: B al 25 % a B al 33 % durante 20 minutos; caudal: 2,5 ml/min) para proporcionar n.º **NP6**: Rendimiento de 4,0 mg, HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  542,2948 (M+H)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,77 (d,  $J$  = 8,0, 1H), 6,32 (m, 1H), 6,17 (d,  $J$  = 15,8, 1H), 6,05 (dd,  $J$  = 1,3, 11,6, 1H), 5,82 (dd,  $J$  = 7,5, 11,6, 1H), 5,57 (dd,  $J$  = 5,9, 15,8, 1H), 5,42 (m, 1H), 4,09 (m, 1H), 3,60 (m, 2H), 3,46 (m, 1H), 3,38 (d,  $J$  = 10,1, 1H), 3,28 (d,  $J$  = 10,1, 1H), 3,21 (s a, 1H), 3,17 (s a, 1H), 2,25 (m, 1H), 2,16 (m, 1H), 1,94 (s, 1H), 1,76 (m, 2H), 1,66 (s, 3H), 1,62 (m, 1H), 1,21 (d,  $J$  = 6,3, 3H), 1,17 (d,  $J$  = 8,5, 3H), 1,02 (d,  $J$  = 6,3, 3H), 0,91 (d,  $J$  = 7,3, 3H). RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  174,1, 165,2, 143,5, 135,9, 134,6, 128,9, 127,4, 123,6, 98,8, 80,0, 77,3, 75,5, 69,7, 69,4, 69,2, 68,8, 59,6, 47,0, 35,8, 32,6, 29,5, 26,5, 21,7, 20,7, 18,5, 14,9, 13,1.

Etapa 4: Aislamiento de ácido (4-[(acetiloxi)metil]-6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-hidroxitetrahidro-2H-piran-2-il)acético (n.º **NP7**): la fracción recogida en el tiempo de retención 15,0 minutos anterior de la etapa 2 del Ejemplo 2 se purificó adicionalmente usando HPLC de fase inversa (YMC-Pack-ODS-A; 250 X 10 mm, S-5  $\mu$ m, 12 nm. Fase móvil A: acetato de amonio al 0,2 % en agua (P/V); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo; Gradiente: B al 30 % a B al 50 % durante 20 minutos, a B al 95 % durante 5 minutos; Caudal: 2,5 ml/min) para producir n.º **NP7**: HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  580,3112 (M+H)<sup>+</sup>,  $m/z$  602,2928 (M+Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,80 (d,  $J$  = 8,0, 1H), 6,36 (m, 1H), 6,19 (d,  $J$  = 15,8, 1H), 6,11 (d,  $J$  = 11,6, 1H), 5,87 (dd,  $J$  = 7,5, 11,6, 1H), 5,49 (m, 1H), 5,48 (m, 1H), 4,41 (dd,  $J$  = 7,2, 12,8, 1H), 4,28 (d,  $J$  = 5,8, 1H), 3,79 (m, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,49 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 2,29 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 2,02 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,67 (s a, 3H), 1,68-1,65 (m a, 2H), 1,51 (m, 1H), 1,45 (m, 1H), 1,40 (m, 1H), 1,24 (d,  $J$  = 6,5, 3H), 1,06 (d,  $J$  = 6,3, 3H), 0,94 (d,  $J$  = 7,3, 3H). RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  173,4, 170,8, 170,1, 165,0, 143,2, 134,4, 134,2, 129,0, 128,9, 123,3, 80,3, 75,1,68,3, 68,2, 68,0, 66,3, 71,1,46,5, 39,4, 38,6, 35,4, 35,3, 31,8, 28,9, 21,1,20,8, 20,0, 17,9, 14,4, 12,5.

Etapa 5: Aislamiento de ácido [6-((1 E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-(clorometil)-4-hidroxitetrahidro-2H-piran-2-il]acético (n.º **NP8**), 4-C-[(acetiloxi)metil]-6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-deoxihex-2-ulopiranososa (n.º **NP9**), y 6-((1E, 3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-C-[[6-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-4-(clorometil)-4-hidroxitetrahidro-2H-piran-2-il]acetil]oxi)metil]-1-deoxihex-2-ulopiranososa (n.º **NP10**):

La fracción F de la etapa 1 del Ejemplo 2 se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa (C18-Phenomenex; Luna 250 x 10 mm. 10 $\mu$ M; Fase móvil A: acetato de amonio al 0,2 % en agua (P/V); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo; Gradiente: B al 40 % a B al 45 % durante 20 min, a B al 95 % durante 5 min; caudal: 2,5 ml/min; Las fracciones que eluían a 8, 13 y 28 minutos se recogieron y se secaron por congelación para dar:

n.º **NP8** (fracción que eluía a 8,0 min): Rendimiento: 1,0 mg; HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  556,2671 (M+H)<sup>+</sup>,  $m/z$  578,2489 (M+Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,80 (d,  $J$  = 8,0, 1H), 6,37 (m, 1 Hz), 6,21 (d,  $J$  = 15,9, 1H), 6,11 (dd,  $J$  = 1,3, 11,6, 1H), 5,87 (dd,  $J$  = 7,5, 11,6, 1H), 5,50 (m, 1H), 5,48 (m, 1H), 4,39 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,65 (m, 2H), 3,50 (m, 1H), 3,48 (s a, 2H), 2,91 (dd,  $J$  = 8,9, 15,0, 1H), 2,60 (dd,  $J$  = 6,0,15,0, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,73 (m, 1H), 1,69 (s a, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,55 (m, 1H), 1,43 (dd a,  $J$  = 13,1, 10,4, 1H), 1,25 (d,  $J$  = 6,5, 3H), 1,07 (d,  $J$  = 6,3, 3H), 0,95 (d,  $J$  = 7,3, 3H). RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  173,4, 170,1, 165,0, 143,2, 134,5, 134,2, 128,9 (x 2), 123,2, 80,2, 75,2, 68,7, 68,5, 68,2, 66,5, 54,6, 46,5, 39,9, 38,7, 35,6, 35,4, 31,9, 28,9, 21,1,20,1, 17,9, 14,4, 12,5.

n.º **NP9** (fracción que eluyó a los 13 minutos): Rendimiento: 1,0 mg; HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  584,3066 (M+H)<sup>+</sup>,  $m/z$  606,2887 (M+Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,80 (d,  $J$  = 7,9, 1H), 6,36 (m, 1H), 6,25 (d,  $J$  = 15,7, 1H), 6,11 (dd,  $J$  = 1,0, 11,6, 1H), 5,87 (dd,  $J$  = 7,5, 11,6, 1H), 5,63 (dd,  $J$  = 6,1, 15,8, 1H), 5,48 (m, 1H), 4,19 (dd,  $J$  = 6,1, 9,6, 1H), 3,97 (d,  $J$  = 10,0, 1H), 3,88 (d,  $J$  = 10,0, 1H), 3,65 (m, 2H), 3,50 (m, 1H), 3,17 (s a, 1H), 3,15 (s a, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,26 (d a,  $J$  = 1,6, 3H), 1,24 (s a, 3H), 1,06 (d,  $J$  = 6,2, 3H), 0,96 (d,  $J$  = 7,3, 3H). RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  170,4, 170,1, 165,0, 143,1, 136,1, 134,4, 128,9, 126,4, 123,2, 98,5, 80,4, 75,4, 75,2, 69,2 (x 2), 69,0, 68,2, 60,7, 46,5, 35,4, 31,9, 28,9, 25,9, 21,1 (x 2), 20,0,17,9,14,4,12,6.

n.º **NP10** (fracción que eluyó a los 23 minutos): Rendimiento: 1,0 mg, HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  562,2582 (M+2Na)<sup>2+</sup>,  $m/z$  1101,5263 (M+Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,79 (d,  $J$  = 7,9, 2H), 6,37 (m, 2H), 6,27 (d,  $J$  = 16,2, 1H), 6,21 (d,  $J$  = 15,6, 1H), 6,12 (d,  $J$  = 11,6, 1H), 6,11 (d,  $J$  =

- 15,3, 1H), 5,88 (dd,  $J = 7,5, 11,6$ , 2H), 5,64 (dd,  $J = 6,2, 15,8$ , 1H), 5,54-5,48 (m, 3H), 4,40-4,31 (m, 2 H), 4,20 (dd,  $J = 6,2, 9,4$ , 1H), 4,04 (m, 1H), 3,90 (d,  $J = 10,0$  Hz, 1H), 3,69-3,62 (m, 4H), 3,54-3,47 (m, 4H), 3,21 - 3,13 (m, 2H), 3,06 (dd,  $J = 8,7, 15,6$ , 1H), 2,73 (dd,  $J = 5,3, 15,7$ , 1H), 2,31 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 1,99 (s, 6H), 1,84-1,79 (m, 5H), 1,72 (s, 3H), 1,69 (s, 3H), 1,68-1,64 (m, 2 H), 1,62 (m, 1H), 1,55 (d,  $J = 13,8$  Hz, 1H), 1,44 (m, 1H), 1,27 (s a, 3H), 1,26 (s a, 6H), 1,08 (m, 6H), 0,96 (m, 6H). RMN  $^{13}\text{C}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171,3, 170,0 (x 2), 165,0 (x 2), 143,2 (x 2), 136,5, 134,6, 134,7, 134,4, 128,9 (x 3), 126,6, 123,3 (x 2), 98,4, 80,5 (x 2), 75,4, 75,5 (x 2), 69,5 (x 2), 69,2, 68,6, 68,5 (x 3), 66,5, 60,7, 54,8, 46,9 (x 2), 40,0, 38,5, 35,9, 35,7 (x 2), 32,3 (x 2), 29,3, 29,2, 26,2, 21,5 (x 2), 20,4 (x 2), 18,2 (x 2), 14,7 (x 2), 12,9 (x 2).
- 10 **Etapla 6:** Aislamiento de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-[(2S)-4-metil-6-oxo-3,6-dihidro-2H-piran-2-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo] (n.º **NP11**). La fracción K de la etapa 1 del Ejemplo 2 se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa (C18-Phenomenex; Luna 250 x 10 mm. 10uM; Phenomenex; Luna 250 x 10 mm. 10uM; Fase móvil A: acetato de amonio al 0,2 % en agua (P/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo; Gradiente: B al 40 a B al 95 % durante 15 min. caudal: 2,5 ml/min) para proporcionar n.º **NP11** Rendimiento: 2,0 mg. HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  460,2694 (M+H) $^+$ ,  $m/z$  482,2514 (M+Na) $^+$ ; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,82 (d,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 6,37 (m, 1H), 6,38 (m, 1H), 6,13 (dd,  $J = 1,2, 11,6$ , 1H), 5,88 (dd,  $J = 7,5, 11,6$ , 1H), 5,78 (s, 1H), 5,68 (dd,  $J = 6,7, 15,8$ , 1H), 5,62 (t,  $J = 7,0$ , 1H), 4,97 (m, 1H), 3,67 (m, 1H), 3,66 (m, 1H), 3,52 (m, 1H), 2,47 (m, 1H), 2,44 (m, 1H), 2,33 (m, 1H), 2,23 (m, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 1,82 (m, 2H), 1,74 (s, 3H), 1,67 (m, 1H), 1,26 (d,  $J = 6,5, 3\text{H}$ ), 1,08 (d,  $J = 6,3, 3\text{H}$ ), 0,97 (d,  $J = 7,1, 3\text{H}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170,1, 165,0, 164,4, 159,0, 143,1, 137,6, 133,9, 131,2, 124,4, 123,2, 115,6, 80,2, 75,2, 77,2, 68,0, 46,5, 35,3, 34,5, 32,1, 28,9, 22,3, 21,0, 20,1, 17,9, 14,3, 12,4.

### Ejemplo 3

#### Caracterización filogenética molecular de FERM BP-3421

- 25 Etapa 1: Se aisló ADN genómico de un cultivo puro de FERM BP-3421 y se amplificó mediante la PCR el gen del ARNr de 16S casi completo utilizando los cebadores 8FPL (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') (SEQ. ID NO. 1) y 1492RPL (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') (SEQ. ID NO. 2). Se purificaron los productos de la PCR con el kit DNA Clean and Concentrator™-25 (Zymo Research) y se secuenciaron directamente para proporcionar cobertura bicatenaria con los siguientes cebadores de ARNr de 16S: 8FPL, pC FWD (5'CTACGGGAGGCAGCAGTGGG3') (SEQ. ID NO. 3), pC REV (5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAG3') (SEQ. ID NO. 4), pD FWD (5'CAGCAGCCGCGTAATAC3') (SEQ. ID NO. 5), pD REV (5'GTATTACCGCGGCTGCTG3') (SEQ. ID NO. 6), pF FWD (5'CATGGCTGTGCTCAGCTCGT3') (SEQ. ID NO. 7), pF REV (5'ACGAGCTGACGACAGCCATG3') (SEQ. ID NO. 8) y 1492RPL. Se investigó la secuencia del ARNr de 16S completamente bicatenaria (SEQ ID NO:1) frente a una base de datos pública (National Center for Biotechnology Information) para determinar la afiliación taxonómica de FERM BP-3421 como una *Burkholderia* sp. Las secuencias del ARNr de 16 S de las cepas del tipo *Burkholderia* spp. más estrechamente relacionadas y la secuencia de *Burkholderia* sp. NRRL B50319 (cepa A396)(US20110207604A1 Asolkar y col., 2011), que comparte un 100 % de identidad con FERM BP-3421, se extrajeron del GenBank. Se llevó a cabo una alineación de secuencias múltiple usando ClustalX (versión 1.81) y se determinó la posición filogenética de FERM BP-3421 con respecto a la otra *Burkholderia* spp. con procedimientos de árboles de decisiones normalizados tales como TREECON (versión 1.3b).
- 40 FERM BP-3421 (SEQ. ID NO. 9)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAAC  
 GGCAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAA  
 CATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGATTAATACCGCATAACGATCTACG  
 GATGAAAGCGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTA  
 GTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCA  
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATTTT  
 GGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTG  
 TAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTTTGGGCTAATACCCCGGGGGGATGACGGTAC  
 CGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC GA  
 GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGACAGATGTGA  
 AATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGG  
 GGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGC  
 GAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTT  
 CCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAA  
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGC  
 AACGCGAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCCGAATCCTGAAGAGATTCGGGAGTGC  
 TCGAAAGAGAACCGATACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT  
 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTA  
 AGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC  
 TTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAG  
 GGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCAT  
 GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT  
 TGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCG  
 CAAGGAGGACGGTCAACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAC  
 C

La Figura 1 ilustra la relación filogenética determinada con secuencias de ARNr de 16S casi completas de FERM BP-3421 para otra *Burkholderia* spp. El árbol filogenético de unión al adyacente estaba enraizado con *Burkholderia pickettii* y muestra los valores de arranque (basándose en 100 y más del 50 %) en sus respectivos nodulos. La barra de escala representa 0,02 sustituciones por nucleótido.

#### Ejemplo 4

**Fermentación, Extracción y aislamiento de:** Ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º PN1); y ácido [(3S,5S,7S)-7-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º PN2) con la cepa n.º 1 diseñada mediante ingeniería genética de FERM BP-3421

*Etapa 1:* Extracción del genoma del clúster del gen biosintético de ayustoestatina:

El genoma de FERM BP-3421 se secuenció utilizando tecnologías muy avanzadas (454 e Illumina). El clúster del gen biosintético de las ayustoestatinas (Figura 2) se infirió a partir de la secuencia de ADN mediante la extracción del genoma (para una revisión véase Challis GL 2008 J Med Chem 51: 2618-2628) que condujo a los inventores a identificar una ruta híbrida de transaciltransferasa (AT) policétido sintasa (PKS)/péptido sintetasa no ribosómica (NRPS) (para una revisión véase J Piel 2010 Nat Prod Rep 27:996-1047 y las referencias del anterior). Los mutantes inactivados genéticamente de los genes PKS y NRPS no mostraron producción

detectable de ayustoestatina, confirmando la implicación de estos genes en la biosíntesis de ayustoestatina. Los hallazgos de los inventores concuerdan con los notificados por Zhang F y col. (2011 J Am Chem Soc 133: 2452-62) y la terminología de los genes introducida en este artículo JACS se usa posteriormente.

La Figura 2 es un clúster de genes biosintéticos de las ayustoestatinas y la ruta biosintética propuesta resaltando las etapas de hidroxilación catalizadas por el citocromo P450 Fr9R y la dioxigenasa Fr9P dependiente de Fe(II)/ $\alpha$ -cetoglutarato. Las flechas de la parte superior representan las secuencias de ADN codificantes de los genes PKS-NRPS; no se muestran los genes auxiliares.

**Etapa 2:** Generación de la cepa mutante inactivada genéticamente para la dioxigenasa (*fr9P*) de FERM BP-3421 (Cepa n.º 1)

Se amplificaron dos fragmentos de ADN de ~700 pb de longitud en la dirección 5' y la dirección 3' del punto de sustitución del gen mediante la PCR (Pfu Ultra™ Polymerase, Promega) usando el ADN genómico de FERM BP-3421 como plantilla y las parejas de cebadores P1 diox (TGG CGA ACA GAT CGA GTT TG) (SEQ. ID NO. 10) y P2\_diox (CTT GCG GAG AAC TGT GAA TGC GCA ATA GAA GCG CTG TCA TGG AAT G) (SEQ. ID NO. 11), y P3\_diox (CCG AAA AGT GCC ACC TGA CGT CTA AGA TAA CTC GTG GAT ATT CGG CAA G) (SEQ. ID NO. 12) y P4\_diox (AGA ATC CCG CGA TCC CAA C) (SEQ. ID NO. 13); las bases subrayadas representan las regiones de homología con el marcador de resistencia a la tetraciclina (*tet*). Se amplificó el marcador *tet* mediante la PCR utilizando pEX18Tc (Schweizer HP 1998 Gene 212:77-86) como plantilla y la pareja de cebadores Ptet\_f (TTG CGC ATT CAC AGT TCT C) (SEQ. ID NO. 14) y Ptet\_r (TCT TAG ACG TCA GGT GGC AC) (SEQ. ID NO. 15). Se ensamblaron los tres fragmentos mediante SOE-PCR (utilizando Pfu Ultra™ Polymerase, Promega) y se ligaron en el sitio SmaI de pEX100T (Schweizer HP & Hoang TT 1995 Gene 158:15-22) para generar el plásmido pAE-PF12. pAE-PF12 se transfirió en FERM BP-3421 mediante conjugación de *E. coli* S17.1. Se usó tetraciclina (25 µg/ml) para la selección de mutantes; sacarosa al 5 % para la contraselección de la estructura principal del vector; y gentamicina (10 µg/ml) para eliminar *E. coli* tras la conjugación. Se confirmaron los mutantes mediante la PCR de la colonia (RED Taq®, Sigma) en tres reacciones separadas utilizando las parejas de cebadores P1\_diox/P4\_diox, P1\_diox/Ptet\_r, y TP1\_pEX100T (GGA CGA ATC GAA CTC AGG AAC TTG) (SEQ. ID NO.16) / TP2\_pEX100T (CGA AGA GCG ATT GAG GAA AAG G) (SEQ. ID NO. 17), que proporciona la cepa n.º 1.

**Etapa3:** Fermentación utilizando la cepa n.º 1 diseñada mediante ingeniería genética: Se cultivó la cepa n.º 1 diseñada mediante ingeniería genética en medio de siembra (polipeptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl al 0,5 %) que contenía tetraciclina (25 mg/l) a 30 °C y 220 rpm durante ~24 horas. Se generó un segundo cultivo de siembra inoculando medio de siembra reciente que contenía tetraciclina (25 mg/l) con el primer cultivo de siembra al 10 % (v/v) y se incubó a 30 °C con agitación a 220 rpm durante ~24 horas. Se utilizaron 850 ml del cultivo de siembra para inocular 29 l de medio de producción (glicerina al 4 %, peptona de soja HySoy al 2 %, sulfato de amonio al 0,2 %, sulfato de magnesio al 0,01 %, 6H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub> al 0,2 %) contenido en un biorreactor de 30 l (BIOSTAT® C plus, Sartorius BBI Systems). Se llevó a cabo la fermentación a 25°C durante 5 días. Se ajustó la agitación inicial a 344 rpm; flujo de aire inicial a 1,3 slpm; Se controló la DO al 3 % con una agitación aumentada.

**Etapa 4.** Extracción del caldo de fermentación: Al final de la fermentación de la etapa 3 del ejemplo 4, se añadieron 1,5 kg de resina DIAION HP-20 húmeda al caldo completo y se agitó la mezcla durante la noche. La HP-20 se recogió por filtración mediante una malla de alambre de cuña de acero inoxidable de 50 µm-150 µm. El compuesto HP-20 unido a la resina se extrajo cuatro veces con acetato de etilo (3 l cada vez, con agitación durante 45 min). A continuación se lavó la resina (una vez con 2 l de metanol y 3 veces con agua DI abundante) y se reutilizó para recapturar el compuesto que permanecía todavía en el filtrado acuoso, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se eliminó el disolvente de los extractos de acetato de etilo combinados mediante evaporación a presión reducida para dar como resultado un polvo de color amarillo claro (137 g).

**Etapa 5:** Aislamiento de ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-yl]-3-metilpenta-1,3-dien-1-yl]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-yl]acético (n.º **PN1**); y ácido [(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-yl]-3-metilpenta-1,3-dien-1-yl]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-yl]acético (n.º **PN2**): 1,7 g extracto de la etapa 4 del Ejemplo 4 se disolvió en un disolvente mixto de 2:1 DMF/ACN (22 ml total), se filtró, y a continuación se purificó mediante HPLC en fase inversa (Waters ODS-A 50 x 300 mm, 15 µm, 120 Å, Fase móvil A: AcOH al 0,02 % en agua, Fase móvil B: AcOH al 0,02 % en un sistema disolvente de acetonitrilo, Gradiente: 50 % de B durante 2 min, al 75 % de B durante 18 min; 100 % de B durante 2 min. Caudal: 50 ml/min; 5 inyecciones repetidas). Se recogieron las fracciones con tiempos de retención de 13,5 y 18,0 min y se criodesecaron para dar como resultado el n.º NP1 (191 mg) y el n.º PN2 (466 mg) respectivamente como polvos de color blanco.

**n.º PN1.;** HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,38 minutos (pureza del 98,5 %)

**n.º PN2.;** HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,97 minutos (pureza del 96,5 %)

## Ejemplo 5

**Fermentación, Extracción y aislamiento de: Ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º PN1) con la cepa n.º 2 diseñada mediante ingeniería genética de FERM BP-3421**

*Etapa 1:* Generación de la cepa n.º 2 diseñada mediante ingeniería genética: En primer lugar, se substituyó el marcador *tet* en el vector mini-CTX1 (Hoang TT y col. 2000 Plasmid 43:59-72) por *neo* (resistencia a la kanamicina y neomicina) de pCR2.1 (Invitrogen) mediante la recombinación mediada por  $\lambda$ -Red (Datsenko KA & Wanner BL. 2000 Proc Natl Acad Sci USA 97:6640-5). Los cebadores utilizados fueron P1\_neo\_pCR2.1 (GTT GGT TTG CGC ATT CAC AGT TCT CCG CAA GAA TTG ATT GCA AGG GCT GCT AAA GGA AG) (SEQ. ID NO. 18) y P2\_neo\_tet\_CTX1\_pCR2.1 (TCT TCC GCT TCC TCG CTC ACT GAC TCG CTG CGC TCG GTC ACG GAA ATG TTG AAT ACT CAT ACT C) (SEQ. ID NO. 19); las secuencias subrayadas representan regiones de homología para la recombinación mediada por  $\lambda$ -Red. El vector obtenido se denominó pAE-PF24.

Se amplificó el sistema P<sub>BAD</sub>/araC inducible por arabinosa mediante la PCR (Phusion® Hot Start polymerase, Finnzymes) utilizando pKD46 como plantilla y la pareja de cebadores P1\_BADp\_f (GCT CTA GAC ATC GAT TTA TTA TGA CAA CTT GAC, sitio XbaI subrayado) (SEQ. ID NO. 20) y P2\_BADp\_r (CCC AAA AAA ACG GGT ATG G) (SEQ. ID NO. 21). Se amplificó el gen (incluyendo el presunto RBS pero no el promotor) que codifica el gen del citocromo P450 (*fr9R*) contenido en el clúster del gen biosintético de ayuostostatina mediante la PCR (Phusion® Hot Start polymerase, Finnzymes) utilizando el ADN genómico de FERM BP-3421 y la pareja de cebadores P3\_P450\_BAD\_f (CTA CTG TTT CTC CAT ACC CGT TTT TTT GGG GGG TTG TTG GTT TTT GAA ATT GC, la extensión para SOE-PCR subrayada) (SEQ. ID NO. 22) y P4\_P450\_r (ATG GTG AAG CTT AAG TCG ACA ACC GGC ATT CC, el sitio HindIII subrayado) (SEQ. ID NO. 23). Los dos fragmentos obtenidos de esta manera se ensamblaron mediante SOE-PCR (Phusion® Hot Start polymerase, Finnzymes) y se ligaron posteriormente en los sitios SpeI y HindIII de pAE-PF24, generando pAE-PF29. Se transfirió pAE-PF29 a la cepa n.º 1 diseñada mediante ingeniería genética mediante la conjugación de *E. coli* S17.1. Se utilizó kanamicina (500 µg/ml) para la selección de mutantes; y gentamicina (10 µg/ml) para eliminar *E. coli* tras la conjugación. Se confirmaron los mutantes mediante las reacciones de la PCR de dos colonias (RED Taq®, Sigma) usando los conjuntos de cebadores de TP1\_CTX1\_marcador (GCA TTC ACA GTT CTC CGC AAG) (SEQ. ID NO. 24) y TP2\_CTX1\_marcador (CTC GCT CAC TGA CTC GCT G) (SEQ. ID NO. 25), y T3\_mini-CTX1\_f (GCA ATT AAC CCT CAC TAA AGG) (SEQ. ID NO. 26) y MCS\_mini-CTX1\_r (CTA TAG GGC GAA TTG GGT AC) (SEQ. ID NO. 27), que proporcionan la cepa n.º 2 diseñada mediante ingeniería genética.

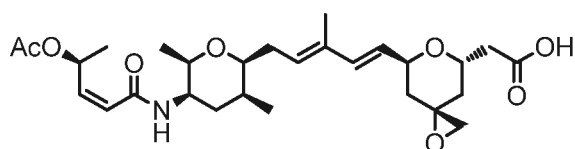
*Etapa 2:* Fermentación utilizando la cepa n.º 2 diseñada mediante ingeniería genética: Se cultivó la cepa n.º 2 diseñada mediante ingeniería genética en medio de siembra (polipeptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl al 0,5 %) que contenía tetraciclina (25 mg/l) a 30 °C y 220 rpm durante ~24 horas. Se generó un segundo cultivo de siembra inoculando medio de siembra reciente que contenía tetraciclina (25 mg/l) con el primer cultivo de siembra al 10 % (v/v) y se incubó a 30 °C con agitación a 220 rpm durante ~24 horas. Se utilizó el cultivo de siembra para inocular 550 ml de medio de producción (glicerina al 4 %, peptona de soja HySoy al 2 %, L-arabinosa al 1,5 %, sulfato de amonio al 0,2 %, sulfato de magnesio al 0,01 %, 6H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub> al 0,2 %) por matraz Fernbach de 2,8 l sin deflectores al 2,5 % (v/v). Se incubó la fermentación a 25 °C con agitación a 200 rpm durante 4 días.

*Etapa 3.* Extracción del caldo de fermentación: Al final de la fermentación de la etapa 2 del ejemplo 5, se añadieron 100 g/l de resina DIAION HP-20 húmeda a ~6 l de la fermentación de la producción y la mezcla se agitó durante 3 horas. La HP-20 se recogió por filtración mediante una malla de alambre de cuña de acero inoxidable de 50 µm-150 µm. El compuesto HP-20 unido a la resina se extrajo tres veces con acetato de etilo (2 l cada vez). Con más detalle, se llevó a cabo cada extracción transfiriendo la resina a una garrafa, añadiendo 2 l de acetato de etilo, agitando durante 1 hora y filtrando a través de una malla de alambre de cuña de acero inoxidable de 50 µm-150 µm. Se eliminó el disolvente de los extractos de acetato de etilo combinados mediante evaporación a presión reducida para dar como resultado un extracto bruto de color amarillo claro (17,25 g).

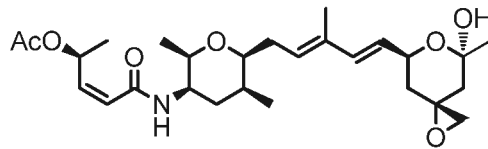
*Etapa 4:* Aislamiento del ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º PN1). Se disolvieron 0,12 g de extracto de la etapa 3 del Ejemplo 5 en un disolvente mixto de 2:1 DMF/ACN (22 ml total), se filtró, y a continuación se purificó mediante HPLC en fase inversa (YMC ODS-A 30 x 250 mm, 10 µm, 120 Å, Fase móvil A: AcOH al 0,02 % en agua, Fase móvil B: AcOH al 0,02 % en acetonitrilo. Gradiente: 30 % de B durante 2 min, al 100 % de B durante 18 min; 100 % de B durante 2 min. Caudal: 20 ml/min). Se recogió la fracción con tiempo de retención de 15,0 min y se criodesecó para dar como resultado el n.º NP1 (73,6 mg) respectivamente como polvos de color blanco.  
n.º PN1.; HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,36 minutos (pureza del 92,5 %)

## Ejemplo 6

5 **Fermentación, Extracción y aislamiento de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-hidroxi-7-metil-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º PN12); y ácido [(3S,5S,7S)-7-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-1[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º PN2) con la cepa n.º 3 diseñada mediante ingeniería genética de FERM BP-3421**



n.º NP2



n.º NP12

10 *Etapa 1:* Generación de la cepa n.º 3 diseñada mediante ingeniería genética: Se amplificaron dos fragmentos de ADN de ~700-pb de longitud en la dirección 5' y la dirección 3' del punto de sustitución del gen mediante la PCR (Pfu Ultra™ Polymerase, Promega) usando el ADN genómico de FERM BP-3421 como plantilla y las parejas de cebadores P1\_P450 (GCA TCC AAT CAC TTG AAC AGG) (SEQ ID NO. 28) y P2\_P450 (CTT GCG GAG AAC TGT GAA TGC GCAAGC CAT CAT TCT CGA CAT TTC C) (SEQ. ID NO. 29), y P3\_P450 (CCG AAA AGT GCC ACC TGA CGT CTA AGA AGA TTG TGA CGG TAC TGA AGC) (SEQ. ID NO. 30) y P4\_P450 (AGA GAA CGA TCG CTC CAC AG) (SEQ. ID NO. 31); las bases subrayadas representan las regiones de homología con el marcador de resistencia a la tetraciclina (tet). Se amplificó el marcador *tet* mediante la PCR utilizando pEX18Tc (Schweizer HP 1998 Gene 212:77-86) como plantilla y la pareja de cebadores Ptet\_f(TTG CGC ATT CAC AGT TCT C) (SEQ. ID NO. 32) y Ptet\_r (TCT TAG ACG TCA GGT GGC AC) (SEQ. ID NO. 33). Se ensamblaron los tres fragmentos mediante SOE-PCR (utilizando Pfu Ultra™ Polymerase, Promega) y se ligaron en el sitio SmaI de pEX100T (Schweizer HP & Hoang TT 1995 Gene 158:15-22) para generar el plásmido pAE-PF11. pAE-PF11 se transfirió en FERM BP-3421 mediante conjugación de *E. coli*/S17.1. Se usó tetraciclina (25 µg/ml) para la selección de mutantes; sacarosa al 5 % para la contraselección de la estructura principal del vector; y gentamicina (10 µg/ml) para eliminar *E. coli* tras la conjugación. Se confirmaron los mutantes en las reacciones de la PCR de dos colonias (RED Taq®, Sigma) utilizando las parejas de cebadores P1\_P450/Ptet\_r y TP1\_pEX100T (GGA CGA ATC GAA CTC AGG AAC TTG) (SEQ. ID NO. 34) / TP2\_pEX100T (CGA AGA GCG ATT GAG GAA AAG G) (SEQ. ID NO. 35), que proporciona la cepa n.º 3.

30 *Etapa 2:* Fermentación utilizando la cepa n.º 3 diseñada mediante ingeniería genética: Se cultivó la cepa n.º 3 diseñada mediante ingeniería genética en medio de siembra (polipeptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl al 0,5 %) que contenía tetraciclina (25 mg/l) a 30 °C y 220 rpm durante ~24 horas. Se generó un segundo cultivo de siembra inoculando medio de siembra reciente que contenía tetraciclina (25 mg/l) con el primer cultivo de siembra al 10 % (v/v) y se incubó a 30 °C con agitación a 220 rpm durante ~24 horas. Se utilizó el cultivo de siembra para inocular 400 ml de medio de producción (glicerina al 4 %, peptona de soja HySoy al 2 %, sulfato de amonio al 0,2 %, sulfato de magnesio al 0,01 %, 6H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub> al 0,2 %) al 2,5 % (v/v) contenido en un matraz Fernbach de 2,8 l sin deflectores. Se incubó la fermentación a 25 °C con agitación a 200 rpm durante 5 días.

35 *Etapa 3.* Extracción del caldo de fermentación: La producción del cultivo de la etapa 2 del ejemplo 6 se centrifugó durante 30 min a 4.200 rpm para eliminar las células. Se añadieron 50 g de resina DIAION HP-20 al sobrenadante (12,5 % p/v) y se agitó la mezcla a 200 rpm durante 1 h. Se recogió la HP-20 unida al compuesto mediante centrifugación y se extrajo a continuación dos veces con acetato de etilo (250 ml para cada extracción). Tras secar los extractos combinados con MgSO<sub>4</sub> (que se eliminó a continuación mediante filtración con papel Whatman), el disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida para dar como resultado un extracto bruto de color claro.

45 *Etapa 4:* Aislamiento del ácido [(3S,5S,7S)-7-1(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-1[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º PN2) y acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-hidroxi-7-metil-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º PN12): La mitad del extracto bruto procedente de la etapa 3 del Ejemplo 6 se purificó mediante HPLC preparativa, en fase normal: (Columna: Princeton SFC 2-etilpiridina, 250 x 21,2 mm, 5 µm; Fase móvil A: heptano; Fase móvil B: etanol (desnaturalizado). Gradiente: 5 % de B durante 1,5 min, al 100 % de B durante 8,5 min, 100 % de B durante 2 min, al 5 % de B durante 0,5 min y 5 % de B durante 2,5 min. Caudal: 27 ml/min). Se recogieron las fracciones con tiempos de retención de 6,58 min y 8,18 min y se criodesecaron para dar como resultado el n.º PN12 (163 mg, con una pureza del 89 % como un polvo de color amarillento muy claro) y el n.º PN2 (205 mg, con una pureza del 89 % mediante UV), respectivamente.

n.º PN12: HPLC (Protocolo P): tiempo de retención = 12,65 min (pureza del 89 %); CL/EM: m/z 474,2 [M+H+



H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup> y 514,2 [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>

n.º PN2: HPLC (Protocolo P): tiempo de retención = 12,46 min (pureza del 89 %); CL/EM: m/z 520,2 [M+H]<sup>+</sup>

5 Etapa 5: Aislamiento del acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-hidroxi-7-metil-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo  
 10 (n.º PN12): Se purificó una mitad de la fracción de 6,58 min de la etapa 4 del ejemplo 6 mediante HPLC en fase inversa: (Columna: Phenomenex Luna C18, 150 x 21,2 mm, 5 µm; Fase móvil A: agua; Fase móvil B: acetonitrilo. Gradiente: 20 % de B durante 1,5 min, al 70 % de B durante 8,5 min, al 100 % de B durante 2 min, al 20 % de B durante 0,5 min. Caudal: 27 ml/min). Se recogió la fracción con tiempo de retención de 8,25 min y se criodesecó para dar como resultado el n.º PN12 (28 mg) como un polvo de color blanco. n.º PN12.; HPLC (Protocolo N):  
 15 tiempo de retención = 12,6 min (pureza del 98,5 %); HRESIMS (protocolo O) m/z 492,296 [M+H]<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, J in Hz) δ 7,78 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,35 (m, 1H), 6,21 (d, J = 15,8, 1H), 6,11 (dd, J = 0,9, 11,7 Hz, 1H), 5,85 (dd, J = 11,6, 7,5 Hz, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,49 (m, 1H), 5,41 (d, J = 1,6 Hz, OH), 4,64 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,49 (m, 1H), 2,45 (m, 2H), 2,30 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,96 (m, 1H), 1,81 (m, 3H), 1,69 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,31 (s, 3H), 1,25 (m, 1H), 1,25 (d, J = 6,3 Hz, 3H), 1,14 (m, 1H), 1,07 (d, J = 6,5 Hz, 3H), 0,95 (d, J = 7,3 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 169,6, 164,6, 142,1, 134,1, 133,7, 128,2, 127,1, 122,6, 95,3, 79,5, 74,3, 67,6, 66,7, 54,5, 48,4, 46,1,41,4, 37,5, 35,0, 31,1,29,6, 28,5, 20,8, 19,5, 17,8, 13,9, 12,2.

### Ejemplo 7

20 **Fermentación, Extracción y establecimiento de producción de: ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético(n.º PN1); ácido [(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º PN2) utilizando *Burkholderia* sp. MSMB 43**

25 Etapa 1: Fermentación utilizando *Burkholderia* sp. MSMB 43: *Burkholderia* sp. (nombre propuesto "*Burkholderia humptydooensis*") Se adquirió MSMB 43 de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) y de la Menzies School of Health Research. Se cultivó MSMB 43 en placas de agar nutriente procedentes de crioconservación y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. El cultivo de crecimiento en agar se inoculó en un tubo de cultivo de 25 x 150 mm que contenía 10 ml de medio de siembra (polipeptona al 1 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl al 0,5 %). Se incubó el cultivo de siembra a 30 °C con agitación a 220 rpm durante 18-20  
 30 horas. Se inoculó el cultivo de siembra en 50 ml de medio de producción (almidón soluble al 1 %, glicerina al 1 %, glucosa al 0,5 %, peptona de soja HySoy al 1 %, licor de maíz fermentado al 0,5 %, sulfato de amonio al 0,2 %, sulfato de magnesio al 0,006 %. 6H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub> al 0,2 %, pH 7,0) por matraz Erlenmeyer de 250 ml al 2,5 % (volumen/volumen). Se incubaron las fermentaciones a 25 °C con agitación a 200 rpm durante 72 horas.

Etapa 2: Análisis CL-EM de las fermentaciones.

35 Se centrifugaron las fermentaciones para aglomerar las células, y se filtraron los sobrenadantes a través de membranas de fluoruro de polivinilideno de 0,22 µm. Se mezcló una porción de cada sobrenadante con dimetil sulfóxido (10:1) y se analizó mediante CL-EM utilizando un instrumento Acuity UPLC (Waters): Columna: XBridge C18, 4,6X150 mm, 3,5 µm de fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente del 5 % al 100 % de B durante 12,0 minutos; 100 % de B durante 3,0 minutos  
 40 (Inj. Volumen: 5,0 µl. En el día cinco de las fermentaciones, MSMB43 produjo NP1 y NP2 a un título de 150 mg/l y 50 mg/l respectivamente como fue evidente por el tiempo de retención y los datos de espectrometría de masas.

NP1: m/z: 535,9 (M+H)<sup>+</sup>, Tiempo de retención: 13,31 min.

NP2: m/z: 519,9 (M+H)<sup>+</sup> Tiempo de retención: 14,58 min

### Procedimientos experimentales sintéticos

45 Los experimentos se llevaron a cabo de forma general en una atmósfera inerte (nitrógeno o argón), especialmente en los casos en los que se emplearon reactivos o intermedios sensibles al oxígeno o a la humedad. Generalmente se usaron disolventes y reactivos comerciales sin purificación adicional, que incluyen disolventes anhidros en donde sea apropiado (generalmente productos Sure-Seal™ de la Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin). Los datos de la espectrometría de masas se obtuvieron bien con instrumentos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CLEM), o de ionización química a presión atmosférica (APCI). Los desplazamientos químicos en los  
 50 datos de resonancia magnética nuclear (RMN) se expresan en partes por millón (ppm, δ) referidos a los picos residuales de los disolventes deuterados utilizados.

55 Para las síntesis que hagan referencia a los procedimientos de otros Ejemplos o Procedimientos, el protocolo de reacción (longitud de la reacción y la temperatura) pueden variar. En general, se siguieron las reacciones por la cromatografía en capa fina, LCMS o HPLC, y se sometieron a elaboración cuando fue adecuado. Las purificaciones pueden variar entre experimentos: por lo general, los disolventes y las relaciones de disolventes utilizadas para los

eluyentes/gradientes se seleccionan para proporcionar tiempos de retención adecuados. Salvo que se especifique otra cosa, las fracciones de HPLC en fase inversa se concentraron mediante liofilización/criodesecación. Los compuestos intermedios y finales se almacenaron a (0 °C) a temperatura ambiente en viales o matraces cerrados con nitrógeno.

- 5 Se generaron los nombres de los compuestos con el software de ACD Labs.

#### Condiciones de HPLC utilizadas para el análisis

10 *Protocolo A<sup>A</sup> y A<sup>B</sup>*: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3,0 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5 % a 100 % de B (durante 10 minutos)<sup>A</sup> o (durante 20 minutos)<sup>B</sup>; Caudal: 0,75 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 215, 254 nm; Volumen de inyección 10 µl; Instrumento: HP 1100.

*Protocolo B*: Columna: Waters Sunfire C18, 50x 4.6 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,05 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,05 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5 % a 95 % de B durante 4 minutos, mantener al 95 % de durante 1 minuto. Caudal: 2,0 ml/min. temperatura: temperatura ambiente; Detección: DAD 215 nm; Volumen de inyección 4 µl; Instrumento: Espectrómetro de masas Waters LC y ZQ.

15 *Protocolo C*: Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3, C18, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5 % de B durante 0,1 minuto, 5 % a 95 % de B durante 2,5 minutos, 95 % de B durante 0,35 minutos; Caudal: 1,25 ml/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 200-450nm; EM (+) intervalo de 100-2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µl; Instrumento: Waters Acquity.

20 *Protocolo D*: Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3, C18, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5 % de B durante 0,1 minuto, 5 % a 95 % de B durante 1,5 minutos, 95 % de B durante 0,35 minutos; Caudal: 1,25 ml/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 200-450nm; EM (+) intervalo de 100-2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µl; Instrumento: Waters Acquity.

25 *Protocolo E*: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3,0 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: B del 0 % al 100 % durante 23,5 minutos; Caudal: 1,5 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 210 nm; Volumen de inyección: 10 µl; Instrumento: Agilent 1100 HPLC

30 *Protocolo F*: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3,0 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5 % de B durante 1,5 minutos, 5 % a 100 % de B durante 8,5 minutos, a continuación 100 % de B durante 1 minuto; Caudal: 0,75 ml/minuto. Temperatura: 45 °C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; EM (+) intervalo de 150-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 µl; Instrumento: Agilent 1200 LCMS.

35 *Protocolo G*: Columna: Atlantis dC18, 50 x 4,6 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,05 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,05 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5 % a 95 % de B durante 4,0 minutos, lineal; a continuación mantener 95 % de B durante 1 minuto. Caudal: 2 ml/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Detección: DAD 215 nm; EM (+) intervalo de 160 -1000 daltons; Volumen de inyección 4 µl; Instrumento: Waters 996 PDA.

40 *Protocolo H*: Columna: Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 3,0 mm, 5 µm; Fase móvil A: agua; Fase móvil B: acetonitrilo; Gradiente: 5 % de B durante 1,5 minutos, 5 % a 100 % de B durante 8,5 minutos, a continuación 100 % de B durante 1 minuto; Caudal: 0,75 ml/minuto. Temperatura: 25 °C; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; EM (+) intervalo de 150-2000 daltons; Volumen de inyección: 10 µl; Instrumento: Agilent 1200 LCMS.

45 *Protocolo I*: Columna: Xtimate C18, 2,1 x 30 mm, 3 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente de 0 % a 60 % de B durante 0,9 minutos, 60 % de B durante 0,6 minutos; 100 % de B durante 0,5 minutos; Caudal: 1,2 ml/minuto. Detección: DAD 220 nM; Temperatura: 25 °C; Volumen de inyección: 1 µl; Instrumento: Agilent

50 *Protocolo J*: Columna: Xtimate C18, 2,1 x 30 mm, 3 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 10 % a 80 % de B durante 0,9 minutos, 80 % de B durante 0,6 minutos; 100 % de B durante 0,5 minutos; Caudal: 1,2 ml/minuto. Detección: DAD 220 nM; Temperatura: 25 °C; Volumen de inyección: 1 µl; Instrumento: Agilent.

*Protocolo K*: Columna: Phenomenex Luna PFP, 100 x 3 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,05 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,05 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5 % a 95 % de B durante 9 minutos, mantener al 95 % de durante 1 minuto. Caudal: 1,0 ml/ min. Temperatura: temperatura ambiente; Detección: DAD 215 nm; Volumen de inyección: 4 µl; Instrumento: Espectrómetro de masas Waters LC y ZQ.

*Protocolo L:* Columna: Phenomenex Gemini-NX, C18, 4,6 mm x 50 mm, 110A, 3µm, Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente 5 %; a 100 % de B durante 0,0 - 4,10 min; mantener a 100 % de B de 4,10-4,50 min; Caudal: 1,25 ml/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 200-450nm; EM (+) intervalo de 100-2000 daltons; Volumen de inyección: 5 µl; Instrumento: Waters Acquity.

*Protocolo M:* Columna: Phenomenex Gemini-NX, 4,6 mm x 50 mm, C18, 3 µm, 110A; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 5 % a 100 % de B durante 4,10 minutos, mantener a 100 % de B durante 0,4 minutos, después B del 100 % al 5 % durante 0,5 minutos; Caudal: 1,5 ml/minuto. Temperatura: 60°C; Detección: HP1100 DAD (1315A), barrido de 200-450 nm; intervalo de 1 nm; EM IEN(+/-), barrido de 100-1200 m/z, tiempo de barrido 0,5 s, Centroid; Volumen de inyección: 5 µl; Instrumento: Bomba HPLC, detector DAD, Horno de columna de Agilent Technologies, Wilmington, DE; Automuestreador y detector de EM de Waters Corporation, Milford, MA; Detector ELS de Varian medical devices, Palo Alto, CA.

*Protocolo N:* Columna: YMC ODS-A, 4,6 x 150 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,01 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,01 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: B del 10 % al 100 % durante 15 minutos; Caudal: 1,0 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 230 nm; Volumen de inyección: 5 µl; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

*Protocolo O:* Se obtuvieron los espectros de masas de ionización por electropulverización de alta resolución (HRESIMS) utilizando un espectrómetro de masas APEXII FTICR de Bruker (Billerica, MA) equipado con un imán superconductor de 9,4 tesla con apantallamiento activo (Magnex Scientific Ltd., Reino Unido), una fuente APOLLO ESI externa de Bruker y un láser CW de CO<sub>2</sub> de 50W de Synrad. La muestra se inyectó por flujo en el espectrómetro de masas con un disolvente transportador consistente es 1:1 (v:v) de agua:acetonitrilo (ácido fórmico al 0,25 %) a un caudal de 50 µl/min. Se utilizó el software Xmass de Bruker para la adquisición y el análisis de datos. El espectro de masas se calibró externamente utilizando una mezcla de ajuste HP.

*Protocolo P:* Columna: YMC ODS-A, 4,6 x 150 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,01 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,01 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: B del 10 % al 100 % durante 19 minutos; Caudal: 1,0 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 230 nm; Volumen de inyección: 5 µl; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

*Protocolo Q:* Columna: Columna: Agilent Poroshell 300SB-C8, 75 x 2,1 mm, 2,6 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 20 % de B a 45 % de B durante 4 minutos; Caudal: 1,0 ml/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 220 nm; EM (+) intervalo de 400-2000Da; Volumen de inyección: 10 µl; Instrumento: Agilent 1100 LC, Waters MicromassZQ MS. Se llevó a cabo las deconvolución utilizando MaxEnt1.

#### Condiciones de HPLC utilizadas para la purificación

*Procedimiento A:* Columna: Phenomenex Gemini, C18, 30 x 100 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: variable, gradiente creciente de B en A durante 15-20 minutos; Caudal: 20 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 215 nm, 254 nm; Volumen de inyección: variable; Instrumento: Gilson.

*Procedimiento B\*:* Columna: YMC ODS-A, 30 x 250 mm, 10 µm; Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: variable, gradiente creciente de B en A durante 15-20 minutos; Caudal: 20 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 230 nm; Volumen de inyección: variable, 0,5-2 ml; Instrumento: HPLC preparativa ProStar Model 330 de Varian.

*Procedimiento C\*:* Columna: Phenomenex Luna C18(2), 150 x 21,2 mm, 5 µm; Fase móvil A: agua; Fase móvil B: acetonitrilo; Gradiente: variable, gradiente creciente de B en A durante 10 minutos; Caudal: 27 ml/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Detección: DAD 210-360 nm; EM (+) intervalo de 150-2000 daltons; Instrumento: CLEM Fraction Lynx de Waters.

*Procedimiento D\*:* Columna: Waters Sunfire, C18, 19x100 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,05 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,05 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: variable, gradiente creciente de B en A durante 10-20 minutos; Caudal: 25 ml/minuto. Detección: DAD 215 nm EM (+) intervalo de 160-1000 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx.

*Procedimiento E:* Columna: Waters Sunfire, C18, 19x100 mm, 5 µm; Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,05 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,05 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 10 a 50 % de B durante 8,5 minutos, 50 a 100 % de B durante 0,5 minutos, mantener a 100 % de B durante 1 minuto. Caudal: 25 ml/minuto. Detección: DAD 215 nm EM (+) intervalo de 160-1000 daltons; Instrumento: Waters FractionLynx.

*Procedimiento F\*:* Columna: Waters C18 DELTA PAK (WAT011801), 300 X 50 mm, 15 µm; Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: variable,

gradiente creciente de B en A durante 15-20 minutos; Caudal: 50 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 230 nm; Volumen de inyección: variable, 0,5-5 ml; Instrumento: HPLC preparativa ProStar Model 330 de Varian.

5 *Procedimiento G\**: Columna: YMC ODS-A, 50 x 300 mm, 12  $\mu$ m, 120 A. Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 40 % B durante 3 minutos, 40-100 % de B durante 20 minutos y 100 % de B durante 3 minutos. Caudal; 20 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 230 nm; Volumen de inyección: variable, 0,5-5 ml; Instrumento: HPLC preparativa ProStar Model 330 de Varian.

10 *Procedimiento H*: Columna: Cromolith RP-18e 100-10 mm. Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 20-55 % de B durante 30 minutos, 55-100 % de B durante 4 min, 100-20 % de B durante 2 min y 20 % de B durante 2 minutos. Caudal; 2,5 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 230 nm; Volumen de inyección: variable, 0,025-0,1 ml; Instrumento: Agilent 1100 analytical HPLC.

15 *Procedimiento I*: Columna: C18 semiprep YMC-Pack ODS-A 250x10 mm (S-5  $\mu$ m, 12 nm). Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 18-25 % de B durante 22 minutos, 25-95 % de B durante 1 min, 95 % de B durante 4 min, 95-18 % de B durante 1 min y 18 % de B durante 6 minutos. Caudal: 2,5 ml/minuto. Temperatura: no controlada. Detección: DAD 230 nm. Volumen de inyección: variable, 0,025-0,1 ml. Instrumento: Agilent 1200 analytical HPLC.

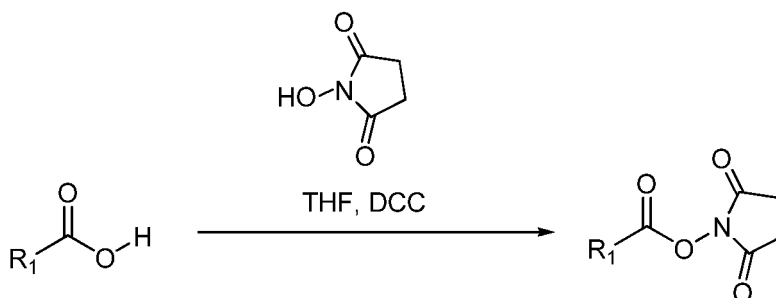
20 *Procedimiento J*: Columna: C18 semiprep YMC-Pack ODS-A 250x10 mm (S-5  $\mu$ m, 12 nm). Fase móvil A: ácido acético al 0,02 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: 20-30 % de B durante 30 minutos, 30-95 % de B durante 1 min, 95 % de B durante 4 min, 95-20 % de B durante 2 min y 20 % de B durante 6 minutos. Caudal: 2,5 ml/minuto. Temperatura: no controlada. Detección: DAD 230 nm. Volumen de inyección: variable, 0,025-0,1 ml. Instrumento: Agilent 1200 analytical HPLC.

25 *Procedimiento K*: Columna: Cromolith RP-18e 100-10 mm. Fase móvil A: agua (v/v); Fase móvil B: acetonitrilo (v/v); Gradiente: 30-65 % de B durante 20 minutos, 65-95 % de B durante 1 min, 95-30 % de B durante 2 min. Caudal; 2,5 ml/minuto. Temperatura: no controlada; Detección: DAD 230 nm; Volumen de inyección: variable, 0,025-0,1 ml; Instrumento: Agilent 1200 analytical HPLC.

30 En algunos casos, se realizaron algunas alteraciones menores en las condiciones de purificación de HPLC tales como, aunque no de forma limitativa, un cambio en el gradiente, la longitud del gradiente y el caudal que se indica por el símbolo \*

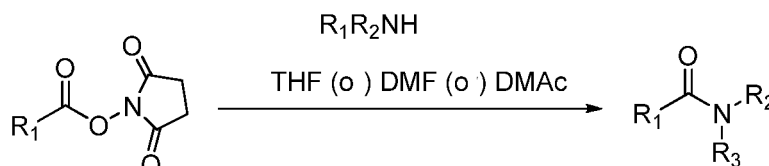
### Procedimientos generales

*Procedimiento general A*: Preparación de N-hidroxisuccinimida éster activado (NHS).



35 A una solución 0,1 M del ácido en tetrahidrofurano a 0 °C se le añadió *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (2,2 equiv.) Seguido de *N*-hidroxisuccinimida (2,2 equiv.) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó. El progreso de la reacción se controló por CL-EM (o HPLC o TLC); usualmente la reacción se completó dentro de 1-72 horas. Los disolventes se retiraron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa para proporcionar el *N*-hidroxisuccinimida éster deseado.

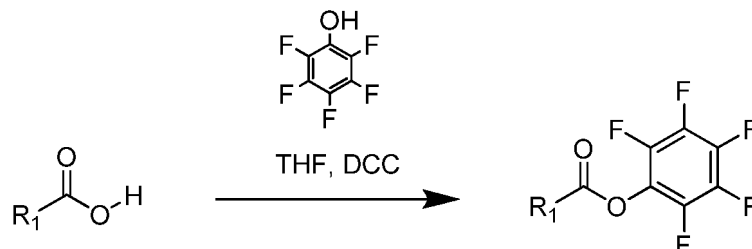
*Procedimiento general B*: Preparación de amidas de ésteres NHS.



40

A (0,1M) del *N*-hidroxisuccinimida éster (1 equiv.) en tetrahidrofurano, *N,N*-dimetilformamida o *N,N*-dimetilacetamida a 0 °C se le añadió la amina (1 a 10 equiv.). El progreso de la reacción se controló por CL-EM (o HPLC o TLC); usualmente la reacción se completó dentro de 1-72 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa para dar el producto de amida deseado.

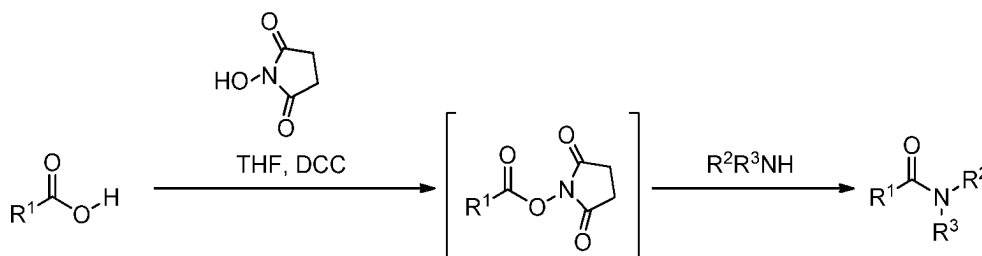
5 **Procedimiento general C:** Preparación de éster pentafluorofenilo (PFP)



10 A una solución 0,05 M del ácido en tetrahidrofurano a 0 °C se le añadió DCC (1 equiv.) seguido de una solución de pentafluorofenol (2 a 4 equiv.) disuelta en tetrahidrofurano (0,3 M). La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó. El progreso de la reacción se controló por CL-EM (o HPLC o TLC); usualmente la reacción se completó dentro de 1-48 horas. La reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa para proporcionar el éster pentafluorofenilo (PFP) deseado.

15 **Procedimiento general D:** Protocolo de biblioteca para la preparación de amidas a partir del éster NHS. La amina (1 equiv.) se disolvió en tetrahidrofurano (1 ml, 0,04 M) y se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (5 equiv.) seguido de metanol (0,2 ml). Después, se añadió gota a gota la solución entera a una solución enfriada (0 °C) de la *N*-hidroxisuccinimida éster (1 equiv.) disuelta en tetrahidrofurano (1 ml, 0,04 M). La reacción se agitó a (0 °C) durante 30 minutos y después se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó hasta 72 horas. El progreso de la reacción se controló por CL-EM (o HPLC o TLC); usualmente la reacción se completó dentro de 1-72 horas. Los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa y las fracciones que pertenecían al producto deseado se combinaron y se liofilizaron para dar las amidas diana.

20 **Procedimiento general E:** Preparación de amidas a través de la formación *in situ* de ésteres NHS.



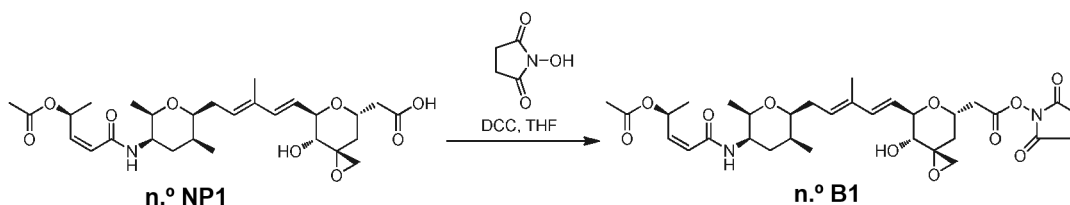
25 A una solución (0,08 M) del ácido (1 equiv.) (0 °C o temperatura ambiente) en tetrahidrofurano o *N,N*-dimetilformamida o *N,N*-dimetilacetamida se le añadió DCC (2,2 equiv.) seguido de *N*-hidroxisuccinimida (2,2 equiv.) y la reacción se agitó ya sea a 0 °C o se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó hasta un análisis por CL/EM indicó que la mayoría del ácido de partida se había consumido. La mezcla de reacción se volvió a enfriar a 0 °C y se añadió la amina (1 a 20 equiv.), se calentó a temperatura ambiente y se agitó. El progreso de la reacción se controló por CL-EM (o HPLC o TLC); usualmente la reacción se completó dentro de 1-72 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa para dar la amina deseada.

30 **Procedimiento general F:** Preparación de amidas de ésteres NHS. Una mezcla de amina (o sal de aminoácido) (1,0 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (5 equiv.) en metanol (0,2 ml) se agitó durante 15 minutos y la solución resultante se transfirió a una solución del éster NHS (1,0 equiv.) en tetrahidrofurano (1,0 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente con adición de más amina (1-3 equiv.) hasta que el análisis por CL/EM indicó que la mayoría del material de partida éster NHS se había consumido. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa para dar el producto de amida deseado.

35

## Ejemplo A1

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo n.º B1.



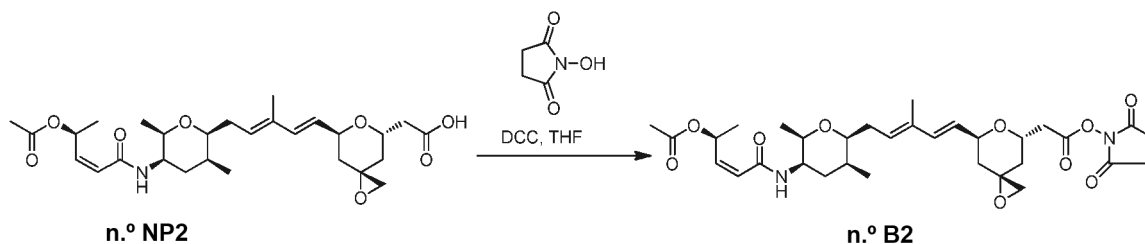
5

*Etapa 1.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo n.º B1. A una solución enfriada (0 °C) de n.º NP1 (103 mg, 0,192 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (2 ml, 0,096 M) se le añadió DCC (87,1 mg, 0,422 mmol, 2,2 equiv.) y la reacción se agitó durante 15 minutos. Se añadió *N*-hidroxisuccinimida (48,6 mg, 0,422 mmol, 2,2 equiv.) y la reacción se agitó a (0 °C) durante 15 minutos, se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 72 horas. La reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía C18 de fase inversa a presión media (Gradiente: agua del 5 % al 90 % en acetonitrilo con ácido acético al 0,02 % en cada fase). Las fracciones que pertenecían al producto deseado se liofilizaron para dar n.º B1 en forma de un sólido. Rendimiento: 66,6 mg, 0,103 mmol, 54 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 8,170 minutos (pureza del 91 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 633,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,81 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 7,78 (d, J = 8,02 Hz, 1 H) 6,37 - 6,30 (m, 2 H) 6,09 (m, 1 H) 5,85 (dd, J = 11,54, 7,43 Hz, 1 H) 5,59 (dd, J = 16,04, 5,28 Hz, 1 H) 5,50 (t, J = 7,04 Hz, 1 H) 5,07 (d, J = 6,06 Hz, 1 H, D<sub>2</sub>O intercambiable) 4,34 - 4,25 (m, 2 H) 3,63 (d, J = 5,48 Hz, 2 H) 3,48 (td, J = 7,09, 2,64 Hz, 1 H) 3,27 (d, J = 5,28 Hz, 1 H) 2,97 (d, J = 6,85 Hz, 2 H) 2,82 - 2,77 (m, 4 H) 2,59 (d, J = 5,09 Hz, 1 H) 2,33 - 2,11 (m, 2 H) 1,96 (s, 3 H) 1,92 (d, J = 8,22 Hz, 1 H) 1,82 - 1,77 (m, 2 H) 1,68 (s, 3 H) 1,66-1,6 (s a, 1 H) 1,59 - 1,55 (m, 1 H) 1,23 (d, J = 6,46 Hz, 3 H) 1,05 (d, J = 6,26 Hz, 3 H) 0,93 (d, J = 7,24 Hz, 3 H)

## Ejemplo A2

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-{2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B2).

25



*Etapa 1.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-{2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B2). A una solución enfriada (0 °C) de n.º NP2 (430 mg, 0,828 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (6 ml, 0,13 M) se le añadió DCC (376 mg, 1,82 mmol, 2,2 equiv.) seguido de *N*-hidroxisuccinimida (210 mg, 1,82 mmol, 2,2 equiv.). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 18 horas, se retiró por filtración un sólido de color blanco y el filtrado se concentró a un residuo de color amarillo. El residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º B2 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 204 mg, 0,331 mmol, 40 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>): tiempo de retención = 9,463 minutos (pureza del 77 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 617,3 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 0,91 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 7,72 (d, J = 7,81 Hz, 1 H) 6,32 - 6,21 (m, 2 H) 6,04 (m, 1 H) 5,85 (dd, J = 11,48, 7,21 Hz, 1 H) 5,57 (dd, J = 15,80, 4,90 Hz, 1 H) 5,47 (t, J = 7,04 Hz, 1 H) 4,53 - 4,47 (m, 1 H) 4,32 - 4,25 (m, 1 H) 3,62-3,55 (m, 2 H) 3,45 - 3,41 (m, 1 H) 2,95 (d, J = 6,60 Hz, 2 H) 2,74 (s, 3 H) 2,59 (dd, J = 16,00, 4,68 Hz, 2 H) 2,30 - 2,07 (m, 2 H) 1,91 (s, 3 H) 1,77 - 1,65 (m, 4 H) 1,63 (s a, 4 H) 1,611,57 (m, 1 H) 1,48 (dd, J = 13,27, 7,02 Hz, 1 H) 1,19 (d, J = 6,24 Hz, 3 H) 1,050 (d, J = 6,24 Hz, 3 H) 0,89 (d, J = 7,41 Hz, 3 H)

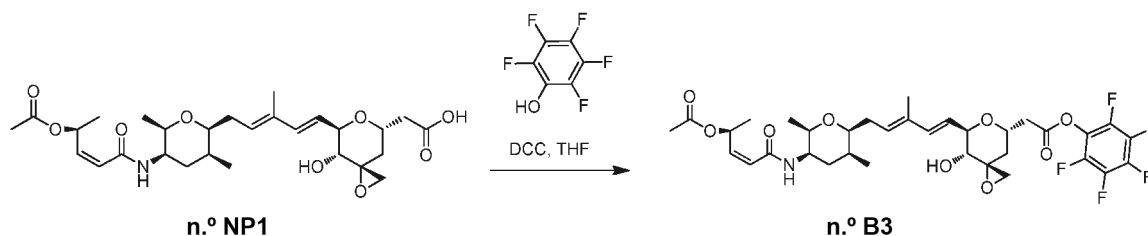
30

35

40

## Ejemplo A3

Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de pentafluorofenilo (n.º B3)



5

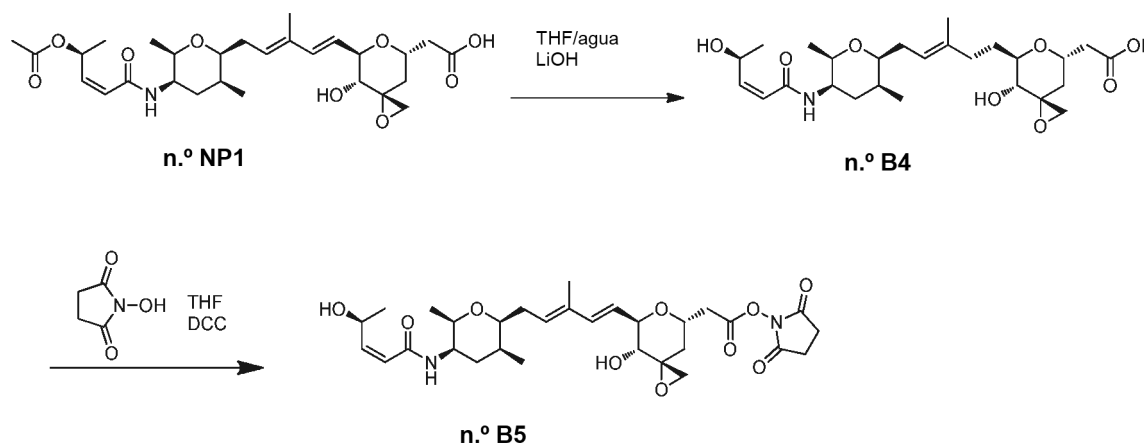
**Etapa 1.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de pentafluorofenilo (n.º B3). A una solución de n.º NP1 (25 mg, 0,047 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (0,7 ml, 0,06 M) se le añadió DCC (9,7 mg, 0,047 mmol, 1 equiv.) seguido de una solución de pentafluorofenol (17,3 mg, 0,094 mmol, 2 equiv.) en tetrahidrofurano (0,3 ml, 0,3M). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, se filtró y la torta de filtró se enjuagó con acetonitrilo. Los filtrados combinados se concentraron al vacío y el material en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para producir n.º B3 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 21,6 mg, 0,030 mmol, 65 %. HPLC (Protocolo A<sup>B</sup>): tiempo de retención = 15,617 minutos (pureza del 87 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 702,2 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 1,0 minutos. RMN <sup>1</sup>H ((400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7,79 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 6,38 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H), 6,32 (d, *J* = 16,4 Hz, 1H), 6,12 (dd, *J* = 11,7, 1,2 Hz, 1H), 5,88 (dd, *J* = 11,5, 7,6 Hz, 1H), 5,64 (dd, *J* = 16,0, 5,1 Hz, 1H), 5,45 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H), 5,10 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H), 4,43 (dd, *J* = 7,0, 3,9 Hz, 1H), 4,32 (t, *J* = 4,7 Hz, 1H), 3,70-3,60 (m, 1H), 3,51-3,43 (m, 1H), 3,12 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H), 2,82 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 2,65 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 2,36-2,15 (m, 2 H), 2,02-1,91 (m, 3 H), 1,81 (s a, 1H), 1,71 (s, 3H), 1,68-1,59 (m, 4 H), 1,27 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 1,06 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H)

10

15

## 20 Ejemplo A4

Preparación de (2Z,4S)-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]-4-hidroxipent-2-enamida (n.º B5).



25

30

35

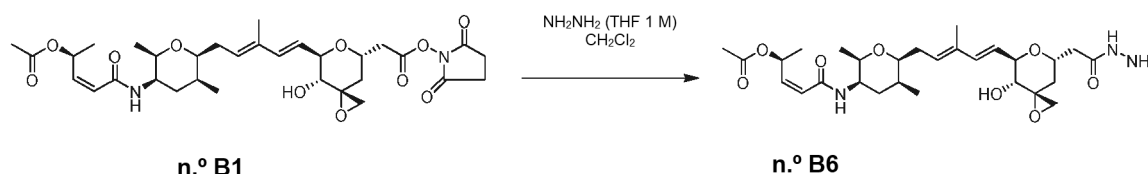
**Etapa 1.** Síntesis de ácido [(3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º B4). A una solución de n.º NP1 (10,2 mg, 0,019 mmol, 1 equiv.) disuelta en una mezcla 1:1 de tetrahidrofurano/agua (1,5 ml, 0,012 M) se le añadió hidróxido de litio (6 mg, 0,25 mmol, 13 equiv.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 ½ horas y los disolventes se retiraron al vacío. El residuo en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º B4 en forma de un sólido. Rendimiento: 2 mg, 0,004 mmol, 20 %. HPLC (Protocolo A): tiempo de retención = 7,850 minutos (pureza del 93 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 494,1 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 0,68 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,46 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H), 6,28 (d, *J* = 16 Hz, 1 H), 6,09 (dd, *J* = 11,9 y 5,3 Hz, 1 H), 5,73 (dd, *J* = 12,1 y 1,6 Hz, 1 H), 5,57 (dd, *J* = 15,6 y 5,9 Hz, 1 H), 5,39-5,32 (m, 1 H), 4,75-4,66 (m, 1 H), 4,50-4,41 (m, 1 H), 4,19-4,13 (m, 1H), 3,89-3,82 (m, 1 H), 3,68-3,59 (m, 1 H), 3,52-3,43 (m, 2 H), 2,99 (dd, *J* = 15,2 y 9,4 Hz, 1 H), 2,94 (d, *J* = 4,3 Hz, 1 H), 2,59-2,49 (m, 2 H), 2,36-2,25 (m, 1 H), 2,20-2,09 (m, 2 H), 1,94-1,79 (m, 2 H), 1,76-1,68 (m, 1 H), 1,66

(s, 3 H), 1,63 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1 H), 1,27 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 1,08 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,93 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

**Etapla 2.** Síntesis de (2Z,4S)-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]-4-hidroxipent-2-enamida (n.º **B5**). Se preparó de acuerdo con el procedimiento general para la síntesis de n.º **B1** en el Ejemplo A1 excepto que se usó el n.º **B4** en lugar del n.º **NP1**. La reacción en bruto se concentró al vacío y después se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º **B5** en forma de un sólido. Rendimiento: 16,2 mg, 0,027 mmol, 64 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  591,3[M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 0,71 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,78 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H), 6,35 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1 H), 5,97 (dd,  $J = 11,9$  y 1,2 Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,7$  y 7,1 Hz, 1 H), 5,61 (dd,  $J = 15,6$  y 5,1 Hz, 1 H), 5,55-5,49 (m, 1 H), 5,22-5,14 (m, 1 H), 5,11 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1 H), 5,08 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1 H), 4,36-4,25 (m, 2 H), 3,69-3,60 (m, 2 H), 3,53-3,45 (m, 1 H), 3,31-3,27 (m, 1 H), 2,99 (d,  $J = 6,7$  Hz, 2 H), 2,84-2,76 (m, 4 H), 2,61 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1 H), 2,34-2,26 (m, 1 H), 2,24-2,15 (m, 1 H), 1,95 (dd,  $J = 13,0$  y 8,2 Hz, 1 H), 1,87-1,73 (m, 2 H), 1,72-1,62 (m, 4 H), 1,59 (dd,  $J = 13,0$  y 3,6 Hz, 1H), 1,11 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 1,06 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A5

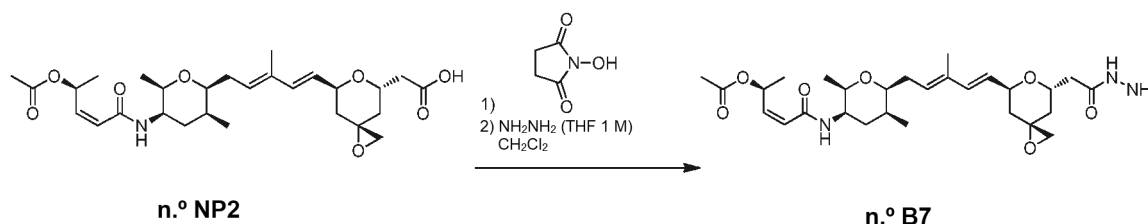
**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B6**).**



**Etapla 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B6**). Se añadió hidrazina (0,615 ml de una solución 1 M en tetrahidrofurano, 0,615 mmol, 5 equiv.) a una solución de n.º **B1** (78 mg, 0,12 mmol, 1 equiv.) disuelta en diclorometano (3 ml, 0,04M) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se añadió hidrazina adicional (0,615 ml de una solución 1 M en tetrahidrofurano, 0,615 mmol, 5 equiv.). Después de 1 hora, la reacción se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano (3 X), las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º **B6** en forma de un sólido. Rendimiento: 43 mg, 58 %. HPLC (Protocolo C):  $m/z$  550,4 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,15 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8,99 (s, 1 H), 7,78 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H), 6,42-6,25 (m, 2 H), 6,11 (dd,  $J = 11,5$  y 1,4 Hz, 1 H), 5,86 (dd,  $J = 11,7$  y 7,4 Hz, 1 H), 5,60 (dd,  $J = 16$  y 5,9 Hz, 1 H), 5,55-5,49 (m, 1 H), 5,02 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1 H), 4,32-4,07 (m, 4 H), 3,70-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,45 (m, 1 H), 3,22 (t ap.,  $J = 4,9$  Hz, 1 H), 2,74 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,58 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,44 (dd,  $J = 14,2$  y 8,4 Hz, 1 H), 2,35-2,25 (m, 1 H), 2,24-2,14 (m, 2 H), 1,97 (s, 3 H), 1,91-1,77 (m, 3 H), 1,70-1,60 (m, 4 H), 1,46 (dd,  $J = 12,9$  y 3,5 Hz, 1 H), 1,25 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A6

**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B7**).**



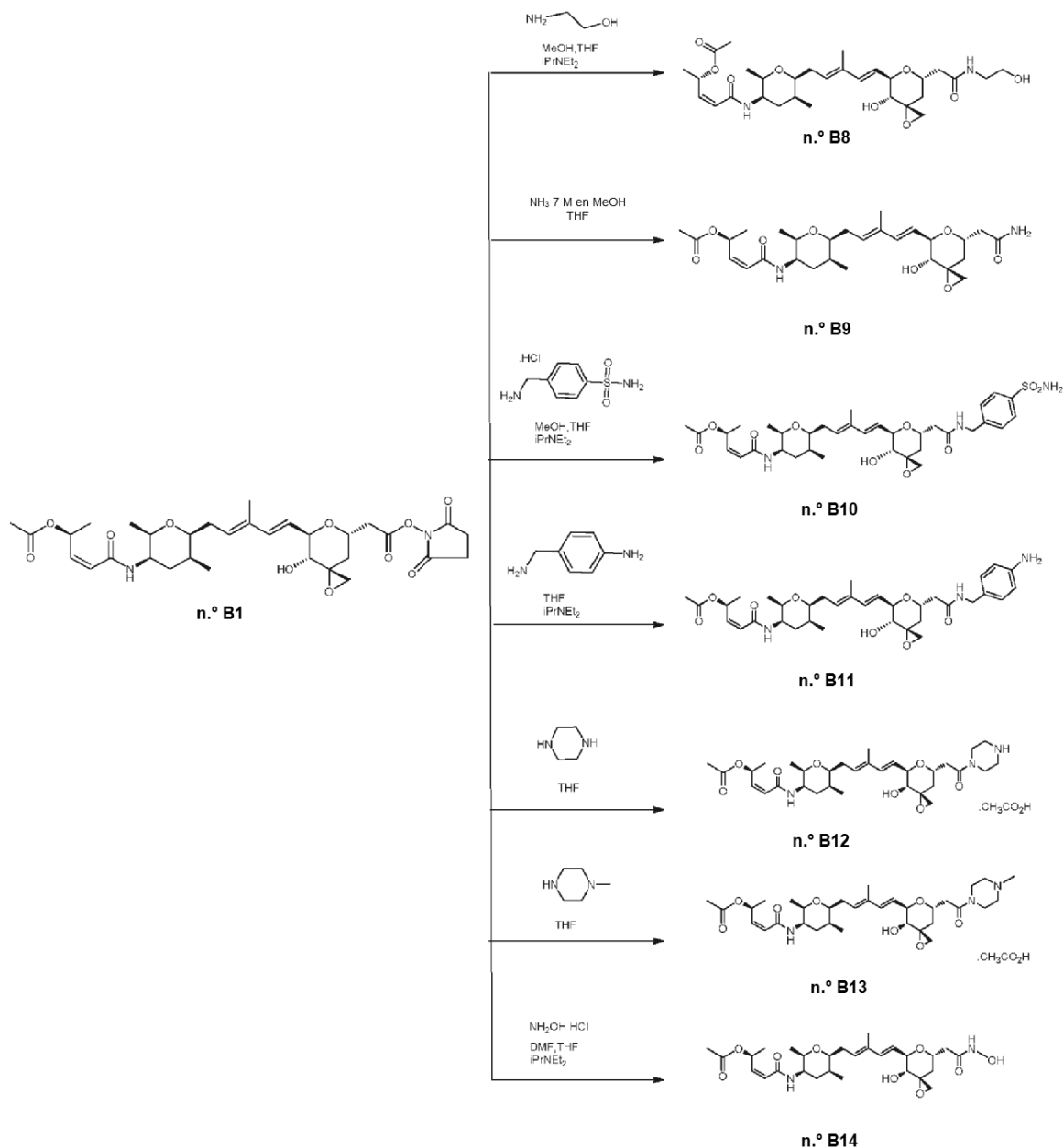
**Etapla 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B7**). A una solución de n.º **NP2** (140 mg, 0,269 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (4 ml, 0,07 M) se le añadió DCC (122 mg, 0,592 mmol, 2,2 equiv.), seguido de N-Hidroxisuccinimida (68,1 mg, 0,592 mmol, 2,2 equiv.). Después de 18 horas, se añadió hidrazina (0,576 ml de una solución 1 M en tetrahidrofurano, 0,576 mmol, 2,1 equiv.). Después de 30 minutos, se añadió hidrazina adicional (1 ml de una solución 1 M en tetrahidrofurano, 1 mmol, 3,7 equiv.).



Después de 10 minutos la reacción se concentró al vacío y el material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento C\*) para proporcionar n.º B7 en forma de un sólido. Rendimiento: 78 mg, 0,145 mmol, 54 %. HPLC (Protocolo F):  $m/z$  534,4  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 8,143 minutos (pureza del 100 %).

## 5 Ejemplo A7

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-[(2-hidroxi-etil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il}-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B8). Y acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B9). Y acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-oxo-2-[(4-sulfamoylbencil)amino]etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B10). Y acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(4-aminobencil)amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B11). Y acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-oxo-2-(piperazin-1-il)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º B12). Y acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º B13). Y acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-(hidroxiamino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B14).



5 **Etapa 1a.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-[(2-hidroxi-etil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo] (n.º B8). De acuerdo con el Procedimiento general D, a partir de 2-aminoetanol (2,0 mg, 0,033 mmol, 1,03 equiv.) tetrahidrofurano (1 ml), *N,N* diisopropiletilamina (0,028 ml, 0,160 mmol, 5 equiv.), metanol (0,2 ml) y n.º B1 (20 mg, 0,032 mmol, 1 equiv.), se sintetizó el material deseado en bruto, que se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento D\*) para proporcionar n.º B8 en forma de un sólido. Rendimiento: 17,6 mg, 0,031 mmol, 97 %. HPLC (Protocolo B): *m/z* 579,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 2,00 minutos (pureza del 100 %).

10 **Etapa 1b.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo] (n.º B9). A una solución de n.º B1 (15 mg, 0,024 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahidrofurano (1 ml, 0,024 M) se le añadió amoníaco (0,069 ml de una solución 7 M en metanol, 0,480 mmol, 20 equiv.) Después de agitarse durante 3 ½ horas, los disolventes se retiraron al vacío y el material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento C\*) para dar n.º B9 en forma de un sólido.

15 Rendimiento: 6 mg, 0,012 mmol, 50 %. HPLC (Protocolo F) *m/z* 535,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 7,796 minutos (pureza del 100 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,78 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,30 (s, 1 H), 6,77 (s, 1 H), 6,40-6,28 (m, 2 H), 6,10 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,5 y 7,6 Hz, 1 H), 5,61 (dd, *J* = 15,8 y 5,7 Hz, 1 H),

5,54-5,47 (m, 1 H), 4,99 (d,  $J = 5,9$  Hz, 1 H), 4,29-4,20 (m, 2 H), 3,69-3,61 (m, 2 H), 3,53-3,46 (m, 1 H), 3,23 (t ap.,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,74 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,57 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,48-2,44 (m, 1 H), 2,36-2,25 (m, 1 H), 2,25-2,16 (m, 2 H), 1,97 (s, 3 H), 1,87-1,77 (m, 2 H), 1,69 (s, 3 H), 1,68-1,60 (m, 2 H), 1,49 (dd,  $J = 13,1$  y  $3,7$  Hz, 1 H), 1,25 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

5 *Etapa 1c.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-oxo-2-((4-sulfamoil-bencil)amino)etil}-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B10**). De acuerdo con el Procedimiento general D, a partir de 4-(aminometil)bencenosulfonamida, sal clorhidrato (9,2 mg, 0,041 mmol, 1 equiv.) tetrahydrofurano (1 ml), *N,N*-diisopropiletilamina (0,035 ml, 0,200 mmol, 5 equiv.), metanol (0,2 ml) y **n.º B1** (25 mg, 0,040 mmol, 1 equiv.), se sintetizó el material deseado en bruto, que se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento D\*) para proporcionar **n.º B10** en forma de un sólido. Rendimiento: 15,5 mg, 0,022 mmol, 55 %. HPLC (Protocolo B):  $m/z$  704,4  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 2,36 minutos (pureza del 100 %). RMN  $^1H$  (400 MHz, METANOL- $d_4$ )  $\delta$ : 8,58 (s a, 1H), 7,80 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 7,63 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2 H), 7,45 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 6,42-6,32 (m, 2 H), 6,02-5,90 (m, 2 H), 5,67 (dd,  $J = 15,8, 6,0$  Hz, 1H), 5,53 (t,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 4,62-4,54 (m, 1H), 4,46 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 4,42-4,32 (m, 2 H), 3,78-3,65 (m, 2 H), 3,58 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 3,43 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 2,92-2,81 (m, 2 H), 2,66 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1H), 2,40 (m, 2 H), 2,24 (m, 1H), 2,02-2,02 (m, 3 H), 1,98 (s, 1H), 1,98-1,67 (m, 2 H), 1,90-1,85 (m, 1 H), 1,83-1,80 (m, 1 H), 1,77 (s, 2 H), 1,41-1,32 (m, 4 H), 1,13-0,98 (m, 3 H).

20 *Etapa 1d.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-{2-((4-aminobencil)amino)-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B11**). De acuerdo con el Procedimiento general D, a partir de 4-(aminometil)anilina (3,9 mg, 0,032 mmol, 1 equiv.) tetrahydrofurano (1 ml), *N,N*-diisopropiletilamina (0,011 ml, 0,064 mmol, 2 equiv.), metanol (0,2 ml) y **n.º B1** (20 mg, 0,032 mmol, 1 equiv.), se sintetizó el material deseado en bruto, que se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B11** en forma de un sólido. Rendimiento: 17,6 mg, 0,027 mmol, 86 %. HPLC (Protocolo A<sup>a</sup>): tiempo de retención = 6,748 minutos (pureza del 91 %). RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 8,14 (t,  $J = 5,77$  Hz, 1 H) 7,78 (d,  $J = 8,02$  Hz, 1 H) 6,90 - 6,84 (m, 2 H) 6,48 - 6,43 (m, 2 H) 6,39 - 6,30 (m, 1 H) 6,27 (s, 1 H) 6,09 (m, 1H) 5,88 - 5,80 (m, 1 H) 5,59 (dd,  $J = 15,85, 5,48$  Hz, 1 H) 5,51 (t,  $J = 6,94$  Hz, 1 H) 5,01 (d,  $J = 5,28$  Hz, 1 H) 4,89 (s, 2 H) 4,30 - 4,22 (m, 1 H) 4,12 - 3,99 (m, 1 H) 3,63 (d,  $J = 5,87$  Hz, 2 H) 3,49 (td,  $J = 7,04, 2,54$  Hz, 1 H) 3,22 (t,  $J = 4,40$  Hz, 1 H) 2,73 (d,  $J = 5,09$  Hz, 1 H) 2,59 - 2,50 (m, 2 H) 2,35 - 2,13 (m, 3 H) 1,96 (s, 3 H) 1,88 - 1,75 (m, 3 H) 1,69 (s, 3 H) 1,64 (td,  $J = 4,89, 2,54$  Hz, 1 H) 1,44 (dd,  $J = 12,81, 3,62$  Hz, 1 H) 1,23 (d,  $J = 6,46$  Hz, 3 H) 1,04 (d,  $J = 6,46$  Hz, 3 H) 0,93 (d,  $J = 7,43$  Hz, 3 H)

35 *Etapa 1e.* acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(piperazin-1-il)etil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (**n.º B12**). A una solución de **n.º B1** (15,5 mg, 0,024 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahydrofurano (0,24 ml, 0,048 M) se le añadió piperazina (2,5 mg, 0,029 mmol, 1,2 equiv.) Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se diluyó con agua, se extrajo con diclorometano, los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y los disolventes se retiraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B12** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 8,2 mg, 0,012 mmol, 52 %. HPLC (Protocolo A<sup>a</sup>) tiempo de retención = 6,795 minutos (pureza del 80 %). CLEM (Protocolo C):  $m/z$  604,3  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,01 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,79 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H), 6,41-6,28 (m, 2 H), 6,11 (d,  $J = 10,5$  Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,5$  y  $7,6$  Hz, 1 H), 5,60 (dd,  $J = 16$  y  $5,1$  Hz, 1 H), 5,55-5,48 (m, 1 H), 4,97 (d,  $J = 5,9$  Hz, 1 H), 4,31-4,20 (m, 2 H), 3,70-3,60 (m, 2 H), 3,55-3,35 (m, 6 H), 3,27-3,22 (m, 1 H), 2,75 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,69-2,54 (m, 5 H), 2,36-2,13 (m, 4 H), 1,98 (s, 3 H), 1,88-1,76 (m, 3 H), 1,72-1,61 (m, 4 H), 1,58-1,51 (m, 1 H), 1,25 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

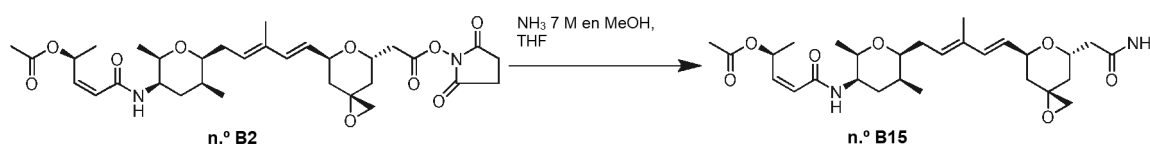
50 *Etapa 1f.* acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)-2-oxoetil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (**n.º B13**). A una solución de **n.º B1** (18,8 mg, 0,03 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahydrofurano (0,500 ml, 0,06 M) se le añadió 1-metilpiperazina (3,6 mg, 0,036 mmol, 1,2 equiv.) Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se diluyó con agua, se extrajo con diclorometano, los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y los disolventes se retiraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B13** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 11,6 mg, 0,017 mmol, 57 %. HPLC (Protocolo A<sup>a</sup>) tiempo de retención = 6,422 minutos (pureza del 94 %). CLEM (Protocolo C):  $m/z$  618,4  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,97 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,79 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1 H), 6,42-6,27 (m, 2 H), 6,11 (d,  $J = 10,5$  Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,3$  y  $7,4$  Hz, 1 H), 5,60 (dd,  $J = 15,8$  y  $5,3$  Hz, 1 H), 5,55-5,48 (m, 1 H), 4,97 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1 H), 4,30-4,21 (m, 2 H), 3,70-3,61 (m, 2 H), 3,56-3,33 (m, 5 H), 3,25 (t ap.,  $J = 5,5$  Hz, 1 H), 2,79-2,65 (m, 2 H), 2,60-2,53 (m, 2 H), 2,35-2,12 (m, 9 H), 1,98 (s, 3 H), 1,88-1,78 (m, 3 H), 1,72-1,61 (m, 4 H), 1,56 (dd,  $J = 12,9$  y  $3,5$  Hz, 1 H), 1,25 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

60 *Etapa 1 g.* acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-(hidroxiamino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B14**). A una solución de **n.º B1** (30,7 mg, 0,049 mmol, 1 equiv.) disuelta en

tetrahidrofurano (0,450 ml) y *N,N*-dimetilformamida (0,175 ml) se le añadieron *N,N*-diisopropiletamina (32 mg, 0,245 mmol, 5 equiv.) y clorhidrato de hidroxilamina (10,6 mg, 0,152 mmol, 3 equiv.) Después de agitar durante 30 minutos, la reacción se diluyó con agua, se extrajo con acetato de etilo (3 X), los extractos orgánicos combinados se lavaron de nuevo con agua, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B14** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 11,8 mg, 0,021 mmol, 43 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 7,189 minutos (pureza del 96 %). CLEM (Protocolo C): *m/z* 551,2 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,18 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,42 (s, 1 H), 8,74 (s, 1 H) 7,80 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 6,43-6,29 (m, 2 H), 6,16-6,10 (m, 1 H), 5,88 (dd, *J* = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,61 (dd, *J* = 16 y 5,5 Hz, 1 H), 5,57-5,51 (m, 1 H), 5,04 (d, *J* = 5,5 Hz, 1 H), 4,32-4,23 (m, 2 H), 3,72-3,62 (m, 2 H), 3,57-3,48 (m, 1 H), 3,27-3,21 (m, 1 H), 2,76 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,60 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,44-2,27 (m, 2 H), 2,26-2,11 (m, 2 H), 2,00 (s, 3 H), 1,92-1,80 (m, 3 H), 1,74-1,63 (m, 4 H), 1,49 (dd, *J* = 12,7 y 3,3 Hz, 1 H), 1,27 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,09 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,97 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H).

### Ejemplo A8

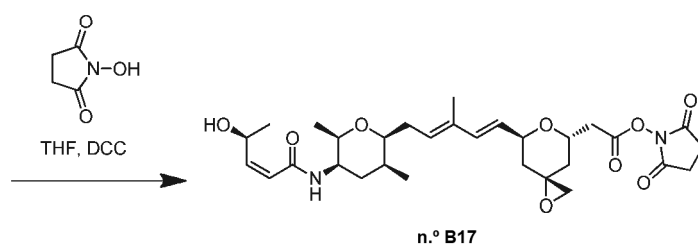
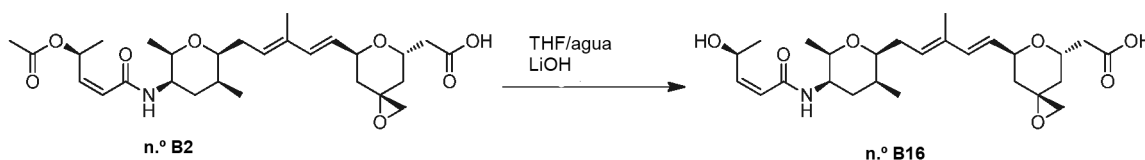
15 **Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B15).**



20 **Etapa 1. Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B15).** A una solución de n.º **B2** (108 mg, 0,175 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahidrofurano (3 ml, 0,06 M) se le añadió amoníaco (0,500 ml de una solución 7 M en metanol, 3,5 mmol, 20 equiv.) Después de agitar durante 1 hora, los disolventes se retiraron al vacío y el material deseado en bruto se purificó por cromatografía C18 de fase inversa a presión media (Gradiente: agua del 0 % al 90 % en acetonitrilo con ácido acético al 0,02 % en cada fase) para dar n.º **B15** en forma de un sólido. Rendimiento: 23,9 mg, 0,045 mmol, 26 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 8,231 minutos (pureza del 89 %). CLEM (Protocolo C): *m/z* 519,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,41 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,80 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,33 (s, 1 H), 6,78 (s, 1 H), 6,42-6,33 (m, 1 H), 6,28 (d, *J* = 16 Hz, 1 H), 6,16-6,10 (m, 1 H), 5,88 (dd, *J* = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,61 (dd, *J* = 15,8 y 5,7 Hz, 1 H), 5,56-5,50 (m, 1 H), 4,60-4,51 (m, 1 H), 4,38-4,27 (m, 1 H), 3,72-3,62 (m, 2 H), 3,56-3,48 (m, 1 H), 2,71-2,54 (m, 4 H), 2,38-2,27 (m, 1 H), 2,26-2,16 (m, 2 H), 2,00 (s, 3 H), 1,89-1,74 (m, 3 H), 1,71 (s, 3 H), 1,69-1,61 (m, 2 H), 1,39 (dd, *J* = 13,5 y 6,4 Hz, 1 H), 1,27 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 1,09 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 0,97 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H).

### Ejemplo A9

35 **Preparación de ácido [(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxi-pent-2-enil]amino]-3,6-dimetil-tetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º B16). Y (2Z,4S)-*N*-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-[(2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il]oxi]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]-4-hidroxi-pent-2-enamida (n.º B17).**

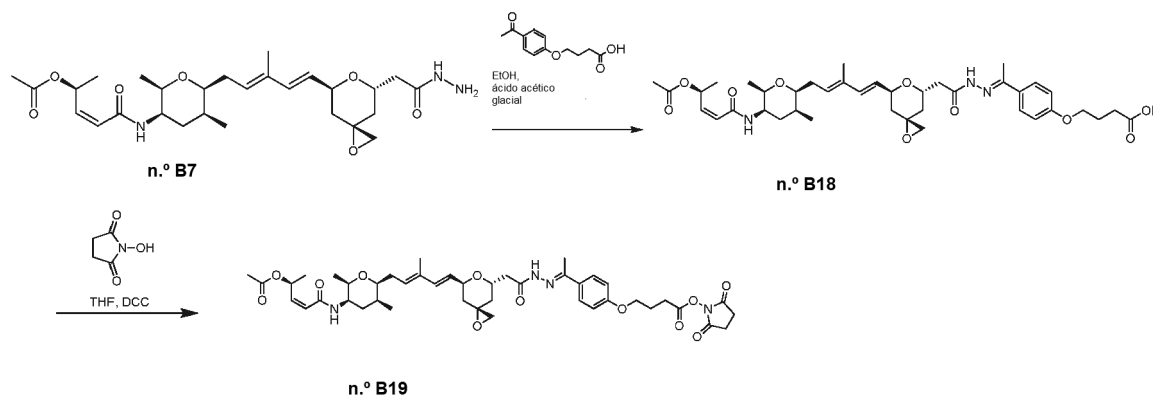


**Etapa 1.** Síntesis de ácido [(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (**n.º B16**). A una solución de **n.º NP2** (25 mg, 0,048 mmol, 1 equiv.) disuelta en una mezcla 1:1 de tetrahydrofurano/agua (3 ml, 0,016 M) se le añadió hidróxido de litio (15 mg, 0,63 mmol, 13 equiv.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y los disolventes se retiraron al vacío. El residuo en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B16** en forma de un sólido. Rendimiento: 17 mg, 0,035 mmol, 74 %. CLEM (Protocolo D);  $m/z$  478,1 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,75 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ 6,27 (d, J = 8,98 Hz, 1 H) 6,09 (d, J = 15,61 Hz, 1 H) 6,00 (dd, J = 12,10, 5,46 Hz, 1 H) 5,62 (dd, >12,10, 1,17 Hz, 1 H) 5,40 (dd, >15,61, 5,85 Hz, 2H) 5,25 (t, >6,63 Hz, 1 H) 4,61 (t, >6,63 Hz, 1 H) 4,48 - 4,32 (m, 2 H) 3,79 - 3,73 (m, 1 H) 3,57 - 3,48 (m, 2 H) 3,42 - 3,33 (m, 2 H) 2,85 (dd, J = 15,22, 8,98 Hz, 2 H) 2,52 - 2,44 (m, 2 H) 2,42 (d, J = 5,07 Hz, 1 H) 2,25 - 2,00 (m, 1 H) 1,94 - 1,87 (m, 2 H) 1,80 - 1,74 (m, 2 H) 1,68 - 1,59 (m, 2 H) 1,55 (s, 3 H) 1,46 (dd, J = 13,46, 3,71 Hz, 1 H) 1,27 (dd, J = 13,66, 4,29 Hz, 1 H) 1,17 (d, J = 6,63 Hz, 3 H) 0,98 (d, J = 6,24 Hz, 3H) 0,83 (d, J = 7,02 Hz, 3 H).

**Etapa 2.** Síntesis de (2Z,4S)-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-[2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]-4-hidroxipent-2-enamida (**n.º B17**). Se preparó de acuerdo con el procedimiento general para la síntesis de **n.º B1** en el Ejemplo A1 excepto que se usó **n.º B16** en lugar de **n.º NP1**. La reacción en bruto se concentró al vacío, y después se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B17** en forma de un sólido. Rendimiento: 28 mg, 0,043 mmol, 43 % CLEM (Protocolo D);  $m/z$  575,1 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,82 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,76 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 6,30 (d, J = 16 Hz, 1 H), 5,97 (d, J = 12,1 Hz, 1 H), 5,86 (dd, J = 11,7 y 7,0 Hz, 1 H), 5,63 (dd, J = 16 y 5,1 Hz, 1 H), 5,56-5,48 (m, 1H), 5,22-5,06 (m, 2 H), 4,60-4,53 (m, 1 H), 4,39-4,30 (m, 1 H), 3,70-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,45 (m, 1 H), 3,03-2,98 (m, 2 H), 2,80 (s, 4 H), 2,70-2,60 (m, 2 H), 2,59 (s, 1 H), 2,37-2,13 (m, 3 H), 1,87-1,60 (m, 7 H), 1,54 (dd, J = 13,3 y 7 Hz, 1 H), 1,11 (d, J = 6,2 Hz, 3 H), 1,06 (d, J = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, J = 7,4 Hz, 3 H).

### Ejemplo A10

**Preparación de ácido 4-{4-[(1E)-1-(2-[(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinilidene)etil]fenoxi}butanoico (**n.º B18**). Y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-[(2E)-2-[1-(4-{4-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-4-oxobutoxi]fenil)etilideno]hidrazinil]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B19**).**



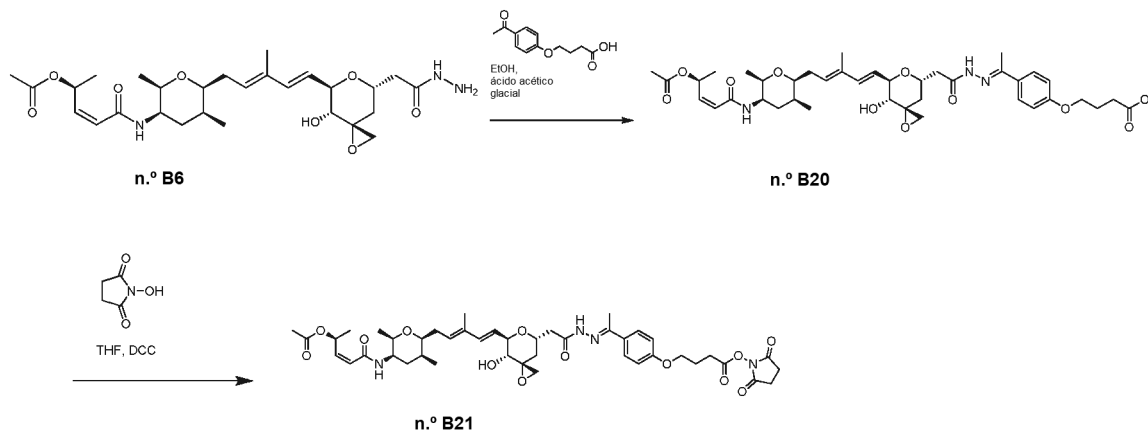
**Etapa 1.** Síntesis de ácido 4-{4-[(1E)-1-(2-[(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinilidene)etil]fenoxi}butanoico (**n.º B18**). A una solución de **n.º B7** (35 mg, 0,066 mmol, 1 equiv.) en etanol (1 ml, 0,06 M) se le añadió ácido 4-(4-acetilfenoxi)butanoico (73,3 mg, 0,330 mmol, 5 equiv.) seguido de ácido acético glacial (0,250 ml) y la reacción se calentó a 37 °C. Después de 3 ½ horas la reacción se filtró y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B18** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 25,5 mg, 0,034 mmol, 52 %. CLEM (Protocolo D);  $m/z$  737,38 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,88 minutos.

**Etapa 2.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-[(2E)-2-[1-(4-{4-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-4-oxobutoxi]fenil)etilideno]hidrazinil]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B19**). A una solución de **n.º B18** (25 mg, 0,034 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahydrofurano (0,7 ml, 0,049 M) se le añadió DCC (15,5 mg, 0,075 mmol, 2,2 equiv.) seguido de N-Hidroxisuccinimida (8,60 mg, 0,075 mmol, 2,2 equiv.). La reacción se agitó durante 4 horas. Los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B19** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 13 mg, 0,015

mmol, 46 %. CLEM (Protocolo D);  $m/z$  835,8 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,92 minutos.

### Ejemplo A11

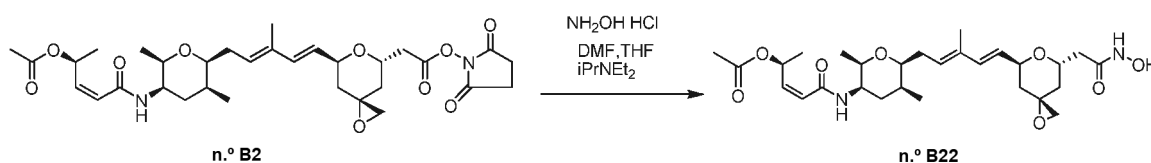
Preparación de ácido 4-{4-[(1E)-1-(2-[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinilidene)etil]fenoxi}butanoico (n.º B20). Y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-[(2E)-2-[1-(4-{4-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-4-oxobutoxi]fenil)etilideno]hidrazinil]-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetil-tetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B21).



**Etapa 1.** Síntesis de ácido 4-{4-[(1E)-1-(2-[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinilidene)etil]fenoxi}butanoico (n.º B20). A una solución de n.º B6 (18,1 mg, 0,033 mmol, 1 equiv.) en etanol (0,500 ml, 0,06 M) se le añadió ácido 4-(4-acetilfenoxi)butanoico (36,7 mg, 0,165 mmol, 5 equiv.) seguido de ácido acético glacial (0,125 ml) y la reacción se calentó a 37 °C. Después de 1 hora la reacción se filtró y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º B20 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 24,9 mg, 0,028 mmol, 85 %. CLEM (Protocolo C);  $m/z$  754,5 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,47 minutos.

**Etapa 2.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-[(2E)-2-[1-(4-{4-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-4-oxobutoxi]fenil)etilideno]hidrazinil]-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B21). A una solución de n.º B20 (21,3 mg, 0,028 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahidrofurano (0,550 ml, 0,05 M) se le añadió DCC (13,5 mg, 0,062 mmol, 2,2 equiv.) seguido de *N*-hidroxisuccinimida (7,3 mg, 0,062 mmol, 2,2 equiv.). La reacción se agitó durante 5 horas y se añadió DCC adicional (5 mg, 0,022 mmol, 0,8 equiv.) seguido de *N*-hidroxisuccinimida (5 mg, 0,042 mmol, 1,5 equiv.). Después de 18 horas, los disolventes se retiraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º B21 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 11 mg, 0,013 mmol, 47 %. HPLC (Protocolo H):  $m/z$  851,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 9,074 minutos (pureza del 88 %). CLEM (Protocolo C);  $m/z$  851,5 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,58 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 10,42-10,25 (m, 1 H), 7,83-7,66 (m, 3 H), 7,02-6,92 (m, 2 H), 6,43-6,22 (m, 2 H), 6,1-6,05 (m, 1 H), 5,93-5,81 (m, 1 H), 5,68-5,37 (m, 2 H), 5,08-4,90 (m, 1 H), 4,52-4,25 (m, 3 H), 4,13-4,04 (m, 2 H), 3,71-3,55 (m, 2 H), 3,52-3,40 (m, 1 H), 2,94-2,55 (m, 9 H), 2,35-2,03 (m, 7 H), 1,98 (s, 3 H), 1,95-1,85 (m, 1 H), 1,84-1,73 (m, 2 H), 1,72-1,54 (m, 5 H), 1,30-1,20 (m, 3 H), 1,12-1,00 (m, 3 H), 0,98-0,87 (m, 3 H).

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-[2-(hidroxiamino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B22).

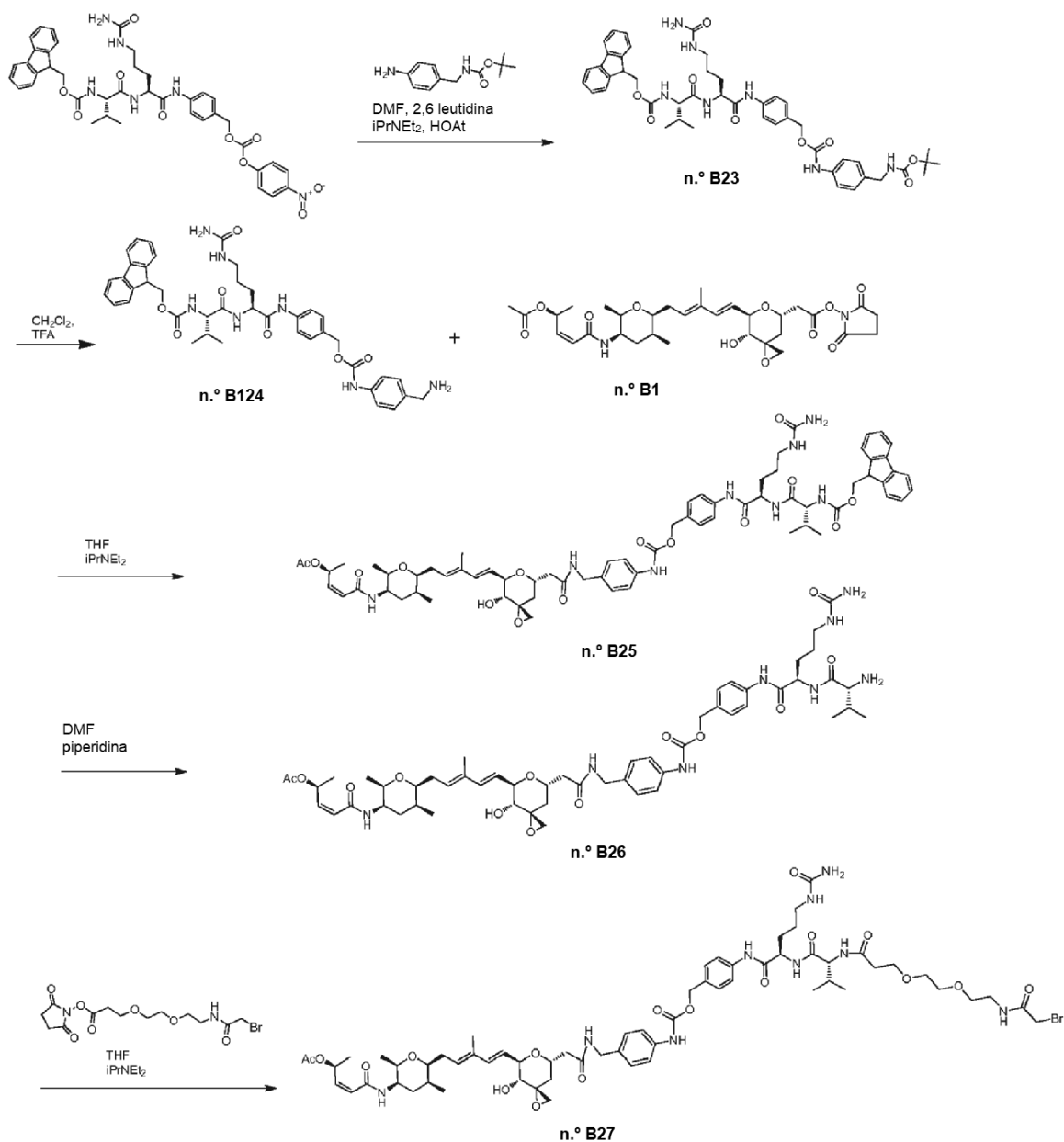


**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-[2-(hidroxiamino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo

(n.º B22). A una solución de n.º B2 (100,8 mg, 0,175 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahidrofurano (1,8 ml) y *N,N*-dimetilformamida (0,600 ml) se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (114 mg, 0,875 mmol, 5 equiv.) y clorhidrato de hidroxilamina (10,6 mg, 0,152 mmol, 3 equiv.) Después de agitar durante 1 hora, la reacción se diluyó con agua, se extrajo con acetato de etilo (3 x), los extractos orgánicos combinados se lavaron de nuevo con agua, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía C18 de fase inversa a presión media (Gradiente: agua del 10 % al 100 % en acetonitrilo con ácido acético al 0,02 % en cada fase) para dar n.º B22 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 68 mg, 0,127 mmol, 73 %. CLEM (Protocolo C):  $m/z$  535,4  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,36 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,40 (s, 1H), 8,73 (d,  $J = 2$  Hz, 1 H), 7,79 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H), 6,41-6,32 (m, 1 H), 6,26 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1 H), 6,12 (d,  $J = 11,3$  Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,5$  y 7,6 Hz, 1 H), 5,59 (dd,  $J = 16$  y 5,5 Hz, 1 H), 5,55-5,49 (m, 1 H), 4,56-4,49 (m, 1 H), 4,36-4,27 (m, 1 H), 3,70-3,61 (m, 2 H), 3,54-3,47 (m, 1 H), 2,65-2,60 (m, 2 H), 2,48-2,41 (m, 1 H), 2,36-2,17 (m, 2 H), 2,16-2,09 (m, 1 H), 1,98 (s, 3 H), 1,85-1,72 (m, 3 H), 1,72-1,61 (m, 6 H), 1,43-1,35 (m, 1 H), 1,25 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A12

15 Preparación de N-[3-(2-{2-[(bromoacetil)amino]etoxi}etoxi)propanoil]-D-valil-N-(4-[[{4-[[{(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[{(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)metil]fenil]carbamoil)oxi]metil]fenil)-N~5~-carbamoil-D-ornitinamida (n.º B27).



*Etapa 1.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-4-[[4-[[4-[[terc-butoxicarbonil]amino]metil]fenil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-N-5-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B23**). A una solución de (4-aminobencil)carbamato de terc-butilo (75,4 mg, 0,339 mmol, 1,3 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (2 ml, 0,16 M) se le añadieron 2,6-dimetilpiridina (140 mg, 1,3 mmol, 5 equiv.), *N,N*-diisopropiletilamina (169 mg, 1,3 mmol, 5 equiv.) y 3H-[1,2, 3]triazolo[4,5-b]piridin-3-ol (HOAt, 71,1 mg, 0,522 mmol, 2 equiv.) se agitó durante 5 minutos. La mezcla de reacción entera se añadió a una solución de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-5-carbamoil-N-4-[[4-[[4-[[terc-butoxicarbonil]amino]metil]fenil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-L-ornitinamida (200 mg, 0,261 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (2 ml, 0,13 M) y la reacción se calentó a 50 °C durante 5 horas y se concentró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía C18 de fase inversa a presión media (Gradiente: agua del 10 % al 100 % en acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,02 % en cada fase) para dar **n.º B23** en forma de un sólido. Rendimiento: 40 mg, 0,047 mmol, 18 %.

*Etapa 2.* Síntesis N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-4-[[4-[[4-[[aminometil]fenil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-N-5-carbamoil-L-ornitinamida, sal del ácido di trifluoroacético. (**n.º B24**). A una suspensión de **n.º B23** (40 mg, 0,047 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (2 ml, 0,023 M) se le añadió una solución 1:1 de diclorometano/ácido trifluoroacético (2 ml). Después de 45 minutos la reacción se concentró al vacío hasta una goma de color naranja **n.º B24** que se usó sin purificación adicional. Rendimiento: 46 mg (rendimiento cuantitativo asumido). CLEM (Protocolo D): *m/z* 750,4 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,73 minutos.

*Etapa 3.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-D-valil-N-4-[[4-[[4-[[3R,5S,7R,8R]-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino]metil]fenil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-N-5-carbamoil-D-ornitinamida (**n.º B25**). A una solución de **n.º B24** (46 mg, 0,047 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (1 ml, 0,047 M) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (12,8 mg, 0,017 mmol, 2,1 equiv.). Después, se añadió gota a gota la mezcla entera a una solución de **n.º B1** (29,7 mg, 0,047 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (1 ml). Después de 18 horas se añadió metanol (0,4 ml). Después de 48 horas, la reacción se concentró al vacío y el producto en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B25** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 12,2 mg, 0,009 mmol, 20 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>): tiempo de retención = 9,140 (pureza del =89 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 1268,7 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,92 minutos.

*Etapa 4.* Síntesis de D-valil-N-4-[[4-[[4-[[3R,5S,7R,8R]-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino]metil]fenil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-N-5-carbamoil-D-ornitinamida (**n.º B26**). A una solución de **n.º B25** (12 mg, 0,009 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,3 ml, 0,3 M) se le añadió piperidina (0,2 ml de una solución madre 0,050 ml en 1 ml de *N,N*-dimetilformamida). Después de 30 minutos, la reacción se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) y las fracciones que pertenecían al producto deseado se liofilizaron para proporcionar **n.º B26** en forma de un sólido. Rendimiento: 6,6 mg, 0,006 mmol, 70 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>): tiempo de retención = 6,957 (pureza del =89 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 1045,8 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,69 minutos.

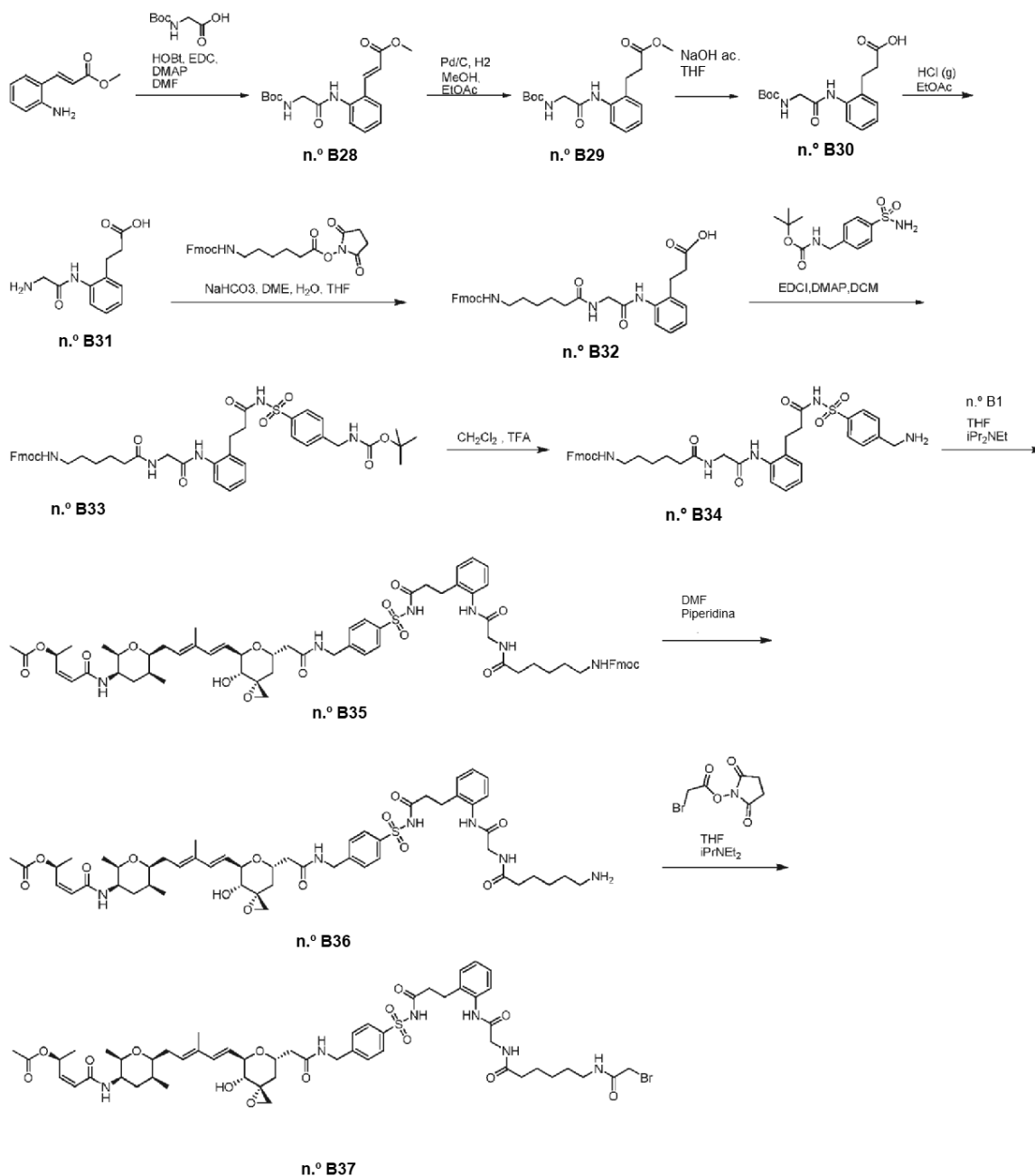
*Etapa 5.* Síntesis de N-[3-(2-{2-[(bromoacetil)amino]etoxi}etoxi)propanoil]-D-valil-N-4-[[4-[[4-[[3R,5S,7R, 8R]-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino]metil]fenil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-N-5-carbamoil-D-ornitinamida (**n.º B27**). A una solución de **n.º B26** (6 mg, 0,006 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (0,6 ml, 0,01 M) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (0,25 ml de una solución madre [preparada disolviendo 0,01 ml *N,N*-diisopropiletilamina en 1 ml de tetrahidrofurano], 0,012 mmol, 2 equiv.) y se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla entera se añadió gota a gota a una solución enfriada (0 °C) de 2-bromo-N-[2-(2-{3-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il]oxi)-3-oxopropoxi]etoxi]etil]acetamida (2,4 mg, 0,006 mmol, 1 equiv.). La reacción se agitó a (0 °C) durante 5 minutos y después se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 16 horas, la reacción se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B27** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 1,4 mg, 0,001 mmol, 20 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1348,7 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,77 minutos.



## Ejemplo A13

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-[2-((4-((3-2-((N-(6-[(bromoacetil)amino]hexanoil)glicil)amino)fenil)propanoil)sulfamoyl]bencil)amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B37)

5



10

15

**Etapa 1.** Síntesis de (2E)-3-(2-([N-(terc-butoxicarbonil)glicil]amino)fenil)prop-2-enoato de metilo (n.º B28). A una solución de N-(terc-butoxicarbonil)glicina (13,4 g, 77,1 mmol, 1 equiv.), clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (22,1 g, 115,7 mmol, 1,5 equiv.), 1-hidroxibenzotriazol (11,4 g, 84,8 mmol, 1,1 equiv.), 4-(dimetilamino)piridina (0,9 g, 7,4 mmol, 0,10 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (350 ml) se le añadió (2E)-3-(2-aminofenil)prop-2-enoato de metilo (15 g, 84,7 mmol, 1,1 equiv.) a temperatura ambiente. La reacción se calentó a 50 °C, se agitó durante 18 horas. La reacción se diluyó con agua (400 ml), se lavó con ácido cítrico (200 ml), se extrajo con acetato de etilo (300 ml X 3). La capa orgánica se lavó con salmuera (150 ml), se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluído con éter de petróleo:acetato de etilo de 8:1 a 1:1 para proporcionar el compuesto n.º B28 (20 g, 71 %) en

forma de un sólido. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,29 (a, 1H), 7,84 (d, 2H), 7,55 (t, 1H), 7,40 (t, 1H), 7,22 (t, 1H), 6,41(d, 2H), 5,37 (a, 1H), 4,00 (d, 2H), 3,79 (s, 3H), 1,46 (s, 9H).

**Etapa 2.** Síntesis de 3-(2-[[N-(terc-butoxicarbonil)glicil]amino]fenil)propanoato de metilo (**n.º B29**). Una suspensión del compuesto **n.º B28** (20 g, 59,8 mmol, 1 equiv.) y Pd/C (2,0 g) en acetato de etilo (350 ml) y metanol (300 ml) se desgasificó al vacío y se purgó con H<sub>2</sub> varias veces. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en H<sub>2</sub> (206,84 kPa) durante 9 horas. La mezcla de reacción se filtró y la torta de filtro se lavó con acetato de etilo (100 ml). El filtrado se evaporó a sequedad para proporcionar el compuesto **n.º B29** en forma de un aceite que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional: Rendimiento (20,75 g, cuantitativo asumido). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,13 (a, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,22 (d, 1H), 7,17 (m, 2H), 5,34 (a, 1H), 4,04 (d, 2H), 3,64 (s, 3H), 2,95 (t, 2H), 2,72 (t, 2H), 1,46 (s, 9H).

**Etapa 3.** Síntesis de ácido 3-(2-[[N-(terc-butoxicarbonil)glicil]amino]fenil)propanoico (**n.º B30**). A una solución de **n.º B29** (20,75 g, 59,8 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (200 ml) se le añadió una solución de hidróxido sódico (12,24 g, 0,306 mmol) en agua (155 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción pH se ajustó a pH 5~6 mediante ácido cítrico, se extrajo con acetato de etilo (400 ml X 2). La capa orgánica se lavó con salmuera (150 ml X 2), se secó sobre sulfato sódico, se concentró a sequedad para proporcionar **n.º B30** en forma de un sólido que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. Rendimiento: 21,5 g (cuantitativo asumido). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,29 (m, 1H), 7,23 (m, 3H), 3,90 (s, 2H), 2,91 (m, 2H), 2,66 (m, 2H), 1,49 (m, 9H). CLEM (Protocolo I): m/z 345 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,034 minutos.

**Etapa 4.** Síntesis de ácido 3-[2-(glicilamino)fenil]propanoico (**n.º B31**). A una solución de **n.º B30** (10 g, 31,1 mmol, 1 equiv.) en acetato de etilo (100 ml) se le añadió HCl/dioxano (70 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se concentró a sequedad. El residuo se recristalizó en terc-butil metil éter (50 ml) para proporcionar **n.º B31** en forma de un sólido (5,9 g, 26,5 mmol, 85,5 % durante tres etapas). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,06 (a, 1H), 8,31 (a, 3H), 7,41 (d, 1H), 7,28 (m, 3H), 3,84 (s, 2H), 2,88 (m, 2H), 2,52 (m, 2H).

**Etapa 5.** Síntesis de ácido 3-(2-[[N-(6-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]hexanoil)glicil]amino]fenil)propanoico (**n.º B32**). A una solución de **n.º B31** (1,11 g, 4,98 mmol, 1 equiv.) y bicarbonato sódico (528 mg, 7,47 mmol, 1,5 equiv.) en tetrahidrofurano (25 ml) y agua (10 ml) se le añadió gota a gota una solución de {6-[[2,5-dioxopirrolidin-1-il]oxi]-6-oxohexil}carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (2,7 g, 5,98 mmol, 1,2 equiv.) en tetrahidrofurano (45 ml) y 1,2-dimetoxietano (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción pH se ajustó a pH 5~6 mediante ácido cítrico, se extrajo con diclorometano (100 ml X 2). La capa orgánica se lavó con salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato sódico, se concentró a sequedad. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluído con diclorometano:metanol de 100:1 a 10:1 para proporcionar **n.º B32**. (1,1 g, 1,97 mmol, 39,7 %) en forma de un sólido. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,31 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,89 (d, 2H), 7,70 (d, 2H), 7,40 (m, 6H), 7,13 (m, 5H), 4,30 (m, 2H), 4,21 (m, 1H), 3,90 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,77 (m, 1H), 2,48 (m, 1H), 2,20 (m, 2H), 1,54 (m, 2H), 1,42 (m, 2H), 1,25 (m, 2H). CLEM (Protocolo I): m/z 580,1 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,315 minutos.

**Etapa 6.** Síntesis de {6-[[2-[[2-3-[[4-[[terc-butoxicarbonil]amino]metil]fenil)sulfonil]amino]-3-oxopropil]fenil]amino]-2-oxoetil]amino]-6-oxohexil}carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (**n.º B33**). La mezcla de **n.º B32** (900 mg, 1,62 mmol, 1 equiv.) y (4-sulfamoilbencil)carbamato de terc-butilo (787 mg, 2,59 mmol, 1,6 equiv.), 4-(dimetilamino)piridina (198 mg, 1,62 mmol, 1 equiv.), clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (369 mg, 1,2 mmol, 0,7 equiv.) en diclorometano (30 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. La mezcla de reacción pH se ajustó a pH 5~6 mediante ácido cítrico, se extrajo con diclorometano (30 ml X 2). La capa orgánica se lavó con salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato sódico, se concentró a sequedad. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluído con diclorometano: metanol de 100:1 a 20:1 para proporcionar **n.º B33** en forma de un sólido (800 mg, 0,972 mmol, 60,0 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,09 (a, 1H), 9,30 (s, 1H), 8,19 (m, 1H), 7,89 (m, 4H), 7,70 (m, 2H), 7,46 (m, 1H), 7,44 (m, 4H), 7,42 (m, 3H), 7,35 (m, 1H), 7,16 (m, 1H), 7,08 (m, 2H), 4,23 (m, 2H), 3,88 (m, 3H), 3,87 (m, 2H), 2,70 (m, 2H), 2,68 (m, 2H), 2,50 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,51 (s, 9H), 1,25 (m, 4H). CLEM (Protocolo J): m/z 726,1 [M-Boc]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,211 minutos.

**Etapa 7.** Síntesis de (6-[[2-[[2-3-[[4-(aminometil)fenil)sulfonil]amino]-3-oxopropil]fenil]amino]-2-oxoetil]amino]-6-oxohexil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (**n.º B34**). A una suspensión de (**n.º B33**) (52,6 mg, 0,063 mmol, 1 equiv.), en diclorometano (3 ml, 0,02 M) se le añadió ácido trifluoroacético (0,6 ml) y se agitó durante 2 horas y después se concentró al vacío. El residuo se destiló azeotrópicamente con acetonitrilo (3 x) para proporcionar **n.º B34** (45,7 mg, 0,063 mmol, cuantitativo asumido) que se usó tal cual en la siguiente etapa sin purificación adicional. CLEM (Protocolo D): m/z 726,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,73 minutos.

**Etapa 8.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[2R,3R,5S,6S)-6-{{(2E,4E)-5-[[3R,4R,5R,7S)-7-{2-[[4-[[3-(2-[[N-(6-[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]hexanoil)glicil]amino]fenil]propanoil)sulfamoil]benzy]amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-

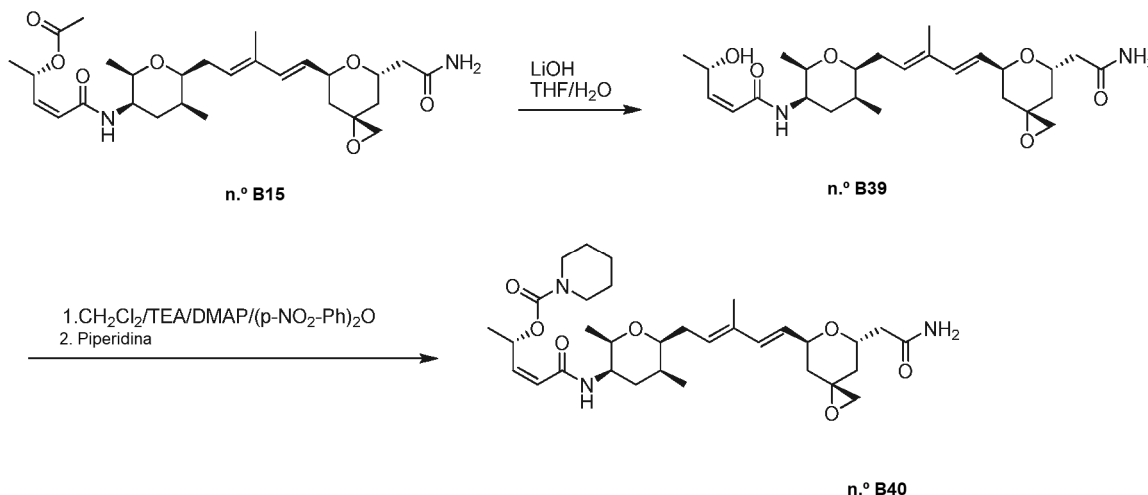
oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B35**). A una solución de **n.º B34** (45,7 mg, 0,063 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (0,5 ml, 0,12 M) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (24,4 mg, 0,189 mmol, 3 equiv.). La mezcla de reacción entera se añadió a una solución enfriada (0 °C) de **n.º B1** (40 mg, 0,063 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (0,5 ml) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de una hora la reacción se concentró al vacío para proporcionar **n.º B35** (55 mg, 0,053 mmol, 70 %) que se usó tal cual, en la siguiente etapa, sin purificación adicional. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1243,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,95 minutos.

**Etapa 9.** Síntesis de acetato de (2*S*,3*Z*)-5-((2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-((2*E*,4*E*)-5-((3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-2-((4-((3-2-((*N*-6-aminohexanoil)glicil)amino)fenil)propanoil)sulfamoil)bencil)amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal formiato (**n.º B36**). A una solución de **n.º B35** (55 mg, 0,053 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida se le añadió piperdina (0,2 ml de una solución madre [preparada disolviendo 0,05 ml en 1 ml *N,N*-dimetilformamida], 0,106 mmol, 2 equiv.). Después de 30 minutos, la reacción se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B36** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 30 mg, 0,027 mmol, 52 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>): tiempo de retención = 7,143 minutos (pureza del = 92 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 1021,4 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 0,67 minutos. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 10,23-10,21 (s a, 1 H D<sub>2</sub>O intercambiable) 8,36-8,31 (m, 1H), 8,25-8,20 (m, 1H), 7,76-7,68 (m, 1H), 7,53-7,42 (m, 3H), 7,14-7,02 (m, 3H), 6,99-6,93 (m, 1H), 6,35-6,21 (m, 2 H), 6,08-6,01 (m, 1H), 5,82-5,76 (m, 1H), 5,61-5,52 (m, 1H), 5,50-5,42 (m, 1H), 4,28-4,16 (m, 4H), 3,82 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 3,57 (d, J = 6,2 Hz, 2H), 3,49-3,42 (m, 1H), 3,21-3,18 (m, 1H), 2,74-2,66 (m, 3H), 2,62-2,49 (m, 3H), 2,31-2,11 (m, 6H), 1,91 (s, 3H), 1,84-1,69 (m, 3H), 1,64 (s, 3H), 1,60-1,41 (m, 6H), 1,32-1,22 (m., 2H), 1,18 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 0,99 (d, J = 6,21 Hz, 3H) -0,88 (d, J = 6,21 Hz, 3H)

**Etapa 10.** Síntesis de acetato de (2*S*,3*Z*)-5-((2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-((2*E*,4*E*)-5-((3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-2-((4-((3-2-((*N*-6-((bromoacetil)amino)hexanoil)glicil)amino)fenil)propanoil)sulfamoil)bencil)amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B37**). A una solución de **n.º B36** (20 mg, 0,018 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (9,8 mg, 0,076 mmol, 4,2 equiv.) y metanol (0,1 ml). La mezcla entera se añadió a una solución enfriada (0 °C) de 1-((bromoacetil)oxi)pirrolidin-2,5-diona (4,2 mg, 0,018 mmol, 1 equiv.) y se agitó a 0 °C durante 5 minutos y después se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 18 horas, la reacción se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B37** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 3,8 mg, 0,003 mmol, 18 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>): tiempo de retención = 7,554 y 7,77 minutos (pureza del 91 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 1141,4 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 0,8 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, METANOL-*d*<sub>4</sub>): 7,66 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,56-7,49 (m, 1H), 7,33-7,26 (m, 2 H), 7,03 (m, 3 H), 6,32-6,23 (m, 1H), 5,94-5,81 (m, 2 H), 5,58 (dd, J = 16,0, 8,0 Hz, 1 H), 5,47-5,39 (m, 1H), 4,46 (s, 2H), 4,43-4,34 (m, 1H), 4,3 (m, 2 H), 3,88 (s, 2 H), 3,68 (s, 2H), 3,67-3,62 (m, 2 H), 3,61-3,55 (m, 1H), 3,52-3,44 (m, 1H), 3,36-3,32 (m, 1 H), 3,11 (t, J = 16 Hz, 1 H), 2,8 (d, J = 8,0, 1H), 2,78-2,72 (m, 2 H), 2,68 (t, J = 8,0, 2 H), 2,57 (d, J = 4,0 Hz, 1 H), 2,45-2,39 (m, 2 H), 2,36 (dd, J = 16,0, 8,0 Hz, 1 H), 2,30 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 2,25 (t, J = 8,0 Hz, 2 H), 2,20-2,09 (m, 1 H), 1,9 (s, 1H), 1,85-1,78 (m, 2 H), 1,75-1,71, (m, 1H), 1,68 (s, 3 H), 1,64-1,54 (m, 3 H), 1,50-1,43 (m, 2 H), 1,27-1,35 (m, 2 H), 1,25 (d, J = 8,0 Hz, 3 H), 1,00 (d, J = 8,0 Hz, 3 H), 1,05-0,87 (d, J = 8,0 Hz, 3 H).

#### Ejemplo A14

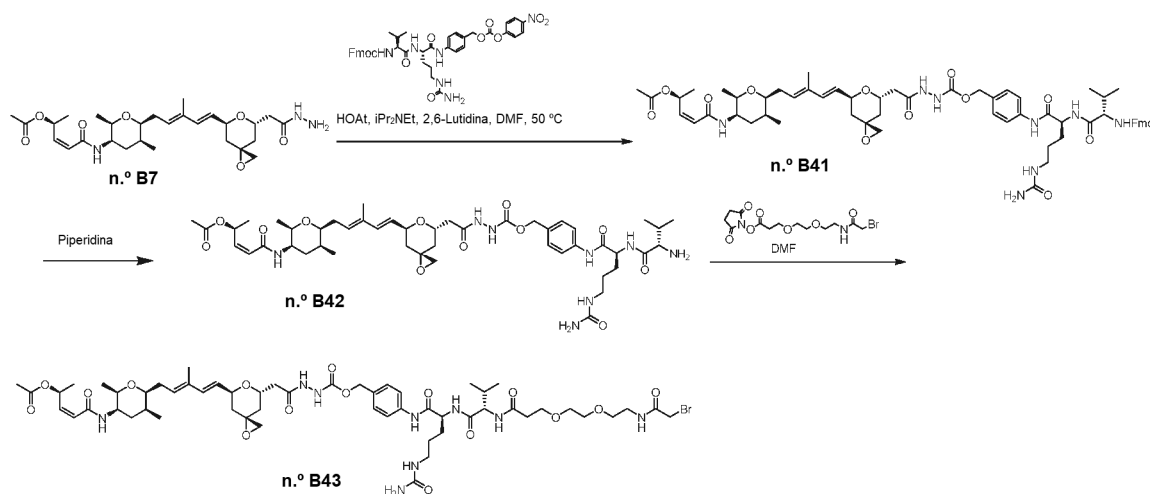
**Preparación de piperidin-1-carboxilato de (2*S*,3*Z*)-5-((2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-((2*E*,4*E*)-5-((3*S*,5*S*,7*S*)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B40**).**



**Etapa 1.** Síntesis de (2Z,4S)-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]-4-hidroxi-pent-2-enamida (**n.º B39**). A una solución de **n.º B15** (38 mg, 0,075 mmol, 1 equiv.) en 4:1 de tetrahydrofurano:agua (2,2 ml) se le añadió hidróxido de litio (15,6 mg, 0,652 mmol, 8,7 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron al vacío. La purificación por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) proporcionó el **n.º B39** en forma de un sólido. Rendimiento: 16,7 mg, 0,035 mol, 47 %. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, J en Hz) δ 7,76 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 7,31 (s, 1 H), 6,77 (s, 1 H), 6,27 (d, J = 16,0 Hz, 1 H), 5,97 (d, J = 11 Hz, 1 H), 5,86 (dd, J = 11,7 y 7,0 Hz, 1 H), 5,59 (dd, J = 16,0 y 5,5 Hz, 1 H), 5,54-5,47 (m, 1 H), 5,22-5,12 (m, 1 H), 5,10 (d, J = 4,7 Hz, 1 H), 4,58-4,48 (m, 1 H), 4,35-4,25 (m, 1 H), 3,69-3,59 (m, 2 H), 3,54-3,46 (m, 1 H), 2,64-2,52 (m, 3 H), 2,37-2,14 (m, 3 H), 1,87-1,73 (m, 3 H), 1,72-1,60 (m, 6 H), 1,37 (dd, J = 13,3 y 6,2 Hz, 1 H), 1,11 (d, J = 6,2 Hz, 3 H), 1,06 (d, J = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, J = 7,4 Hz, 3 H). HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 7,15 minutos (pureza del=100 %). CLEM (Protocolo C): m/z 499,3 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,18 minutos. **Etapa 2.** Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo **n.º B40**: A una solución de **n.º B39** (106 mg, 0,222 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (3 ml) se le añadieron trietilamina (79 mg, 0,777 mmol, 3,5 equiv.), 4-N,N'-dimetilaminopiridina (18,9 mg, 0,155 mmol, 0,7 equiv.) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (207 mg, 0,666 mmol, 3 equiv.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A 1/5 de esta mezcla se le añadió piperidina (18,9 mg, 0,222 mmol, 1 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas, se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento D\*) para proporcionar **n.º B40**. Rendimiento 2,7 mg, 0,021 mmol, 9,5 %. HPLC (Protocolo B) m/z 588,4 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 2,82 minutos (pureza del= 100 %).

### Ejemplo A15

**Preparación de N-[3-(2-{2-[(bromoacetil)amino]etoxi}etoxi)propanoil]-L-valil-N-[4-(((2-[(3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B43**).**



**Etapa 1.** Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-[4-(((2-[(3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B41**). A una solución de **n.º B7** de (56 mg, 0,1 mmol, 1 equiv.) en N,N-dimetilformamida (2,6 ml) se le añadieron N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil]-L-ornitinamida (FMocValCitPABC-PNP, WO04010957, 121 mg, 0,15 mmol, 1,5 equiv.) N,N'-diisopropiletilamina (56 mg, 0,4 mmol, 4,0 equiv.), 2,6-dimetilpiridina (45 mg, 0,4 mmol, 4,0 equiv.) y 3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-ol (14,3 mg, 0,105 mmol, 1,05 equiv.). Después de agitar a 50 °C durante 1,5 horas, la mezcla de reacción se concentró al vacío y el material en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B41** en forma de un sólido. Rendimiento: 72 mg, 0,06 mmol, 59 %. CLEM (Protocolo D): m/z 1183,5 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,95 minutos.

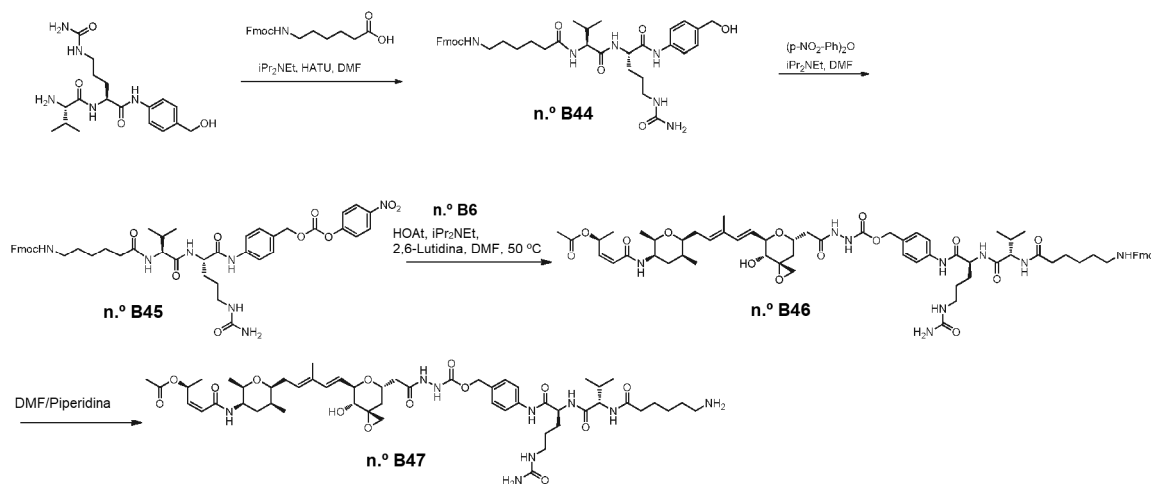
**Etapa 2.** Síntesis de L-valil-N-[4-(((2-[(3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B42**). A una solución de **n.º B41** (50 mg, 0,043 mmol, 1 equiv.) en N,N-dimetilformamida (0,7 ml) se le añadió piperidina (66 mg, 0,78 mmol, 20 equiv.) y la mezcla se agitó durante 20 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el material en

bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B42**. Rendimiento: 31 mg, 0,033 mmol, 76 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  939,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,66 minutos.

5 **Etapa 3.** Síntesis de N-[3-(2-{2-[(bromoacetil)amino]etoxi}etoxi)propanoil]-L-valil-N-[4-(((2-[(3S,5S,7S)-7-  
 {(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-  
 metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5 il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-carbamoil-L-  
 10 ornitinamida (**n.º B43**). A una solución de **n.º B42** (10 mg, 0,011 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,2 ml) se le añadió 2-bromo-N-[2-(2-{3-[(2,5-dioxipirrolidin-1-il)oxi]-3-oxopropoxi}etoxi)etil]acetamida (4,3 mg, 0,011 mmol, 1 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se diluyó con dimetilsulfóxido (0,2 ml) y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B43** en forma de un sólido. Rendimiento: 8,8 mg, 0,007 mmol, 66 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 7,69 minutos (pureza del = 71 %). CLEM (Protocolo A):  $m/z$  1220,4 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,77 minutos.

### Ejemplo A16

15 **Preparación de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-[4-(((2-[(3R,5S,7R,8R)-7-{(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B47**).**



20 **Etapa 1.** Síntesis de N-(6-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino)hexanoil)-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-ornitinamida (**n.º B44**). Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (3,8 ml, 22,12 mmol, 1,9 equiv.) a una solución de ácido 6-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino)hexanoico (4,2 g, 11,80 mmol, 1 equiv.) y hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (HATU, 5,6 g, 14,75 mmol, 1,25 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (50 ml, 0,24 M) a temperatura ambiente y se agitó durante diez minutos. Después, se añadió a la mezcla L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-ornitinamida (del documento WO04010957 5,6 g, 14,75 mmol, 1,25 equiv.). Después de 15 horas, la mezcla de reacción precipitó añadiendo diclorometano y se filtró para obtener **n.º B44** en forma de un sólido de color blanquecino. Rendimiento: 6,9 g, 9,6 mmol, 82 %. CLEM 715,6 (M+H)<sup>+</sup>

30 **Etapa 2.** Síntesis de 4-nitrofenilcarbonato de 4-[(N~5~-carbamoil-N~2~-{(3S)-3-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino)hexanoil)amino]-4-metilpent-1-en-2-il]-L-ornitil)amino]bencilo (**n.º B45**). Una solución de **n.º B44** (500 mg, 0,7 mmol, 1 equiv.) y 4-nitrofenilcarbonato (638 mg, 2,1 mmol, 3 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (3 ml, 0,2 M) se trató con *N,N*-diisopropiletilamina (365 µl, 2,1 mmol, 3 equiv.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío, se absorbió sobre SiO<sub>2</sub> y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Gradiente: metanol del 0 al 25 % en diclorometano) para dar **n.º B45** en forma de un sólido. Rendimiento: 402 mg, 0,476 mmol, 68 %. CLEM (Protocolo L):  $m/z$  880,7 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención 3,39.

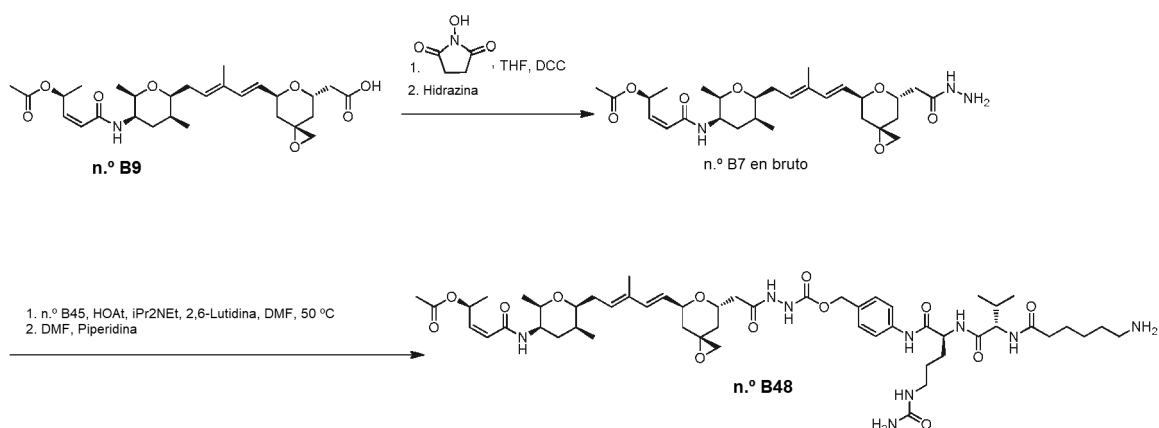
35 **Etapa 3.** Síntesis de N-(6-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino)hexanoil)-L-valil-N-[4-(((2-[(3R,5S,7R,8R)-7-  
 {(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-  
 metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-  
 40 carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B46**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del en 10 % de 71 mg (0,13 mmol) de **n.º B6** y 171 mg (0,194 mmol) de **n.º B45** usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B41**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1290,5 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,91 minutos.

**Etapa 4.** Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-[4-(((2-[(3R,5S,7R,8R)-7-{(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B47**). A una

solución de **n.º B46** (19 mg, 0,015 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,35 ml) se le añadió piperidina (25 mg, 0,3 mmol, 20 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se diluyó con dimetilsulfóxido (0,7 ml) y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B47** en forma de un sólido. Rendimiento: 3 mg, 0,0028 mmol, 18 %. HPLC (Protocolo A<sup>h</sup>) tiempo de retención = 6,65, 6,69 minutos (pureza del = 91 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 1069,9 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,61 minutos.

### Ejemplo A17

**Preparación de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-[4-(((2-(((3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-diox-espiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B48).**

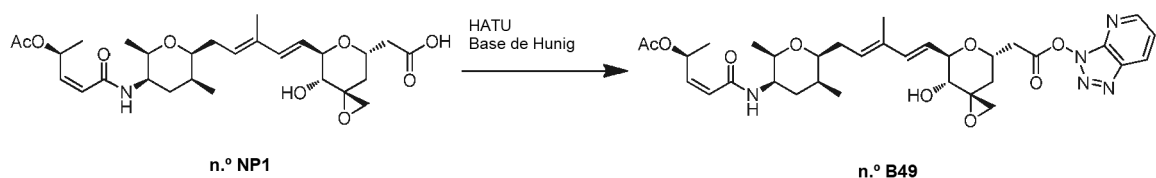


**Etapa 1.** El compuesto **n.º B9** (113 mg, 0,217 mmol) se convirtió en **n.º B7** en bruto como en el procedimiento general E. CLEM (protocolo D): *m/z* 534,1 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,77 min. El material en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional

**Etapa 2.** Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-[4-(((2-(((3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxoespiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B48**). A una solución de **n.º B7** en bruto (60 mg, 0,11 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (2,8 ml) se le añadieron 2,6-dimetilpiridina (48 mg, 0,448 mmol, 4 equiv.), *N,N'*-diisopropiletilamina (57,9 mg, 0,448 mmol, 4 equiv.) y HOAt (15,2 mg, 0,112 mmol, 1 equiv.). La reacción se calentó a 50 °C y se agitó durante 1,5 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió lentamente piperidina (191 mg, 2,24 mmol, 20 equiv.) y se agitó durante 2,0 horas. La reacción se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento C<sup>\*</sup>) para producir **n.º B48** en forma de un sólido. Rendimiento 6,4 mg, 0,005 mmol, 5,2 %. HPLC (Protocolo F): *m/z* 1052,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 7,114 minutos (pureza del 100 %).

### Ejemplo A18

**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)etil]-1,6-dioxoespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B49).**

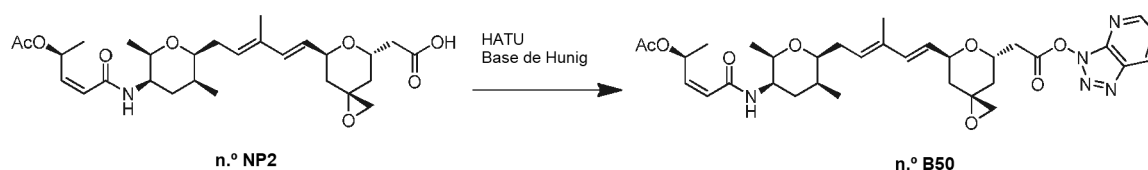


**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)etil]-1,6-dioxoespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B49**). Una mezcla de **n.º NP1** (1,5 g, pureza del -50 %, 2,8 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 1,07 g, 4,5 mmol, 1,6 equiv.) y *N,N'*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 1,0 ml) en *N,N*-dimetilformamida (7,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. La mezcla de reacción se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F<sup>\*</sup>) para proporcionar **n.º B49** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 730,7 mg,

rendimiento del 80 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 11,15 minutos (pureza del 92 %). HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  654,313  $[M+H]^+$ . RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  8,84 (dd,  $J = 4,4, 1,2, 1H$ ), 8,74 (dd,  $J = 8,3, 1,2, 1H$ ), 7,77 (d,  $J = 8,2, 1H$ ,  $D_2O$  intercambiable), 7,66 (dd,  $J = 8,3, 4,4, 1H$ ), 6,45 (d a,  $J = 15, 8, 1H$ ), 6,3 (ddc,  $J = 1,5, 6,5, 6,5, 1H$ ), 6,09 (dd,  $J = 1,3, 11,7, 1H$ ), 5,86 (dd,  $J = 11,7, 7,4, 1H$ ), 5,62 (dd,  $J = 16,0, 5,0, 1H$ ), 5,38 (dd a,  $J = 7,4, 7,4, 1H$ ), 5,18 (d,  $J = 6,0, D_2O$  intercambiable), 4,48 (m, 1H), 4,37 (dd,  $J = 4,0, 4,0, 1H$ ), 3,61 (m, 1H), 3,54 (dc, 2,1, 6,5, 1H), 3,37 (ddd,  $J = 6,9, 6,9, 3,1, 1H$ ), 3,34 (m, 2H), 3,26 (dd,  $J = 16,0, 9,7, 1H$ ), 2,21 (m, 1H), 2,14 (m, 1H), 2,10 (dd,  $J = 12,7, 8,9, 1H$ ), 1,99 (s, 3H), 1,74 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,59 (dd,  $J = 13,0, 3,3, 1H$ ), 1,50 (m, 1H), 1,25 (d,  $J = 6,4, 3H$ ), 0,95 (d,  $J = 6,5, 3H$ ), 0,86 (d,  $J = 7,0, 3H$ ).

### Ejemplo A19

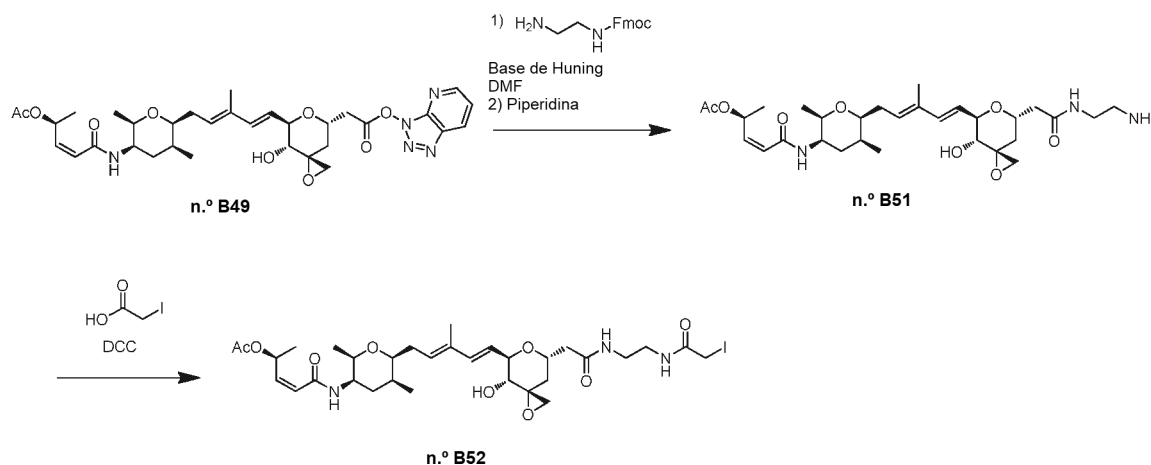
- 10 Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-((3S,5S,7S)-7-[2-oxo-2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)etil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B50).



- 15 *Etapa 1.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-((3S,5S,7S)-7-[2-oxo-2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)etil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B50). Una mezcla de n.º NP2 (284 mg, 92 % puro, 0,47 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-aza-benzotriazol-1-il)- $N,N,N'$ -tetrametiluronio (HATU, 220 mg, 0,58 mmol, 1,2 equiv.) y  $N,N'$ -diisopropiletilamina (base de Hunig, 0,1 ml) en  $N,N$ -dimetilformamida (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos. La mezcla de reacción se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar n.º B50 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 307,0 mg, rendimiento del 88 % HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 13,12 minutos (pureza del 94 %). HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  638,320  $[M+H]^+$ . RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  8,83 (dd,  $J = 4,4, 1,2, 1H$ ), 8,73 (dd,  $J = 8,5, 1,2, 1H$ ), 7,76 (d,  $J = 8,1, 1H$ ,  $D_2O$  intercambiable), 7,66 (dd,  $J = 8,5, 4,4, 1H$ ), 6,39 (d a,  $J = 15,8, 1H$ ), 6,36 (ddc,  $J = 1,5, 6,5, 6,5, 1H$ ), 6,09 (dd,  $J = 1,5, 11,7, 1H$ ), 5,87 (dd,  $J = 11,7, 7,5, 1H$ ), 5,66 (dd,  $J = 16,1, 4,9, 1H$ ), 5,44 (dd a,  $J = 7,1, 7,1, 1H$ ), 4,71 (ddd,  $J = 4,4, 4,4, 4,4, 1H$ ), 4,51 (m, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,57 (dc,  $J = 2,3, 6,6, 1H$ ), 3,41 (ddd,  $J = 6,9, 6,9, 3,1, 1H$ ), 3,36 (dd,  $J = 16,0, 4,1, 1H$ ), 3,33 (dd,  $J = 16,1, 10,0, 1H$ ), 2,74 (d,  $J = 4,8, 1H$ ), 2,70 (d,  $J = 4,8, 1H$ ), 2,24 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,85 (m, 1H), 1,83 (m, 1H), 1,70 (dd,  $J = 13,0, 7,5, 1H$ ), 1,66 (dd,  $J = 13,5, 7,9, 1H$ ), 1,52 (m, 1H), 1,25 (d,  $J = 6,8, 3H$ ), 1,00 (d,  $J = 6,5, 3H$ ), 0,89 (d,  $J = 7,5, 3H$ ).

### Ejemplo A20

- 30 Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-[2-((2-((yodoacetil)amino)etil)amino)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B52).



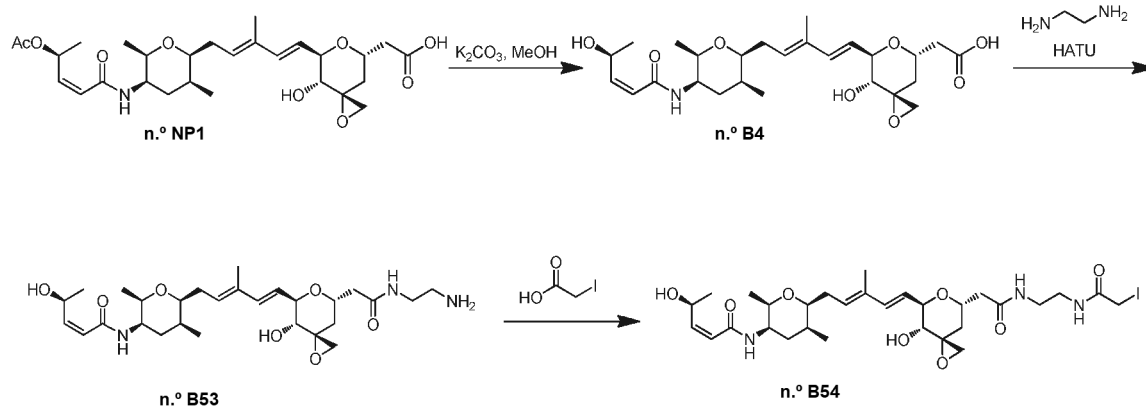
- 35 *Etapa 1.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-[2-((2-aminooetil)amino)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B51). A una solución de n.º B49 (50,5 mg, pureza del 92 %, 0,08

mmol, 1,0 equiv.) y (2-aminoetil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmtilo (32,1 mg, 0,11 mmol, 1,4 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (1,0 ml) se le añadió *N,N'*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 20 µl) con agitación. Después, la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A la solución de reacción se le añadió lentamente piperidina (30 µl, 0,35 mmol, 4,4 equiv.) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B51** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 38,8 mg, rendimiento del 86 % HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 6,61 minutos (pureza del 97 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 578,8 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapa 2.** Síntesis de acetato de (2*S*,3*Z*)-5-((2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-[(2*E*,4*E*)-5-((3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-4-hidroxi-7-[2-((2-[[yodoacetil]amino]etil)amino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B52**). Una solución de ácido yodoacético (40,3 mg, 0,22 mmol, 7,3 equiv.) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 61,6 mg, 0,3 mmol, 10,0 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (2,5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y la solución de color amarillo claro se añadió a **n.º B51** (21,1 mg, pureza del 85,0 %, 0,031 mmol, 1,0 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,2 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después, la mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B52** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 10,3 mg, rendimiento del 37 % HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 8,96 minutos (pureza del 37 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 746,3 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 8,22 (m, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,91 (m, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,80 (d, *J* = 7,8, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,36 (dc, *J* = 6,0, 6,0, 1H), 6,29 (d a, *J* = 16,0, 1H), 6,11 (d, *J* = 11,7, 1H), 5,86 (dd, *J* = 11,7, 7,8, 1H), 5,60 (dd, *J* = 16,0, 5,5, 1H), 5,51 (dd a, *J* = 6,6, 6,6, 1H), 5,02 (d, *J* = 5,0, D<sub>2</sub>O intercambiable, 1H), 4,26 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 3,60 (s, 2H), 3,51 (dd a, *J* = 6,2, 6,2, 1H), 3,24 (m, 1H), 3,08 (s a, 4H), 2,76 (d, *J* = 5,1, 1H), 2,60 (d, *J* = 5,1, 1H), 2,51 (m, 1H), 2,47 (m, 1H), 2,28 (m, 1H), 2,18 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,86 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,49 (dd, *J* = 12,5, 2,7, 1H), 1,25 (d, *J* = 6,6, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,5, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,0, 3H).

### Ejemplo A21

**Preparación de (2*Z*,4*S*)-4-hidroxi-*N*-((2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-[(2*E*,4*E*)-5-((3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-4-hidroxi-7-[2-((2-[[yodoacetil]amino]etil)amino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-3-il)pent-2-enamida (**n.º B54**).**



**Etapa 1.** Síntesis de ácido [(3*R*,5*S*,7*R*,8*R*)-8-hidroxi-7-((1*E*,3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-((2*Z*,4*S*)-4-hidroxipent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (**n.º B4**). Una mezcla de **n.º NP1** (192 mg, pureza de ~50 %, 0,18 mmol, 1,0 equiv.), carbonato potásico (300 mg, 2,4 mmol, 13,5 equiv.) y metanol (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético, se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento G) para proporcionar **n.º B4** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 50,2 mg. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 7,39 minutos (pureza del 96 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 494,3 [M+H]<sup>+</sup>.

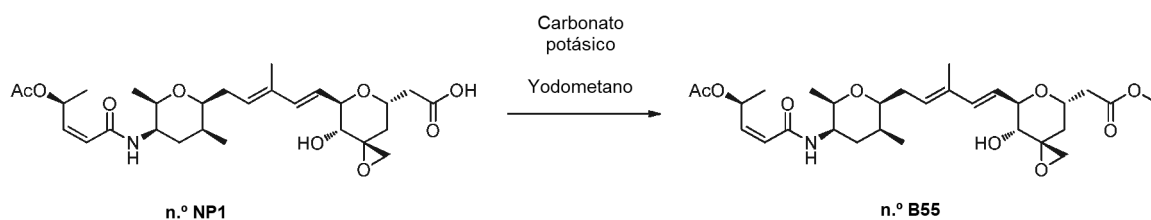
**Etapa 2.** Síntesis de (2*Z*,4*S*)-*N*-[(2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-((2*E*,4*E*)-5-((3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-[2-((2-aminoetil)amino)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-3-il)-4-hidroxipent-2-enamida (**n.º B53**). Una solución de **n.º B4** (23,4 mg, 0,047 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 34,0 mg, 0,09 mmol, 2,0 equiv.) y *N,N'*-diisopropiletilamina (20,0 µl) en *N,N*-dimetilformamida (1,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta solución se le añadió etano-1,2-diamina (80 µl, 1,3 mmol, ~30 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B53** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 31 mg. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 5,58 minutos (pureza del 50 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 536,4 [M+H]<sup>+</sup>.



**Etapa 3.** Síntesis de (2Z,4S)-4-hidroxi-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-[(2-[(yodoacetil)amino]etil]amino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]pent-2-enamida (**n.º B54**). Una solución de ácido yodoacético (35 mg, 0,18 mmol, 6 equiv.) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 49,8 mg, 0,24 mmol, 8 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se añadió a **n.º B53** (31,0 mg, pureza del ~50 %, -0,03 mmol, 1,0 equiv.) en *N,N*-dimetil-formamida (0,2 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 hora. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B54** en bruto en forma de un polvo de color blanco (23,0 mg). Este material se volvió a purificar con un sistema de gradiente diferente, que proporcionó **n.º B54** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 15,9 mg, rendimiento del 27 %, durante tres etapas. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 7,10 minutos (pureza del 92 %). CLEM (Protocolo M) *m/z* 704,2 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 8,22 (m, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,91 (m, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,77 (d, *J* = 7,8, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,28 (d a, *J* = 16,0, 1H), 5,98 (d, *J* = 11,7, 1H), 5,86 (dd, *J* = 11,7, 7,0, 1H), 5,60 (dd, *J* = 16,0, 5,5, 1H), 5,51 (dd a, *J* = 6,6, 6,6, 1H), 5,16 (dc, *J* = 6,2, 6,2, 1H), 5,11 (d, *J* = 3,9, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 5,03 (d, *J* = 4,5, D<sub>2</sub>O intercambiable, 1H), 4,26 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 3,60 (s, 2H), 3,51 (dd a, *J* = 6,5, 6,5, 1H), 3,25 (m, 1H), 3,08 (s a, 4H), 2,75 (d, *J* = 4,7, 1H), 2,60 (d, *J* = 4,7, 1H), 2,51 (m, 1H), 2,47 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,22 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,49 (dd, *J* = 12,5, 2,3, 1H), 1,11 (d, *J* = 6,6, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,0, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,4, 3H).

### Ejemplo A22

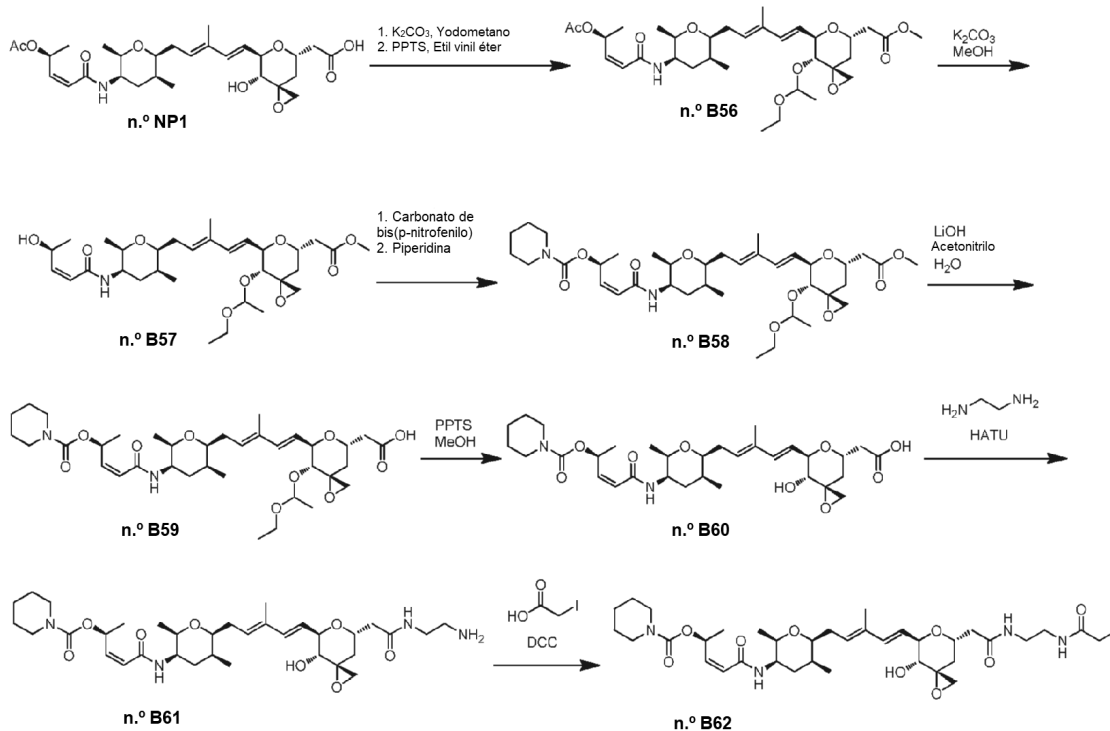
**Preparación de [(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (**n.º B55**).**



**Etapa 1.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (**n.º B55**). Una mezcla de **n.º NP1** (9,9 mg, pureza del 92 %, 0,018 mmol, 1,0 equiv.), carbonato potásico (40 mg, 0,33 mmol, 18 equiv.) y yodometano (30 µl, 0,31 mmol, 17 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (500 µl) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético, se filtró y después se neutralizó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B55** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 7,8 mg, rendimiento del 77 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,7 minutos (pureza del 94 %). CLEM (Protocolo M) *m/z* 550,5 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 7,80 (d, *J* = 8,1, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,36 (ddc, *J* = 1,2, 6,8, 6,8, 1H), 6,28 (d a, *J* = 15,9, 1H), 6,11 (dd, *J* = 1,2, 11,7, 1H), 5,87 (dd, *J* = 11,7, 7,7, 1H), 5,58 (dd, *J* = 16,1, 5,0, 1H), 5,52 (dd a, *J* = 7,4, 7,4, 1H), 5,02 (d, *J* = 5,8, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,29 (m, 1H), 4,27 (dd, *J* = 5,3, 5,3, 1H), 3,65 (m, 2H), 3,60 (s, 3H), 3,51 (ddd, *J* = 7,0, 7,0, 2,5, 1H), 3,25 (dd, *J* = 5,8, 5,3, 1H), 2,76 (d, *J* = 5,0, 1H), 2,65 (dd, 15,4, 8,7, 1H), 2,58 (d, *J* = 5,0, 1H), 2,57 (dd, *J* = 15,4, 5,0), 2,30 (m, 1H), 2,21 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,86 (dd, *J* = 13,2, 7,6, 1H), 1,69 (s, 3H), 1,66 (m, 1H), 1,53 (dd, 13,2, 3,9, 1H), 1,25 (d, *J* = 6,1, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,4, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,4, 3H).

## Ejemplo A23

Preparación de ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-3,6-dimetil-5-((2Z,4S)-4-[(piperidin-1-ilcarbonyl)oxi]pent-2-enil)amino)tetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)acético (n.º B60) y piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-((2-((yodoacetil)amino)etil)amino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B62).



**Etapa 1.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil)amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-(1-etoxietoxi)-1,6-dioxaespiro[2.5] oct-5-il)acetato de metilo (n.º B56). A una mezcla de n.º NP1 (195 mg, pureza del ~50 %, 0,18 mmol, 1,0 equiv.) y carbonato potásico (200 mg, 1,6 mmol, 9 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (4,0 ml) se le añadió yodometano (500 µl, 18 equiv.). La solución resultante se agitó durante 120 minutos. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se repartió entre agua y acetato de etilo (10 ml en cada fase). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporó a presión reducida para proporcionar n.º B55 en forma de una película (191,2 mg, pureza del ~50 %). A continuación, se mezcló n.º B55 en bruto (191,0 mg, 0,18 mmol, 1,0 equiv.) con *p*-toluenosulfonato de piridinio (PPTS, 56,1 mg, 0,22 mmol, 1,2 equiv.) y se agitó etil vinil éter (2,5 ml, 43 mmol), en diclorometano anhidro (2,0 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se evaporó parcialmente a presión reducida y después se repartió entre acetato de etilo (10 ml)/solución acuosa de bicarbonato sódico (saturada, 10 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se evaporó a presión reducida para proporcionar n.º B56 (187,1 mg) HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 13,2 minutos (pureza del 50 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 549,5 [M+H-CHCH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> que se usó tal cual en la siguiente reacción.

**Etapa 2.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-8-(1-etoxietoxi)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enil)amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)acetato de metilo (n.º B57). Una suspensión de n.º B56 (187,1 mg, pureza del ~50 %, 0,15 mmol, 1,0 equiv.), carbonato potásico (120 mg, 0,98 mmol, 6,5 equiv.) en metanol (4 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida para proporcionar n.º B57 (171,5 mg) que se usó tal cual en la siguiente reacción. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,9 minutos (pureza del 50 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 507,5 [M+H-CHCH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>.

**Etapa 3.** Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-(1-etoxietoxi)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B58). Una solución de n.º B57 (171 mg, pureza del 50 %, 0,15 mmol, 1,0 equiv.), bis(*p*-nitrofenil)carbonato (320,1 mg, 1,0 mmol, 7 equiv.), 4-(dimetilamino)piridina (9,8 mg, 0,08 mmol, 0,5 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 150 µl) en diclorometano (4,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. A la solución de reacción se le añadió lentamente piperidina (500 µl, 5,8 mmol, 38 equiv.) y la solución de color amarillo resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió agua enfriada con hielo (20 ml) y el disolvente orgánico se retiró por evaporación a presión reducida. El

precipitado formado de esa manera se recogió por filtración y después se secó al vacío para proporcionar **n.º B58** (347,0 mg), que se usó como tal en la siguiente reacción HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 13,20 minutos (pureza del 25 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  691,7  $[M+H]^+$ .

5 *Etapa 4.* Síntesis de ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-3,6-dimetil-5-((2Z,4S)-4-[(piperidin-1-ilcarbonil)oxi]pent-2-enoil)amino]tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-(1-etoxietoxi)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acético (**n.º B59**). A una solución de **n.º B58** (347 mg, pureza del ~25 %, 0,13 mmol, 1,0 equiv.) en acetonitrilo (10 ml) se le añadió hidróxido de litio 1 M (1 ml) y agua (1 ml). La solución turbia resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y gradualmente se volvió transparente. Se añadió hidróxido de litio 1 M adicional (1,0 ml) y la solución se agitó adicionalmente durante 2 horas. La mezcla de reacción se repartió entre n-butanol (30 ml) y agua (30 ml). La capa superior se lavó con H<sub>2</sub>O (20 ml) y después se evaporó a sequedad a presión reducida para proporcionar **n.º B59** (280,2 mg) que se usó como tal en la siguiente reacción HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 7,43 minutos (pureza del 30 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  677,4  $[M+H]^+$ .

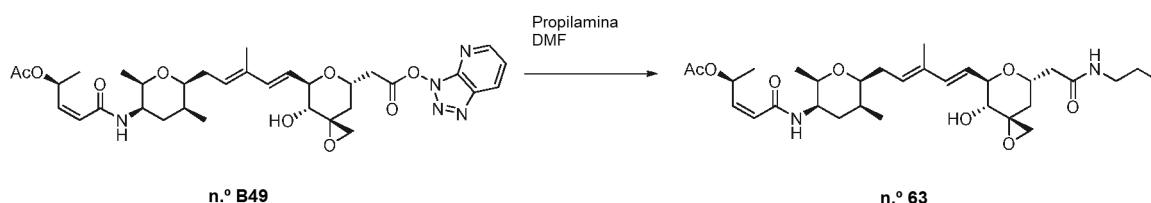
15 *Etapa 5.* Síntesis de ácido [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-3,6-dimetil-5-((2Z,4S)-4-[(piperidin-1-ilcarbonil)oxi]pent-2-enoil)amino]tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acético (**n.º B60**). Una solución de **n.º B59** (280,2 mg, pureza de ~30 %, 0,12 mmol, 1,0 equiv.) y p-toluenosulfonato de piridinio (PPTS, 250,4 mg, 1 mmol, 8,0 equiv.) en metanol (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y después se mantuvo a 4 °C durante 18 horas. Después, la mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B60** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 78,4 mg, (rendimiento del 40 %, durante las etapas 1-5) HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,84 minutos (pureza del 96,7 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  605,4  $[M+H]^+$ .

25 *Etapa 6.* Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2-aminooetil)amino]-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B61**). Una solución de **n.º B60** (38,2 mg, 0,06 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU, 40,1 mg, 0,1 mmol, 1,7 equiv.) y N,N'-diisopropiletilamina (base de Hunig, 20,0 µl) en N,N-dimetilformamida (1,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. A esta solución se le añadió 1,2-etilendiamina (120 µl, 2 mmol, 33 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 20 minutos. La mezcla de reacción se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B61** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 14,2 mg, xx%) HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 7,86 minutos (pureza del 70 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  647,8  $[M+H]^+$ .

35 *Etapa 7.* Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-((2-(yodoacetil)amino)etil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B62**). Una solución de ácido yodoacético (20,3 mg, 0,1 mmol, 7 equiv.) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 31,6 mg, 0,15 mmol, 10 equiv.) en N,N-dimetilformamida (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se añadió a un vial que contenía **n.º B61** (14,0 mg, ~70 % puro, 0,015 mmol, 1,0 equiv.) en N,N-dimetilformamida (0,2 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B62** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 3,7 mg, (11 %, durante las 6-7) HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,48 minutos (pureza del 94 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  815,4  $[M+H]^+$ , 837,4  $[M+Na]^+$ . RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, J en Hz) 8,22 (m, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,91 (m, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,78 (d, J = 7,8, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,29 (d a, J = 16,1, 1H), 6,22 (dc, J = 7,0, 7,0, 1H), 6,09 (d, J = 11,7, 1H), 5,89 (dd, J = 11,3, 7,4, 1H), 5,61 (dd, J = 16,0, 5,1, 1H), 5,51 (dd a, J = 6,2, 6,2, 1H), 5,03 (d, J = 5,5, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,26 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 3,60 (s, 2H), 3,51 (dd a, J = 6,2, 6,2, 1H), 3,30 (m, 4H), 3,24 (dd, J = 5,0, 5,0, 1H), 3,12-3,08 (m, 4H), 3,00 (d, 1H), 2,80 (s, 4H), 2,75 (d, J = 5,1, 1H), 2,60 (d, J = 5,1, 1H), 2,49 (m, 2H), 2,28 (m, 1H), 2,21 (m, 1H), 1,89 (dd, J = 13,2, 8,6, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,50 (dc, J = 13,2, 3,1, 1H), 1,52 (m, 2H), 1,42 (m, 4H), 1,25 (d, J = 6,2, 3H), 1,07 (d, J = 6,0, 3H), 0,95 (d, J = 7,4, 3H).

#### Ejemplo A24

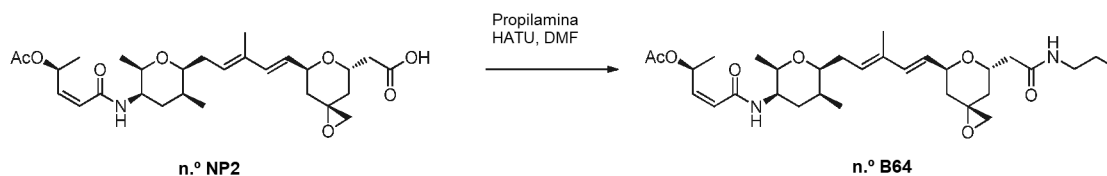
50 **Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B63**).**



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B63**). A una solución de **n.º B49** (43,2 mg, pureza del 92,1 %, 0,065 mmol, 1,0 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (1,0 ml) se le añadió propilamina pura (30 µl, 0,5 mmol, 7,0 equiv.). La solución resultante se agitó durante 10 minutos. La mezcla de reacción se repartió entre H<sub>2</sub>O y acetato de etilo (10 ml cada uno). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporó a presión reducida para proporcionar **n.º B63** Rendimiento: 40,4 mg, 100 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,73 minutos (pureza del 89 %). HRESIMS (Protocolo O) *m/z* 577,3478 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 7,83 (t, *J* = 6,0, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,81 (d, *J* = 8,1, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,36 (ddc, *J* = 1,4, 6,5, 6,5, 1H), 6,28 (d a, *J* = 15,9, 1H), 6,11 (dd, *J* = 1,4, 11,7, 1H), 5,87 (dd, *J* = 11,7, 7,5, 1H), 5,59 (dd, *J* = 15,9, 5,4, 1H), 5,51 (dd a, *J* = 7,1, 7,1, 1H), 5,02 (d, *J* = 5,4, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,26 (dd, *J* = 5,0, 5,0, 1H), 4,24 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,49 (ddd, *J* = 7,0, 7,0, 2,6, 1H), 3,24 (dd, *J* = 5,0, 5,0, 1H), 3,01 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,75 (d, *J* = 5,2, 1H), 2,58 (d, *J* = 5,2, 1H), 2,52 (m, 1H), 2,29 (ddd, *J* = 15,5, 7,1, 7,1, 1H), 2,21 (m, 1H), 2,20 (dd, *J* = 14,0, 4,8, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,83 (dd, *J* = 13,4, 5,0, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,48 (dd, 12,7, 3,9, 1H), 1,38 (dc, *J* = 7,5, 7,5, 2H), 1,25 (d, *J* = 6,6, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,8, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,5, 3H), 0,82 (t, *J* = 7,5, 3H).

### Ejemplo A25

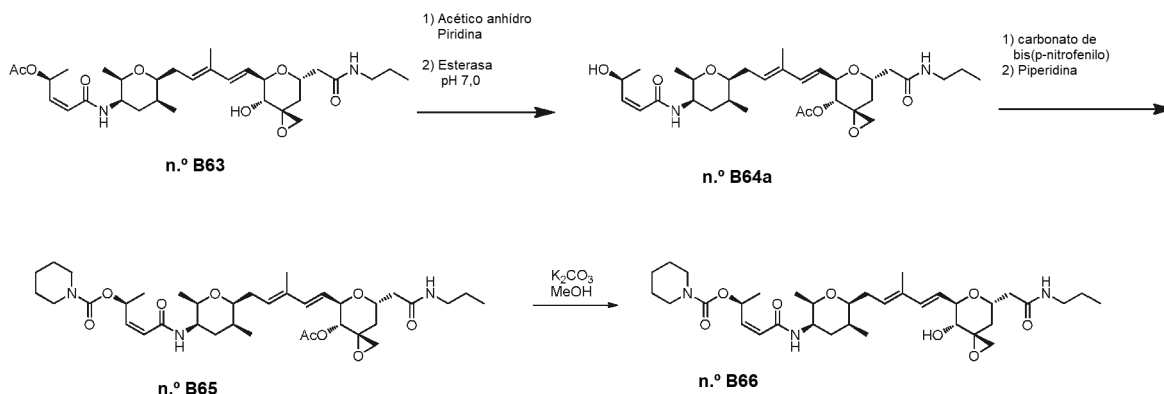
**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-((3S,5S,7S)-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B64**).**



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-((3S,5S,7S)-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B64**). Una solución de **n.º NP2** (28,7 mg, pureza del 91 %, 0,055 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 24,8 mg, 0,065 mmol, 1,2 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 30 µl) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta solución se le añadió propilamina pura (30 µl, 0,5 mmol, 7,0 equiv.) y la mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B64** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 34,1 mg, 86 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 13,11 minutos (pureza del 100 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 561,6 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 7,83 (t, *J* = 6,0, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,81 (d, *J* = 8,0, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,36 (ddc, *J* = 1,6, 7,4, 6,6, 1H), 6,24 (d a, *J* = 16,0, 1H), 6,10 (dd, *J* = 1,6, 12,0, 1H), 5,87 (dd, *J* = 11,8, 7,6, 1H), 5,58 (dd, *J* = 15,9, 5,4, 1H), 5,50 (dd a, *J* = 7,3, 7,3, 1H), 4,55 (ddd, *J* = 5,3, 5,3, 5,3, 1H), 4,29 (dddd, *J* = 9,5, 5,3, 5,3, 5,3, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,48 (ddd, *J* = 7,1, 7,1, 2,6, 1H), 3,01 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,63 (d, *J* = 5,0, 1H), 2,61 (d, *J* = 5,0, 1H), 2,59 (dd, *J* = 14,2, 8,8, 1H), 2,31 (ddd, *J* = 16,1, 7,5, 7,0, 1H), 2,21 (dd, *J* = 14,1, 5,0, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,96 (s, 3H), 1,81 (m, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,77 (dd, *J* = 13,0, 4,0, 1H), 1,69 (s, 3H), 1,66 (m, 2H), 1,37 (dc, *J* = 7,5, 7,5, 2H), 1,36 (m, 1H), 1,25 (d, *J* = 6,6, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,8, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,5, 3H), 0,82 (t, *J* = 7,5, 3H).

## Ejemplo A26

**Preparación de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B66).**



5

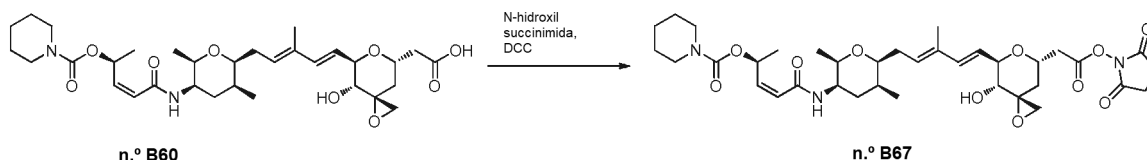
**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (3R,4R,5R,7S)-5-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enil)amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-4-ilo (n.º B64a). A una solución de n.º B63 (44,0 mg, 0,076 mmol, 1,0 equiv.) en piridina (0,5 ml) se le añadió anhídrido acético (150 µl, 1,6 mmol, 21,0 equiv.). Después, la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se transfirió a agua enfriada con hielo (10 ml), se agitó durante 20 minutos y después se repartió entre acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml). La capa orgánica se lavó con agua (3 x 20 ml) y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en dimetilsulfóxido (150 µl) y la solución se añadió lentamente a una solución tampón Tris 1 M (pH 7,0) que contenía una esterasa producida por *Bucillus stearothermophilus* (Sigma 69509, 0,5 mg/ml, 15 ml total). La reacción se agitó durante una hora y después se repartió entre acetato de etilo (2 x 20 ml) y agua (20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 20 ml) y después se evaporaron a presión reducida para proporcionar n.º B64a en forma de un polvo de color blanquecino. Rendimiento: 44,9 mg, (cuantitativo asumido) HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,51 minutos (pureza del 88 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  577,6  $[M+H]^+$ .

**Etapa 2.** Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-(acetiloxi)-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B65). Una solución de n.º B64a (14,7 mg, 0,025 mmol, 1,0 equiv.), bis(p-nitrofenil)carbonato (38,4 mg, 0,13 mmol, 5 equiv.), p-dimetilaminopiridina (1,6 mg, 0,013 mmol, 0,5 equiv.) y *N,N'*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 30 µl) en diclorometano (1 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. A esta solución de reacción se le añadió lentamente piperidina (60 µl, 0,7 mmol, 28 equiv.) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió agua enfriada con hielo (10 ml) y el disolvente orgánico se retiró por evaporación a presión reducida. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y después se evaporó a presión reducida para proporcionar n.º B65. Rendimiento del 26,2 mg, (cuantitativo asumido) HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 13,1 minutos (pureza del 45 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  688,5  $[M+H]^+$ .

**Etapa 3.** Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B66). Una solución de n.º B65 (26,1 mg, 0,017 mmol, 1,0 equiv.), carbonato potásico (51 mg, 0,41 mmol, 24 equiv.) en metanol (1,5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se repartió entre acetato de etilo y agua (10 ml en cada fase). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporó a presión reducida a sequedad, que después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º B66 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 7,3 mg, (44 % durante las etapas 1-3). HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 11,44 minutos (pureza del 96,7 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  646,4  $[M+H]^+$ . RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,83 (t,  $J = 5,6$ , 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  intercambiable), 7,79 (d,  $J = 8,0$ , 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  intercambiable), 6,28 (d a,  $J = 16,1$ , 1H), 6,22 (ddc,  $J = 1,4$ , 6,8, 6,8, 1H), 6,08 (dd,  $J = 1,4$ , 11,8, 1H), 5,88 (dd,  $J = 11,7$ , 7,4, 1H), 5,59 (dd,  $J = 15,7$ , 5,3, 1H), 5,51 (dd a,  $J = 7,0$ , 7,0, 1H), 5,02 (d,  $J = 5,3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  intercambiable), 4,27 (dd,  $J = 5,0$ , 5,0, 1H), 4,23 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,49 (ddd,  $J = 7,0$ , 7,0, 2,6, 1H), 3,30 (m, 4H), 3,24 (dd,  $J = 5,0$ , 5,0, 1H), 3,01 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,75 (d,  $J = 5,2$ , 1H), 2,58 (d,  $J = 5,2$ , 1H), 2,51 (m, 1H), 2,29 (m, 1H), 2,22 (m, 1H), 2,20 (dd,  $J = 14,0$ , 4,8, 1H), 1,82 (dd,  $J = 13,3$ , 8,2, 1H), 1,79 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,51 (m, 2H), 1,49 (dd, 13,3, 5,0, 1H), 1,42 (m, 4H), 1,38 (dc,  $J = 7,5$ , 7,5, 2H), 1,25 (d,  $J = 6,5$ , 3H), 1,07 (d,  $J = 6,4$ , 3H), 0,95 (d,  $J = 7,4$ , 3H), 0,82 (t,  $J = 7,5$ , 3H).

## Ejemplo A27

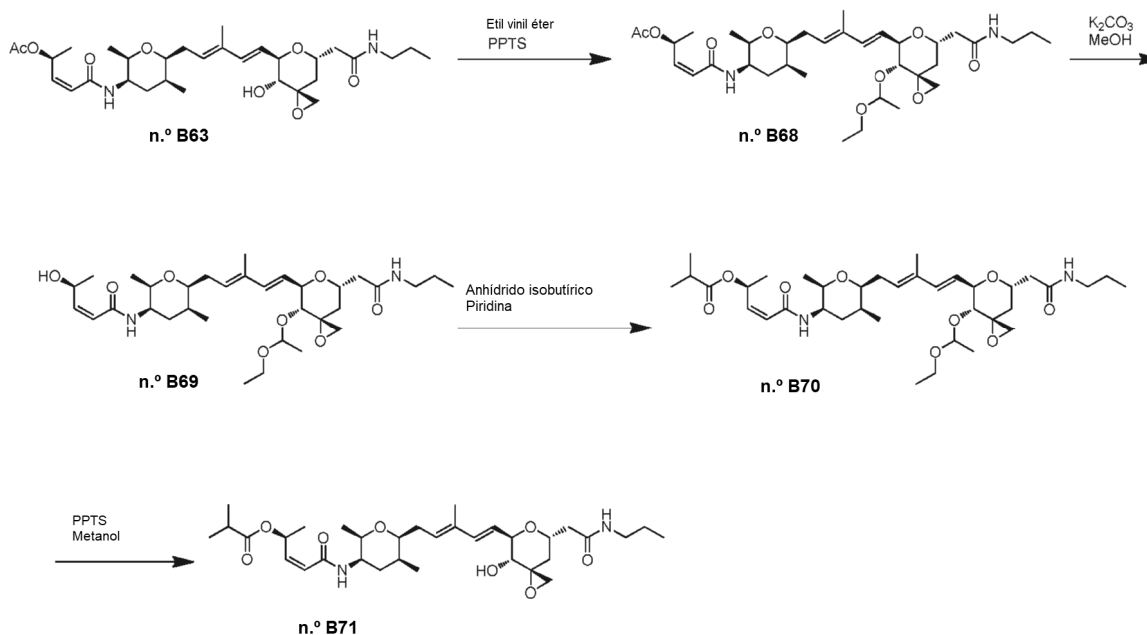
Preparación de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B67). Y piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R, 4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B67).



**Etapa 1.** Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B67). Una mezcla de n.º B60 (Ejemplo A23, 23,0 mg, pureza del 96,7 %, 0,038 mmol, 1,0 equiv.) y *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 13,1 mg, 0,06 mmol, 1,7 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,8 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. A esta solución se le añadió *N*-hidroxilsuccinimida (34,5 mg, 0,3 mmol, 7,7 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,2 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º B67 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 9,4 mg, 39 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 11,04 minutos (pureza del 100 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) 7,78 (d, *J* = 8,0, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,35 (d a, *J* = 16,1, 1H), 6,22 (dc, *J* = 7,0, 7,0, 1H), 6,08 (d, *J* = 11,7, 1H), 5,89 (dd, *J* = 11,7, 7,4, 1H), 5,60 (dd, *J* = 16,0, 5,1, 1H), 5,52 (dd a, *J* = 7,0, 7,0, 1H), 5,08 (d, *J* = 6,2, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,29 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 3,49 (dd a, *J* = 7,0, 7,0, 1H), 3,29 (m, 5H), 3,00 (d, *J* = 6,6, 2H), 2,80 (s, 4H), 2,79 (d, *J* = 5,2, 1H), 2,60 (d, *J* = 5,2, 1H), 2,28 (m, 1H), 2,21 (m, 1H), 1,95 (dd, *J* = 13,2, 8,6, 1H), 1,81 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,58 (dc, *J* = 13,2, 3,1, 1H), 1,52 (m, 2H), 1,43 (m, 4H), 1,25 (d, *J* = 6,2, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,2, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,0, 3H).

## Ejemplo A28

Preparación de 2-metilpropanoato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B71).



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-(1-etoxietoxi)-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B68). Una solución de n.º B63 (Ejemplo A24, 35,0 mg, pureza del 92 %, 0,06 mmol, 1,0 equiv.), *p*-toluenosulfonato de piridinio (PPTS, 7,1 mg, 0,028 mmol, 0,4 equiv.) y etil vinil éter (0,5 ml, 8,6 mmol, gran cantidad en exceso) en diclorometano anhidro (1,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2

horas. La mezcla de reacción se repartió entre diclorometano (10 ml)/agua(10 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se evaporó a presión reducida para proporcionar **n.º B68**. Rendimiento: 36,1 mg. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 12,33 minutos (pureza del 90 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  577,6  $[M+H-CHCH_3OCH_2CH_3]^+$ .

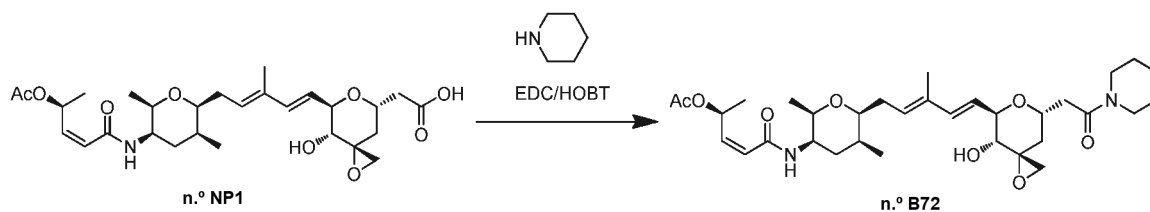
5 **Etapla 2.** Síntesis de (2Z,4S)-N-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-(1-etoxietoxi)-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B69**). Una suspensión de **n.º B68** (36,1 mg, 0,05 mmol, 1,0 equiv.) y carbonato potásico (50 mg, 0,4 mmol, 8 equiv.) en metanol (1,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida para proporcionar **n.º B69**.  
10 Rendimiento: 33,4 mg. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,458 y 10,459 minutos (pureza del 87,6 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  535,5  $[M+H-CHCH_3OCH_2CH_3]^+$ .

**Etapla 3.** Síntesis de 2-metilpropanoato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-(1-etoxietoxi)-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B70**). Una solución de **n.º B69** (33,0 mg, 0,049 mmol, 1,0 equiv.) e isobutírico anhídrido (100  $\mu$ l, 0,75 mmol, 15 equiv.) en piridina (500  $\mu$ l) se agitó a 35 °C durante 24 horas. Después, la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida para proporcionar **n.º B70**.  
15 Rendimiento: 37,3 mg. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 14,06 (pureza del 88,3 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  605,6  $[M+H-CHCH_3OCH_2CH_3]^+$ ,

**Etapla 4.** Síntesis de 2-metilpropanoato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B71**). Una solución de **n.º B70** (17,8 mg, 0,023 mmol, 1,0 equiv.), p-toluenosulfonato de piridinio (60 mg, 0,24 mmol, 10 equiv.) en metanol anhidro (2,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después, la mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B71** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 8 mg, (50 % durante las etapas 1-4). HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 11,50 minutos (pureza del 100 %). HRESIMS (Protocolo O)  $m/z$  605,3798 (M+H)<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, J en Hz)  $\delta$  7,83 (t, J = 6,0, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,81 (d, J = 8,1, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,35 (ddc, J = 1,3, 6,5, 6,5, 1H), 6,28 (d a, J = 15,9, 1H), 6,12 (dd, J = 1,3, 11,7, 1H), 5,86 (dd, J = 11,7, 7,5, 1H), 5,59 (dd, J = 15,9, 5,4, 1H), 5,51 (dd a, J = 7,1, 7,1, 1H), 5,02 (d, J = 5,4, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,26 (dd, J = 5,0, 5,0, 1H), 4,24 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,49 (ddd, J = 7,0, 7,0, 2,6, 1H), 3,24 (dd, J = 5,0, 5,0, 1H), 3,01 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,75 (d, J = 5,2, 1H), 2,5 (d, J = 5,2, 1H), 2,52 (m, 1H), 2,48 (sept, J = 6,5, 1H), 2,29 (ddd, J = 15,5, 7,1, 7,1, 1H), 2,21 (m, 1H), 2,20 (dd, J = 14,0, 4,8, 1H), 1,83 (dd, J = 13,4, 5,0, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,48 (dd, 12,7, 3,9, 1H), 1,38 (dc, J = 7,5, 7,5, 2H), 1,25 (d, J = 6,6, 3H), 1,07 (d, J = 6,8, 9H), 0,95 (d, J = 7,5, 3H), 0,82 (t, J = 7,5, 3H).

### Ejemplo A29

35 **Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(piperidin-1-il)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B72**).**

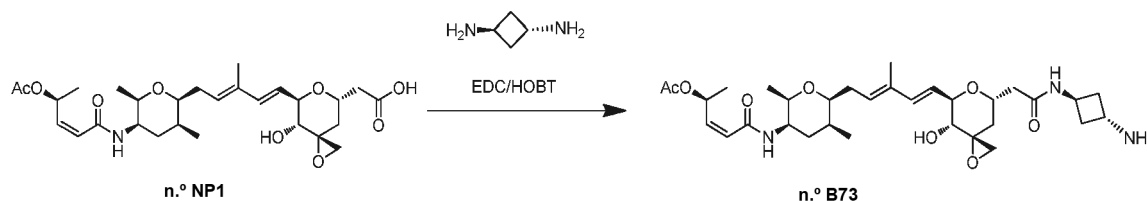


40 **Etapla 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(piperidin-1-il)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B72**). Una mezcla de **n.º NP1** (163,0 mg, pureza del 92 %, 0,27 mmol, 1,0 equiv.), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 160,0 mg, 1 mmol, 4 equiv.) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (EDC, 195,0 mg, 1 mol, 4 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (4,0 ml) se agitó a 0 °C durante 30 min. A esta solución, se le añadieron posteriormente trietilamina (50  $\mu$ l) y piperidina (180  $\mu$ l, 2,1 mmol, 7,5 equiv.) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y a 0 °C durante 16 horas. Después, la mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo (2 x 20 ml) y agua (20 ml). La capa orgánica combinada se lavó con agua (2 x 10 ml), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se evaporó a presión reducida para proporcionar **n.º B72** en bruto en forma de un vidrio de color blanquecino (223,5 mg, pureza del 79,5 %). Una porción de este material (33,1 mg) se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B72** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 27,4 mg, 100 % HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,58 minutos (pureza del 98 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  603,7  $[M+H]^+$ . RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, J en Hz)  $\delta$  7,80 (d, J = 7,8, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,36 (dc, J = 6,0, 6,0, 1H), 6,31 (d a, J = 16,0, 1H), 6,11 (d, J = 11,7, 1H), 5,87 (dd, J = 11,7, 7,8, 1H), 5,60 (dd, J = 16,0, 5,5, 1H), 5,52 (dd a, J = 7,0, 7,0, 1H), 4,98 (d, J = 5,8, 1H, D<sub>2</sub>O

intercambiable), 4,25 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 3,49 (dd a,  $J = 6,2, 6,2$ , 1H), 3,40 (m, 4H), 3,25 (dd, 5,8, 5,1, 1H), 3,08 (s a, 4H), 2,76 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 2,68 (dd,  $J = 15,2, 7,0$ , 1H), 2,58 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 2,50 (m, 1H), 2,29 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,86 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,56 (m, 3H), 1,48 (m, 2H), 1,40 (m, 2H), 1,25 (d,  $J = 6,2, 3H$ ), 1,07 (d,  $J = 6,2, 3H$ ), 0,95 (d,  $J = 7,0, 3H$ ).

### 5 Ejemplo A30

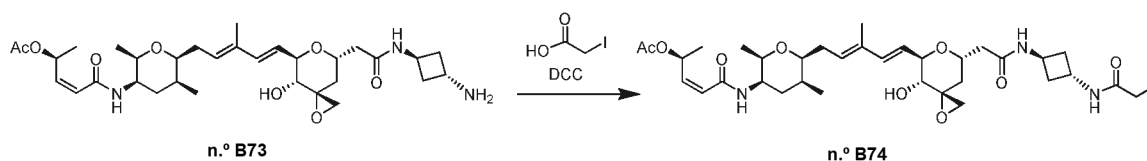
Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-{2-((trans-3-aminociclobutil)amino)-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B73).



10 *Etapa 1.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-{2-((trans-3-aminociclobutil)amino)-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-  
15 dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B73). Una mezcla de n.º NP1 (50,2 mg, 94 % puro, 0,09 mmol, 1,0 equiv.), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 65,5 mg, 0,43 mmol, 4,7 equiv.), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (EDC, 70 mg, 0,37 mmol, 4 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (3,0 ml) se agitó a 0 °C durante 30 minutos. A esta solución se le añadieron posteriormente trans-1,3-diaminociclobutano (112 mg, 1,3 mmol, 14 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (1,0 ml) y trietilamina (200 µl) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético, se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º B73 en forma de un vidrio incoloro. Rendimiento: 64,3 mg, 100 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 6,66 minutos (pureza del 85,2 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  604,6  $[M+H]^+$ . RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  8,26 (d,  $J = 7,0$ , 1H,  $D_2O$  intercambiable), 7,80 (d,  $J = 7,9$ , 1H,  $D_2O$  intercambiable), 6,36 (dc,  $J = 6,0, 6,0$ , 1H), 6,28 (d a,  $J = 16,0$ , 1H), 6,11 (d,  $J = 11,3$ , 1H), 5,88 (dd,  $J = 11,7, 7,8$ , 1H), 5,60 (dd,  $J = 16,0, 5,8$ , 1H), 5,49 (dd a,  $J = 6,6, 6,6$ , 1H), 5,04 (m, 1H,  $D_2O$  intercambiable), 4,37 (m, 1H), 4,27-4,21 (m, 2 H), 3,65 (m, 3H), 3,50 (dd a,  $J = 5,5, 5,5$ , 1H), 3,26 (d,  $J = 4,3$ , 1H), 2,76 (d,  $J = 4,7$ , 1H), 2,58 (d,  $J = 4,7$ , 1H), 2,48 (m, 1H), 2,29 (m, 1H), 2,22-2,11 (m, 6H), 1,98 (s, 3H), 1,82 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,49 (dd,  $J = 12,5, 2,7$ , 1H), 1,25 (d,  $J = 6,2, 3H$ ), 1,07 (d,  $J = 6,0, 3H$ ), 0,95 (d,  $J = 7,4, 3H$ ).

### Ejemplo A31

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-((trans-3-[(yodoacetil)amino]ciclobutil)amino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B74).



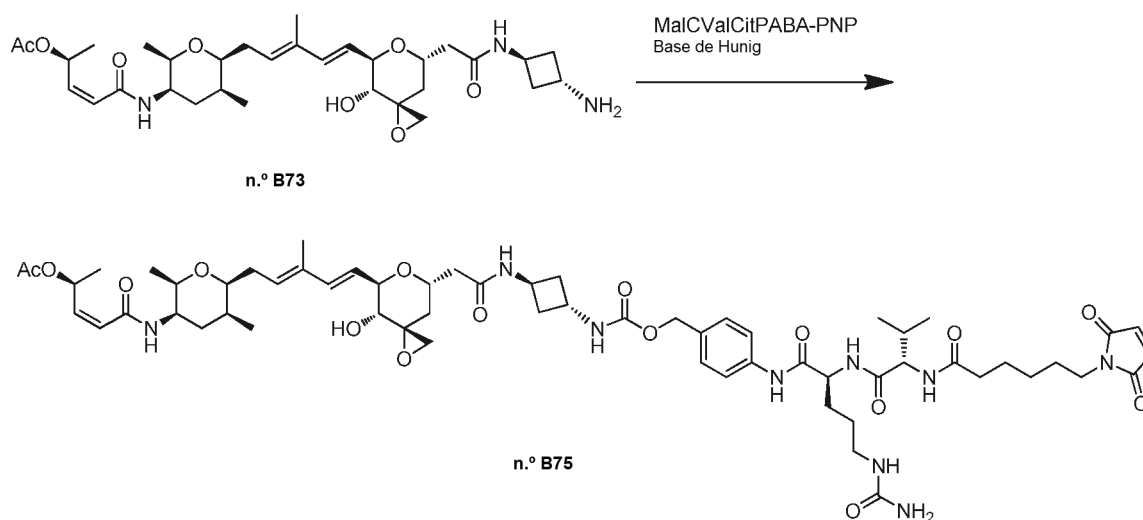
35 *Etapa 1.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-((trans-3-[(yodoacetil)amino]ciclobutil)amino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B74). Una solución de ácido yodoacético (38,6 mg, 0,21 mmol, 5,9 equiv.) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 64,2 mg, 0,31 mmol, 9 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (2,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La solución de color amarillo claro resultante se añadió lentamente a n.º B73 (Ejemplo A30, 27,1 mg, 0,035 mmol, 1,0 equiv.) en *N,N* dimetilformamida (0,5 ml) y después se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El producto se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º B74 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 14,2 mg, 41 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,61 minutos (pureza del 100 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  772,4  $[M+H]^+$ . RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  8,60 (d,  $J = 7,0$ ,  $D_2O$  intercambiable), 8,28 (d,  $J = 7,0$ , 1H,  $D_2O$  intercambiable), 7,80 (d,  $J = 7,9$ , 1H,  $D_2O$  intercambiable), 6,36 (dc,  $J = 6,0, 6,0$ , 1H), 6,29 (d a,  $J = 16,0$ , 1H), 6,11 (d,  $J = 11,7$ , 1H), 5,87 (dd,  $J = 11,7, 7,8$ , 1H), 5,60 (dd,  $J = 16,0, 5,8$ , 1H), 5,49 (dd a,  $J = 7,0, 7,0$ , 1H), 5,01 (d,  $J = 5,4$ , 1H,  $D_2O$  intercambiable), 4,27-4,23 (m, 3H), 4,19 (m, 1H), 3,65 (m, 2H), 3,59 (s, 2H), 3,49 (dd a,  $J = 6,0, 6,0$ , 1H), 3,26 (dd,  $J = 5,1, 5,1$ , 1H), 2,76 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 2,58 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 2,53 (m, 1H), 2,32 (m, 1H), 2,22-2,11 (m,



6H), 1,98 (s, 3H), 1,82 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,52 (dd,  $J = 14,8, 2,7$ , 1H), 1,25 (d,  $J = 6,2$ , 3H), 1,07 (d,  $J = 6,0$ , 3H), 0,95 (d,  $J = 7,0$ , 3H).

### Ejemplo A32

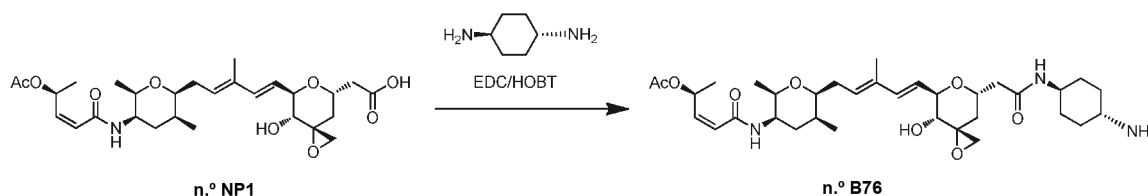
5 **Preparación de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-4-[[[trans-3-({[(3R,5S,7R,8R)-7-(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)ciclobutil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-N<sup>5</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B75).**



10 **Etapa 1.** Síntesis de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-4-[[[trans-3-({[(3R,5S,7R, 8R)-7-  
 15 {1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-  
 metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)ciclobutil]carbamoil]oxi]metil]fenil]-N<sup>5</sup>-  
 carbamoil-L-ornitinamida (n.º B75). A una solución de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-  
 N-5-carbamoil-N-4-[[[4 nitrobenzil]oxi]carbonil]oxi]metil]fenil]-L-ornitinamida (MalCValCitPABA-PNP, Eur. Pat.  
 20 Appl. (1994), EP624377, 23,1 mg, 0,03 mmol, 1,3 equiv.) y n.º B73 (15,5 mg, pureza del 85 %, 0,022 mmol, 1,0  
 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (0,6 ml) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 30 µl). La  
 mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó usando  
 cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º B75 en forma de un polvo de color blanco.  
 Rendimiento: 12,6 mg, 28 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,3 minutos (pureza del 91 %). CLEM  
 (Protocolo M): m/z 1202,5 [M+H]<sup>+</sup>.

### 20 Ejemplo A33

**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(trans-4-aminociclohexil)amino]-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B76).**

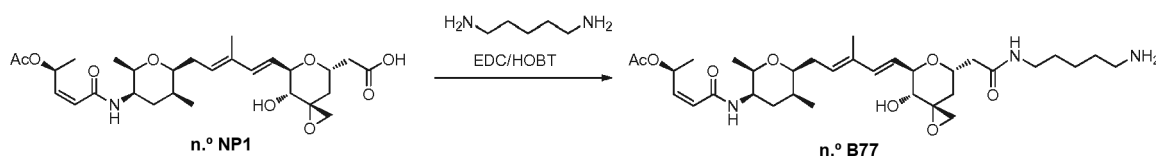


25 **Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(trans-4-aminociclohexil)amino]-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-  
 30 dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B76). Una solución de n.º NP1 (40,2 mg, pureza del  
 92 %, 0,07 mmol, 1,0 equiv.), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 62,5 mg, 0,4 mmol, 5,8 equiv.), 1-etil-3-(3-  
 dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (EDC, 72,2 mg, 0,38 mmol, 5 equiv.) en *N,N* dimetilformamida (3,0 ml) se agitó  
 a 0 °C durante 30 minutos. A esta solución se le añadieron posteriormente trans-1,4-diaminociclohexano (290,0 mg,  
 2,5 mmol, 30 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (1,5 ml) y trietilamina (50 µl) a 0 °C. Después, la mezcla resultante se  
 agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas y 0 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con  
 ácido acético, se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para  
 proporcionar n.º B76 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 48,2 mg, 100 %. HPLC (Protocolo N):

tiempo de retención = 7,16 minutos (pureza del 87,5 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  632,2  $[M+H]^+$ . RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,81 (d,  $J = 7,8$ , 1H, D $_2$ O intercambiable), 7,72 (d,  $J = 7,8$ , 1H, D $_2$ O intercambiable), 6,36 (dc,  $J = 6,0$ , 6,0, 1H), 6,28 (d a,  $J = 15,6$ , 1H), 6,11 (d,  $J = 11,7$ , 1H), 5,87 (dd,  $J = 11,7$ , 7,8, 1H), 5,59 (dd,  $J = 16,0$ , 5,5, 1H), 5,49 (dd a,  $J = 6,6$ , 6,6, 1H), 5,02 (m, 1H, D $_2$ O intercambiable), 4,26 (m, 1H), 4,22 (m, H), 3,65 (m, 2H), 3,49 (dd a,  $J = 6,2$ , 6,2, 1H), 3,45-3,32 (m, 2 H), 3,26 (d,  $J = 3,9$ , 1H), 2,75 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 2,58 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 2,46 (m, 1H), 2,29 (m, 1H), 2,22 (m, 1H), 2,16 (dd,  $J = 14,0$ , 4,7, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,83 (m, 1H), 1,81 (m, 2H), 1,79-1,72 (m, 4H), 1,70 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,46 (dd,  $J = 12,5$ , 3,0, 1H), 1,25 (d,  $J = 6,2$ , 3H), 1,16-1,10 (m, 4H), 1,07 (d,  $J = 6,0$ , 3H), 0,95 (d,  $J = 7,0$ , 3H).

### Ejemplo A34

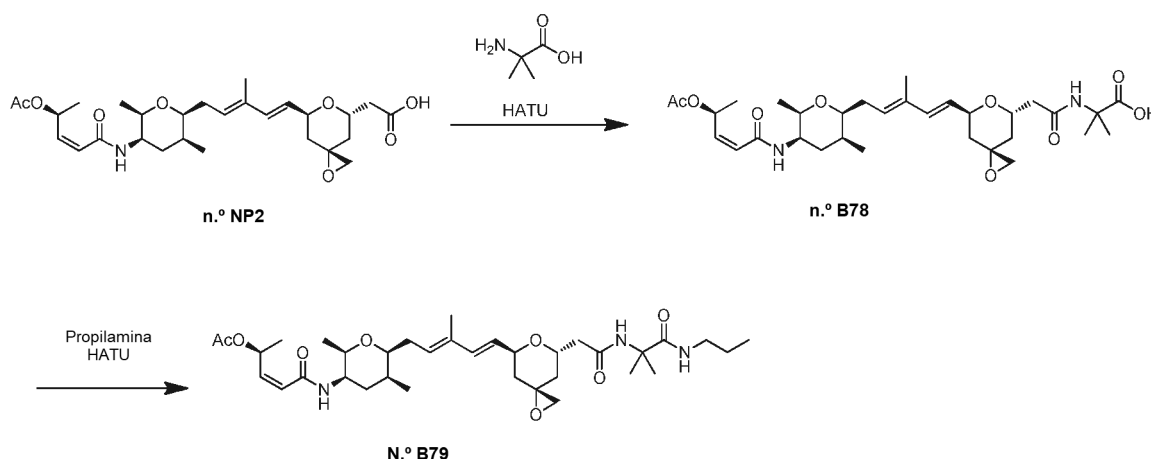
- 10 **Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(5-aminopentil)amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B77).**



- 15 **Etapa 1. Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(5-aminopentil)amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B77).** Una solución de n.º NP1 (30,5 mg, 92 % puro, 0,056 mmol, 1,0 equiv.), hidrato de 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT, 38,0 mg, 0,24 mmol, 4,4 equiv.), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (EDC, 54,0 mg, 0,28 mmol, 5 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (3,0 ml) se agitó a 0 °C durante 30 minutos. A esta solución se le añadieron posteriormente trietilamina (50  $\mu$ l) y 1,5-pantanediamina (50  $\mu$ l, 0,5 mmol, 9 equiv.) a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético, se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*). Se recogió el con tiempo de retención de 22,0 minutos, se neutralizó con  $NH_4OH$  y se secó por congelación para proporcionar n.º B77 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento 23,1 mg, rendimiento del 68 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 7,67 minutos (pureza del 91 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  620,6  $[M+H]^+$ .

### 25 Ejemplo A35

- Preparación de N-[[[(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]-2-metilalanina (n.º B79).**



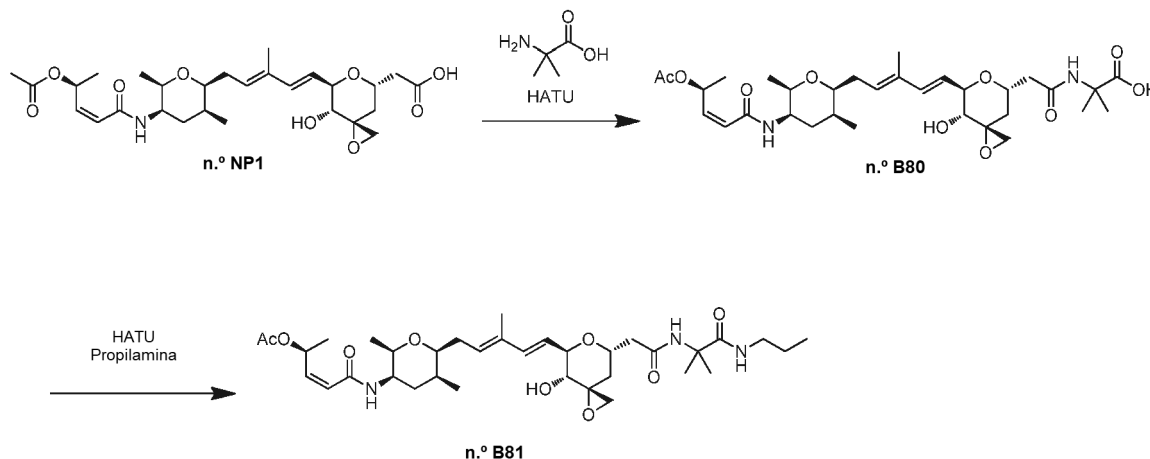
- 30 **Etapa 1. Síntesis de N-[[[(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]-2-metilalanina (n.º B78).** Una mezcla de n.º NP2 (118,3 mg, pureza del 94,0 %, 0,2 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 31,7 mg, 0,083 mmol, 0,4 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 10  $\mu$ l) en *N,N* dimetilformamida (2,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta solución se le añadieron posteriormente trietilamina (100  $\mu$ l) y 2-metilalanina (32,5 mg, 0,3 mmol, 1,3 equiv.) en 1:1 piridina/dimetilsulfóxido (1,0 ml). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2,0 horas. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa

(Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B78** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 54,3 mg, rendimiento del 45 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 11,29 minutos (pureza del 94,1 %). CLEM (Protocolo M);  $m/z$  605,6  $[M+H]^+$ .

5 *Etapa 2.* Síntesis de N- $\{[(3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-$   
 10 dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil}-2-metilalanina (**n.º B79**). Una solución de **n.º B78** (6,6 mg, 0,011 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 6,0 mg, 0,016 mmol, 1,5 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 3,0  $\mu$ l) en *N,N*-dimetilformamida (200  $\mu$ l) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta solución se le añadió propilamina (3,6  $\mu$ l, 0,06 mmol, 5 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B79** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 4,9 mg, rendimiento del 70 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 12,31 minutos (pureza del 100 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  646,7  $[M+H]^+$ ; 668,7  $[M+Na]^+$ .

### Ejemplo A36

15 **Preparación de acetato de (2S,3Z)-5- $\{[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-(2-[[2-metil-1-oxo-1-(propilamino)propan-2-il]amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo$  (**n.º B81**).**



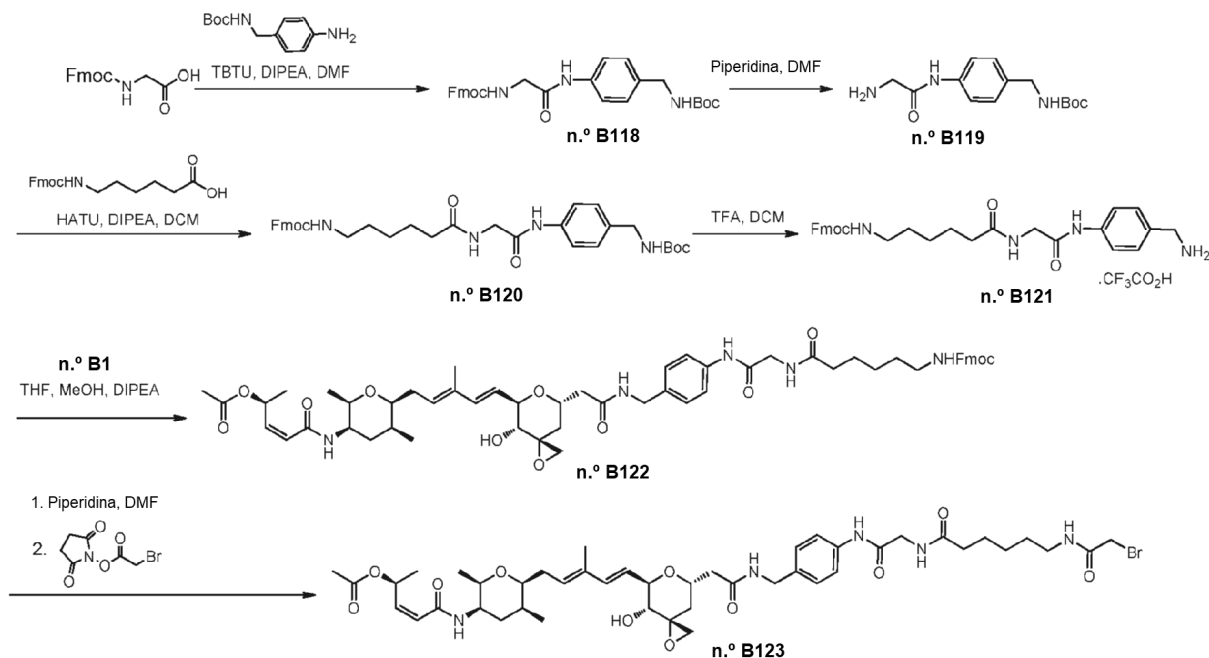
20 *Etapa 1.* Síntesis de N- $\{[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-$   
 25 dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil}-2-metilalanina (**n.º B80**). Una mezcla de **n.º NP1** (122,4 mg, pureza del 92,0 %, 0,22 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 33,2 mg, 0,087 mmol, 0,4 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 10  $\mu$ l) en *N,N*-dimetilformamida (2,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta solución se le añadieron posteriormente trietilamina (100  $\mu$ l) y 2-metilalanina (36,4 mg, 0,35 mmol, 1,2 equiv.) en 1:1 piridina/dimetilsulfóxido (1,0 ml). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2,0 horas. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B80** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 52,7 mg, rendimiento del 42 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,28 minutos (pureza del 90 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  621,6  $[M+H]^+$ .

30 *Etapa 2.* Preparación de acetato de (2S,3Z)-5- $\{[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-(2-[[2-$   
 35 metil-1-oxo-1-(propilamino)propan-2-il]amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B81**). Una solución de **n.º B80** (6,0 mg, pureza del 90 %, 0,01 mmol, 1,0 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 5,1 mg, 0,013 mmol, 1,3 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 3,0  $\mu$ l) en *N,N*-dimetilformamida (200  $\mu$ l) se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta solución se le añadió propilamina (3,6  $\mu$ l, 0,06 mmol, 6 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar **n.º B81** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 4,7 mg, rendimiento del 87 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,95 minutos (pureza del 99 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  662,7  $[M+H]^+$ .

## Ejemplo A37

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[[4-[[[(4-[(N-(6-[[bromoacetil]amino]hexanoil]glicil)amino]bencil]oxi)carbonil]amino]bencil]amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B123)

5



**Etapa 1:** Síntesis de {2-[[4-[[[(terc-butoxicarbonil)amino]metil]fenil]amino]-2-oxoetil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (n.º B118): A una solución de Fmoc-Glicina (16 g, 54 mmol, 1,0 equiv.) en DMF seca (160 ml) a 0 °C se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (14 g, 108 mmol, 2,0 equiv.) y tetrafluoroborato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)uronio (16 g, 54 mmol, 1,0 equiv.). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y se añadió una solución de [4-(glicilamino)bencil]carbamato de terc-butilo (12 g, 54 mmol, 1,0 equiv.) en DMF seca (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche, se vertió en agua enfriada con hielo (400 ml) y se extrajo con EtOAc (400 mlx2). La capa orgánica se lavó con salmuera (200 mlx2), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El residuo se recristalizó en EtOAc (200 ml) y éter de petróleo (400 ml) para proporcionar n.º B118 (18 g, 66,6 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9,93 (s, 1H), 7,91 (d, 2H), 7,75 (d, 2H), 7,61 (m, 1 H), 7,52 (d, 2H), 7,43 (m, 2H), 7,36 (m, 3H), 7,18 (d, 3 H), 4,32 (d, 2H), 4,26 (m, 1 H), 4,07 (d, 2H), 3,80 (d, 2H), 1,39 (s, 9H)

10

15

**Etapa 2:** Síntesis de [4-(glicilamino)bencil]carbamato de terc-butilo (n.º B119): A una solución de n.º B118 (7,0 g, 14,0 mmol, 1,0 equiv.) en DMF (70 ml) se le añadió piperidina (4,7 ml, 47,5 mmol, 3,4 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, se evaporó al vacío. El residuo se lavó con éter de petróleo (100 mlx2) y se volvió a cristalizar a partir de EtOAc (50 ml) y éter de petróleo (200 ml) para dar n.º B119 (3,3 g, 84,6 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,37 (s, 1H), 7,57 (d, 2H), 7,25 (d, 2H), 4,80 (a, 1H), 4,27 (d, 2H), 3,47 (s, 2H), 1,45 (s, 9H)

20

**Etapa 3:** Síntesis de [6-([2-[[4-[[[(terc-butoxicarbonil)amino]metil]fenil]amino]-2-oxoetil]amino]-6-oxohexil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (n.º B120): A una solución de ácido 6-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]hexanoico (2,66 g, 7,53 mmol, 1,0 equiv.) en DCM seco (50 ml) a 0 °C se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (1,93 g, 15,1 mmol, 2,0 equiv.) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 2,86 g, 7,53 mmol, 1,0 equiv.). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y se añadió n.º B119 (2,1 g, 7,53 mmol, 1,0 equiv.) en una porción. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró y el sólido se lavó con DCM y se secó al vacío para proporcionar n.º B120 (4 g, 86,4 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9,91 (s, 1H), 8,11 (a, 1H), 7,90 (d, 2H), 7,69 (d, 2H), 7,51 (d, 2H), 7,41 (m, 2H), 7,33 (m, 3H), 7,17 (d, 2H), 4,28 (m, 3H), 4,06 (d, 2H), 3,86 (a, 2H), 2,97 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 1,51 (m, 2H), 1,38 (m, 12H); CLEM (Protocolo I): *m/z* 637,1 (M+Na)<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,18 minutos.

25

30

**Etapa 4:** Síntesis de sal trifluoroacetato de {6-[[2-[[4-(aminometil)fenil]amino]-2-oxoetil]amino]-6-oxohexil]carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (n.º B121): A una suspensión de n.º B120 (1 g, 1,63 mmol, 1,0 equiv.)

35

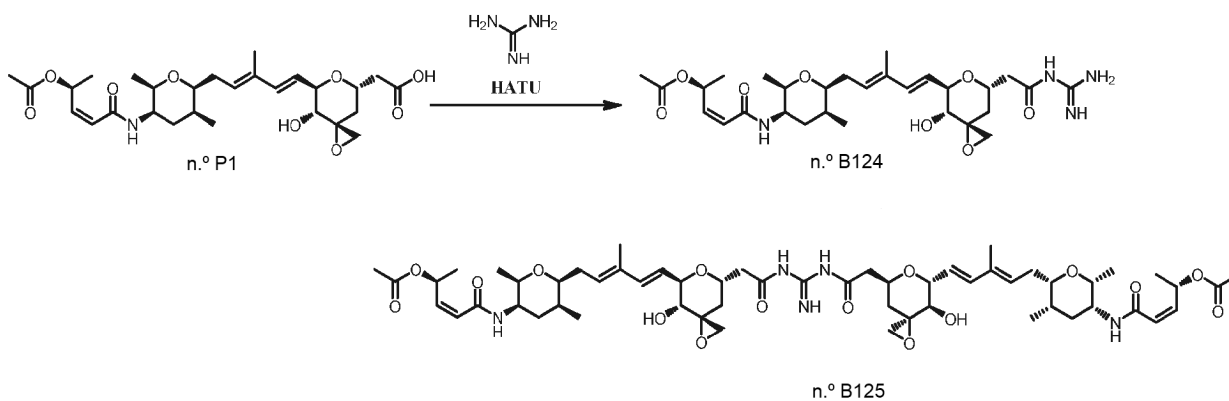
en DCM seco (20 ml) a 0 °C se le añadió ácido trifluoroacético (6 ml, gran exceso). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se concentró al vacío. El residuo se suspendió en agua (30 ml) y se liofilizó para proporcionar **n.º B121** (1,2 g, 100 %) en forma de un sólido de color amarillo brillante. RMN <sup>1</sup>H (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10,08 (s, 1H), 8,15 (a, 4H), 7,90 (d, 2H), 7,69 (d, 2H), 7,63 (d, 2H), 7,41 (m, 8H), 4,30 (m, 3H), 3,98 (m, 3H), 3,87 (d, 2H), 2,97 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,51 (m, 2H), 1,40 (m, 2H), 1,26 (m, 2H): CLEM (Protocolo I): *m/z* 537,1 (M+Na)<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,10 minutos.

Etapa 5: Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(4-[[N-(6-[[9H-fluoren-9-il-metoxi]carbonil]amino]hexanoil]glicil]amino]bencil]amino]-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B122**): A una solución de **n.º B121** (32,7 mg, 0,044 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (1,0 ml) y metanol (0,1 ml) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (26,0 mg, 0,2 mmol, 4,5 equiv.). La mezcla de reacción entera se añadió a una solución enfriada (0 °C) de **n.º B1** (28 mg, 0,044 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (1,0 ml) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de una hora la reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B122** (12,4 mg, 0,011 mmol, 27 %): CLEM (Protocolo D): *m/z* 1032,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,92 minutos.

Etapa 6: Síntesis de acetato (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(4-[[N-(6-[(bromoacetil]amino]hexanoil]glicil]amino]bencil]oxi]carbonil]amino]bencil]amino]-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B123**). A una solución de **n.º B122** (12,4 mg, 0,012 mmol, 1 equiv.) en dimetilformamida (0,7 ml, 0,01 M) se le añadió piperdina (11 ul de una solución madre [preparada disolviendo 100 ul de piperdina en 1 ml de DMF], 0,013 mmol, 1,1 equiv.). La reacción se agitó durante 16 horas y después se añadió gota a gota una solución de *N*-hidroxisuccinimida del éster del ácido bromoacético (2,8 mg, 0,012 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (0,5 ml). La reacción se agitó durante 16 horas, se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B123** en forma de un sólido. Rendimiento: 2,5 mg, 0,027 mmol, 22 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 932,2 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 0,76 minutos.

### Ejemplo A38

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-carbamimidamido-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B124**) y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[2-(*N'*-[(3R,5S,7R,8R)-7-(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]carbamimidamido)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B125**)



Etapa 1: Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-carbamimidamido-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B124**) y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[2-(*N'*-[(3R,5S,7R,8R)-7-(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]carbamimidamido)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (**n.º B125**): A una mezcla de **n.º NP1** (135 mg, pureza del ~60 %, ~0,15 mmol) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU, 72 mg, 0,19 mmol, 1,2 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (DMF, 1,0 ml) a 0 °C se le añadió *N,N'*-diisopropiletilamina (30 ul, *n.º* equiv.). Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la mezcla se transfirió a una solución de clorhidrato de guanidina (400 mg, 4,1 mmol, 28 equiv.) y *N,N'*-diisopropiletilamina (100 ul) en 1:1 de metilsulfóxido/agua (3,0 ml). La solución resultante se agitó durante 20 minutos y se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar (**n.º B124**) y (**n.º B125**) en forma de polvos de color blanco.

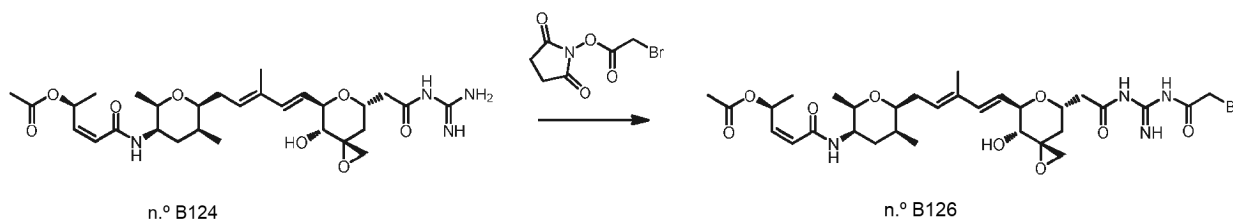
n.º **B124**:. Rendimiento: 55,6 mg, rendimiento del 38 % HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 8,01 minutos (pureza del 87 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  577,44  $[M+H]^+$ . RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,80 (d,  $J = 7,9$ , 1H,  $D_2O$  intercambiable), 6,36 (dc,  $J = 6,0$ , 6,0, 1H), 6,27 (d a,  $J = 16,0$ , 1H), 6,11 (d,  $J = 11,3$ , 1H), 5,87 (dd,  $J = 11,3$ , 7,4, 1H), 5,60 (dd,  $J = 15,6$ , 5,5, 1H), 5,51 (dd a,  $J = 7,4$ , 7,4, 1H), 4,93 (d,  $J = 5,8$ , 1H,  $D_2O$  intercambiable), 4,29 (m, 1H), 4,22 (m, 1H), 3,65 (m, 2H), 3,50 (dd a,  $J = 6,0$ , 6,0, 1H), 3,22 (dd,  $J = 4,7$ , 4,7, 1H), 2,73 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 2,56 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 2,46 (m, 1H), 2,32 (m, 2H), 2,20 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,82 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,52 (dd,  $J = 13,2$ , 3,5, 1H), 1,25 (d,  $J = 6,2$ , 3H), 1,07 (d,  $J = 6,0$ , 3H), 0,95 (d,  $J = 7,4$ , 3H).

n.º **B125**: . Rendimiento: 49,0 mg, rendimiento del 36 % HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,14 minutos (pureza del 90 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  1094,76  $[M+H]^+$ . RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,78 (d,  $J = 7,9$ , 2H,  $D_2O$  intercambiable), 6,36 (dc,  $J = 6,0$ , 6,0, 2H), 6,27 (d a,  $J = 16,0$ , 2H), 6,11 (d,  $J = 11,7$ , 2H), 5,87 (dd,  $J = 11,7$ , 7,8, 2H), 5,60 (dd,  $J = 16,0$ , 5,0, 2H), 5,49 (dd a,  $J = 6,7$ , 6,7, 2H), 5,01 (s a, 2H,  $D_2O$  intercambiable), 4,32 (m, 2H), 4,25 (m, 2H), 3,65 (m, 4H), 3,49 (dd a,  $J = 6,6$ , 6,6, 2H), 3,28 (d,  $J = 4,3$ , 2H), 2,76 (d,  $J = 4,7$ , 2H), 2,59 (d,  $J = 4,7$ , 2H), 2,54 (m, 2H), 2,30 (m, 2H), 2,28 (m, 2H), 2,21 (m, 2H), 1,98 (s, 6H), 1,83 (m, 2H), 1,80 (m, 4H), 1,69 (s, 6H), 1,65 (m, 2H), 1,52 (d a,  $J = 12,8$ , 2H), 1,25 (d,  $J = 6,2$ , 6H), 1,06 (d,  $J = 6,2$ , 6H), 0,94 (d,  $J = 7,0$ , 6H).

Compuestos diméricos similares a los divulgados en el presente documento también se incluyen dentro del ámbito de la presente invención, por ejemplo, compuestos diméricos que tienen sustituciones como se describe a lo largo de esta solicitud.

## 20 Ejemplo A39

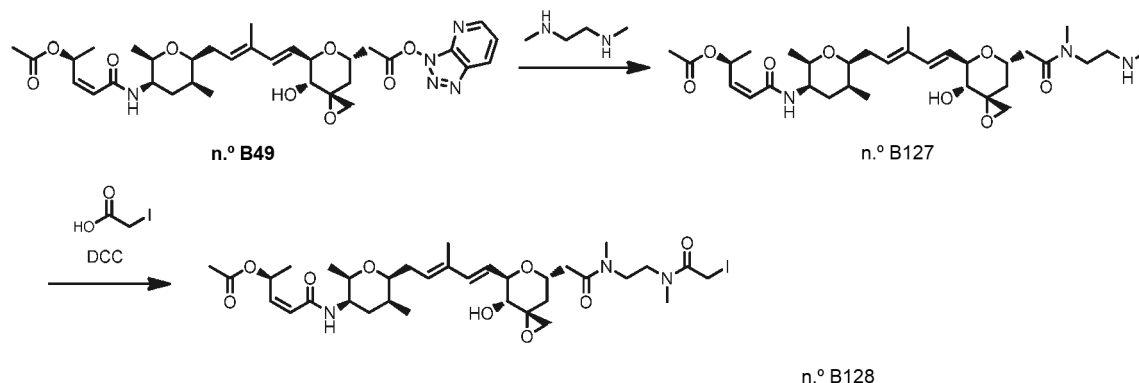
**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[N'-(bromoacetil)carbamidamido]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B126)**



25 **Etapa 1:** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[N'-(bromoacetil)carbamidamido]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B126**) A una solución de n.º **B124** (24,0 mg, 0,042 mmol, 1,0 equiv.) y *N*-hidroxisuccinimida éster del ácido bromoacético (24,1 mg, 0,092 mmol, 2,0 equiv.) en *N,N* dimetilformamida (1 ml) se le añadió *N,N'*-diisopropiletilamina (10  $\mu$ l). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º **B126** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 5,7 mg, 20 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,01 minutos (pureza del 99 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  697,35, 699,35 (1:1)  $[M+H]^+$ . RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  9,57(s a, 1H,  $D_2O$  intercambiable), 9,41 (s a, 1H,  $D_2O$  intercambiable), 9,24 (s a, 1H,  $D_2O$  intercambiable), 9,08 (s a, 1H,  $D_2O$  intercambiable), 7,79 (d,  $J = 7,5$ , 1H,  $D_2O$  intercambiable), 6,36 (dc,  $J = 6,0$ , 6,0, 1H), 6,26 (d a,  $J = 16,0$ , 1H), 6,11 (d,  $J = 11,7$ , 1H), 5,87 (dd,  $J = 11,3$ , 7,4, 1H), 5,60 (m, 1H), 5,49 (m, 1H), 4,35-4,28 (m, 2 H), 3,65 (m, 2H), 3,50 (dd a,  $J = 6,0$ , 6,0, 1H), 3,41 (s, 2H), 3,26 (d,  $J = 4,7$ , 1H), 2,78 (d,  $J = 4,3$ , 1H), 2,61 (d,  $J = 4,3$ , 1H), 2,55 (m, 1H), 2,32 (m, 2H), 2,20 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,85 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,53 (dd,  $J = 13,2$ , 3,5, 1H), 1,25 (d,  $J = 6,2$ , 3H), 1,07 (d,  $J = 6,2$ , 3H), 0,95 (d,  $J = 6,6$ , 3H).

## Ejemplo A40

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-[[2-[(yodoacetil)(metil)amino]etil](metil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo] (n.º B128)



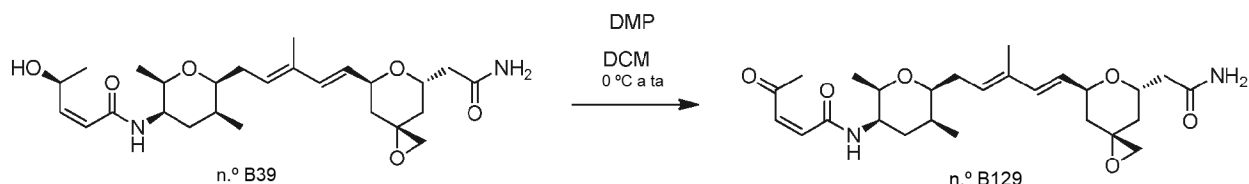
5

*Etapa 1.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(metil(2-(metilamino)etil)amino)]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo] (n.º B127): A una solución de n.º B49 (54,5 mg, 0,084 mmol, 1,0 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (2,0 ml) se le añadió *N,N*-dimetil-1,2-etilendiamina (120 µl, 1,1 mmol, 12 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y el producto se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar (n.º B127) Rendimiento: 29,1 mg, 57 % . HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 6,92 minutos (pureza del 76 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 606,3 [M+H]<sup>+</sup>.

*Etapa 2.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-[[2-[(yodoacetil)(metil)amino]etil](metil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo] (n.º B128). Una solución de ácido yodoacético (43,1 mg, 0,23 mmol, 4,8 equiv.) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 64,10 mg, 0,3 mmol, 6,3 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (2,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se transfirió a una solución de (n.º B127) (29,1 mg, 76,0 % puro, 0,048 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,2 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos y se purificó por cromatografía de fase inversa para proporcionar (n.º B128) en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 12,2 mg, 54 %. análisis HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,57 minutos (pureza del 95,2 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 774,2 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 7,80 (d, *J* = 7,4, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,36 (dc, *J* = 6,2, 6,2, 1H), 6,33 (d a, *J* = 15,5, 1H), 6,11 (d, *J* = 11,3, 1H), 5,86 (dd, *J* = 11,7, 7,8, 1H), 5,60 (dd, *J* = 16,0, 4,7, 1H), 5,52 (dd a, *J* = 6,6, 6,6, 1H), 4,98 (m, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,26 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 3,51 (dd a, *J* = 6,2, 6,2, 1H), 3,46-3,35 (m, 6H), 3,24 (m, 1H), 3,02 (s, 1,5H), 2,97 (s, 1,5H), 2,95 (s, 1,5H), 2,82 (s, 1,5H), 2,76 (m, 1H), 2,65 (m, 1H), 2,59 (m, 1H), 2,55 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,22 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,86 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,49 (dd, *J* = 12,5, 2,7, 1H), 1,25 (d, *J* = 6,2, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,2, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,0, 3H).

## Ejemplo A41

Preparación de (2Z)-*N*-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]-4-oxopent-2-enamida] (n.º B129).



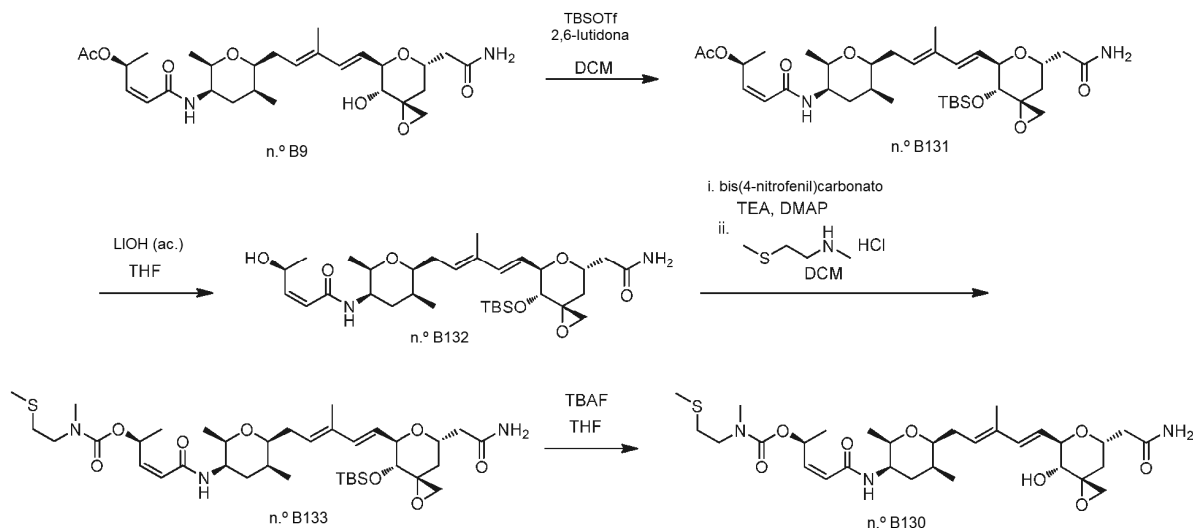
*Etapa 1.* Síntesis de (2Z)-*N*-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]-4-oxopent-2-enamida] (n.º B129): A una solución de n.º B39 (60 mg, 0,13 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (2 ml) a 0 °C se le añadió peryodinano de Dess-Martin (119 mg, 0,27 mmol, 2 equiv.) y el baño de hielo se retiró. Después de 35 min, se añadieron bicarbonato sódico saturado y diclorometano y la capa acuosa se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico y se filtraron y los disolventes se retiraron al vacío. El material en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B129 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 19,04 mg, 0,04 mmol, 32 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 475,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,70

40

minutos. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H), 7,32 (s, 1 H), 6,77 (s, 1 H), 6,32 (s, 2 H), 6,27 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1 H), 5,60 (dd,  $J = 16,0$  y 5,5 Hz, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 4,58-4,50 (m, 1 H), 4,35-4,26 (m, 1 H), 3,69-3,59 (m, 2 H), 3,54-3,48 (m, 1 H), 2,65-2,51 (m, 3 H), 2,36-2,15 (m, 6 H), 1,88-1,73 (m, 3 H), 1,72-1,60 (m, 6 H), 1,37 (dd,  $J = 13,3$  y 6,2 Hz, 1 H), 1,08 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

## 5 Ejemplo A42

**Preparación de metil[2-(metilsulfanil)etil]carbamato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B130).**



10 **Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-  
 15 {[(terc-butil(dimetil)silil]oxi)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-  
 il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B131). : A una solución de n.º B9 (119 mg, 0,22 mmol, 1 equiv.) en  
 diclorometano (3 ml) a 0 °C se le añadió 2,6-lutidona (104  $\mu\text{l}$ , 0,89 mmol, 4 equiv.) seguido de terc-butildimetilsilil-  
 trifluorometanosulfonato (160  $\mu\text{l}$ , 0,67 mmol, 3 equiv.) gota a gota. Después de 70 min, la reacción se diluyó con  
 bicarbonato sódico saturado y diclorometano, se extrajo, se filtró sobre un tubo separador de disolvente y los  
 disolventes se retiraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía líquida de presión  
 media de fase inversa eluída con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo  
 (v/v) (5 % al 100 %) para proporcionar n.º B131 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 34 mg, 0,05  
 mmol, 23 %. CLEM (Protocolo C):  $m/z$  671,3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , tiempo de retención = 2,08 minutos.

20 **Etapa 2.** Síntesis de (2Z,4S)-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-  
 25 {[(terc-butil(dimetil)silil]oxi)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-  
 il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo]-4-  
 hidroxipent-2-enamida (n.º B132). A una solución de n.º B131 (32 mg, 0,049 mmol, 1 equiv.) en 4:1 de  
 tetrahidrofurano:agua (1 ml) se le añadió hidróxido de litio (11,7 mg, 0,49 mmol, 10 equiv.) y la mezcla se agitó a  
 temperatura ambiente durante 21 horas. La reacción se concentró al vacío, y el residuo se recogió en acetato de  
 etilo y agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x) y las capas orgánicas combinadas se secaron  
 sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron al vacío. La purificación por cromatografía líquida a presión  
 media de fase inversa eluída con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v)  
 (10 % al 100 %) proporcionó n.º B132 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 11,3 mg, 0,019 mol,  
 38 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  629,3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , tiempo de retención = 0,98 minutos.

30 **Etapa 3.** Síntesis de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-  
 35 {[(terc-butil(dimetil)silil]oxi)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-  
 il]amino]-5-oxopent-3-en-2-il]metil[2-(metilsulfanil)etil]carbamato (n.º B133): A una solución de n.º B132 (63,2 mg,  
 0,104 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (1,8 ml) se le añadieron trietilamina (73  $\mu\text{l}$ , 0,520 mmol, 5 equiv.), 4-*N*-  
 dimetilaminopiridina (8,9 mg, 0,073 mmol, 0,7 equiv.) y bis-(4-nitrofenil)-carbonato (106 mg, 0,343 mmol, 3,3  
 equiv.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. A 1/3 de esta mezcla se le añadió  
 clorhidrato de *N*-metil-2-(metilsulfanil)etanamina (24,6 mg, 0,174 mmol, 1,67 equiv.) y la mezcla se agitó a  
 temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se diluyó con agua, se extrajo con diclorometano, se filtró  
 sobre un tubo separador de disolvente, se diluyó con dimetilsulfóxido (1 ml) y se concentró al vacío. El residuo se  
 purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º B133. Rendimiento: 15,2 mg,  
 0,021 mmol, 20 %. CLEM (Protocolo C):  $m/z$  760,76  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , tiempo de retención = 2,19 minutos.

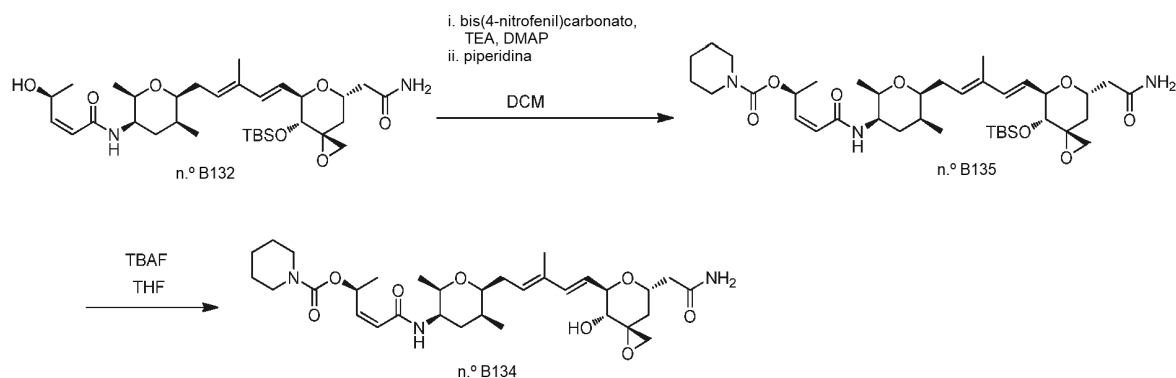
**Etapa 4.** Síntesis de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-  
 dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-



ilmetil[2-(metilsulfanil)etil]carbamato (n.º **B130**). : A una solución de n.º **B133** (15,2 mg, 0,021 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (0,4 ml) enfríada a 0 °C se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en tetrahidrofurano, 53 µl, 0,053 mmol, 2,5 equiv.), y la reacción se calentó a ta después 10 min. Después de 1,5 horas, la reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º **B130**. Rendimiento: 8,5 mg, 0,014 mmol, 65 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  646,3  $[M+Na]^+$ , tiempo de retención = 0,79 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,77 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H), 7,31 (s, 1 H), 6,77 (s, 1 H), 6,32 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1 H), 6,26-6,18 (m, 1 H), 6,09 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1 H), 5,89 (dd,  $J = 11,5$  y 7,0 Hz, 1 H), 5,60 (dd,  $J = 16,0$  y 5,5 Hz, 1 H), 5,54-5,47 (m, 1 H), 5,00 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1 H), 4,29-4,21 (m, 2 H), 3,69-3,61 (m, 2 H), 3,54-3,47 (m, 1 H), 3,42-3,33 (m, 2 H), 3,26-3,21 (m, 1 H), 2,89-2,78 (m, 3 H), 2,74 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,64-2,56 (m, 3 H), 2,36-2,17 (m, 4 H), 2,07 (s, 3 H), 1,90-1,78 (m, 3 H), 1,72-1,61 (m, 4 H), 1,54-1,46 (m, 1 H), 1,26 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,0$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A43

Preparación de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B134**).

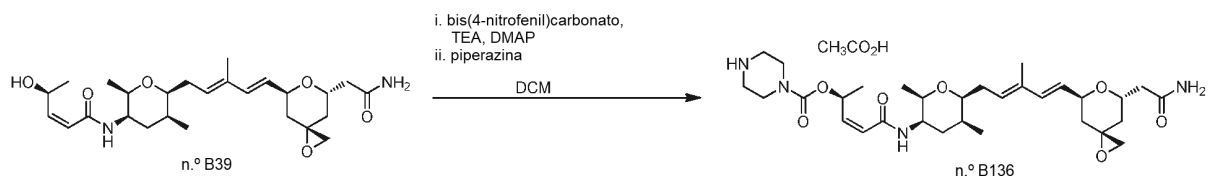


**Etapas 1.** Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-ilo]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B135**): Usando el procedimiento descrito en la etapa 3 del ejemplo A42, el compuesto del título se preparó con un rendimiento del 18 % a partir de 63,2 mg (0,104 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B132**, trietilamina (73 µl, 0,520 mmol, 5 equiv.), 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (8,9 mg, 0,073 mmol, 0,7 equiv.) y bis-(4-nitrofenil)-carbonato (106 mg, 0,343 mmol, 3,3 equiv.) y piperidina (14,8 mg, 0,174 mmol, 1,7 equiv.) usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B133**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  740,5  $[M+Na]^+$ , tiempo de retención = 1,13 minutos.

**Etapas 2.** Síntesis de piperidin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B134**): El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 76 % a partir de 13,5 mg (0,019 mmol) de n.º **B135** y 12,8 mg (53 µl de 1 M en tetrahidrofurano, 0,053 mmol, 2,5 equiv.) de fluoruro de tetrabutilamonio usando el procedimiento descrito para el compuesto n.º **B130**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  626,60  $[M+Na]^+$ , tiempo de retención = 0,81 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,77 (d,  $J = 7,80$  Hz, 1 H), 7,31 (s, 1 H), 6,77 (s, 1 H), 6,32 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1 H), 6,26-6,17 (m, 1 H), 6,09 (d,  $J = 11,7$  Hz, 1 H), 5,89 (dd,  $J = 11,7$  y 7,4 Hz, 1 H), 5,60 (dd,  $J = 16,0$  y 5,5 Hz, 1 H), 5,54-5,47 (m, 1 H), 5,00 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1 H), 4,29-4,20 (m, 2 H), 3,69-3,61 (m, 2 H), 3,54-3,47 (m, 1 H), 3,27-3,21 (m, 1 H), 2,75 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,58 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,36-2,16 (m, 4 H), 1,88-1,78 (m, 3 H), 1,73-1,61 (m, 4 H), 1,57-1,38 (m, 7 H), 1,25 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A44

Preparación de piperazin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º **B136**

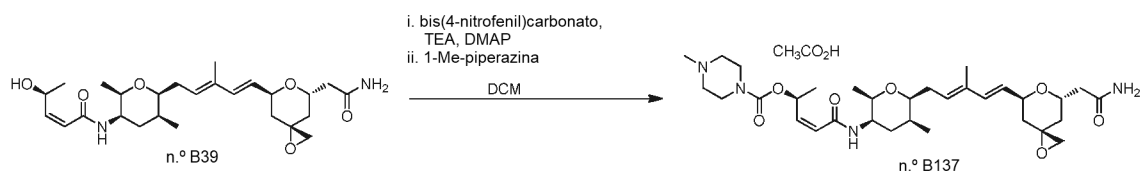


40

5 **Etapa 1.** Síntesis de piperazin-1-carboxilato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º **B136**).: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 27 % a partir de 37 mg (0,078 mmol) de trietilamina (39,7 mg, 0,39 mmol, 5 equiv.), 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (6,7 mg, 0,055 mmol, 0,7 equiv.), bis-(4-nitrofenil)-carbonato (84,7 mg, 0,273 mmol, 3,5 equiv.) y piperazina (16,8 mg, 0,195 mmol, 2,5 equiv.) usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B133**. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>): tiempo de retención = 6,318 minutos (pureza del 95 %). CLEM (Protocolo C): *m/z* 589,4 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 0,97 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,77 (d, *J* = 8,20 Hz, 1 H), 7,31 (s, 1 H), 6,77 (s, 1 H), 6,31-6,17 (m, 2 H), 6,09 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 5,89 (dd, *J* = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,60 (dd, *J* = 15,6 y 5,5 Hz, 1 H), 5,55-5,45 (m, 1 H), 4,57-4,50 (m, 1 H), 4,35-4,25 (m, 1 H), 3,69-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,46 (m, 2 H), 2,65-2,53 (m, 4 H), 2,36-2,14 (m, 4 H), 1,88 (s, 3 H), 1,85-1,73 (m, 3 H), 1,72-1,61 (m, 5 H), 1,41-1,33 (m, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,0 Hz, 3 H).

#### Ejemplo A45

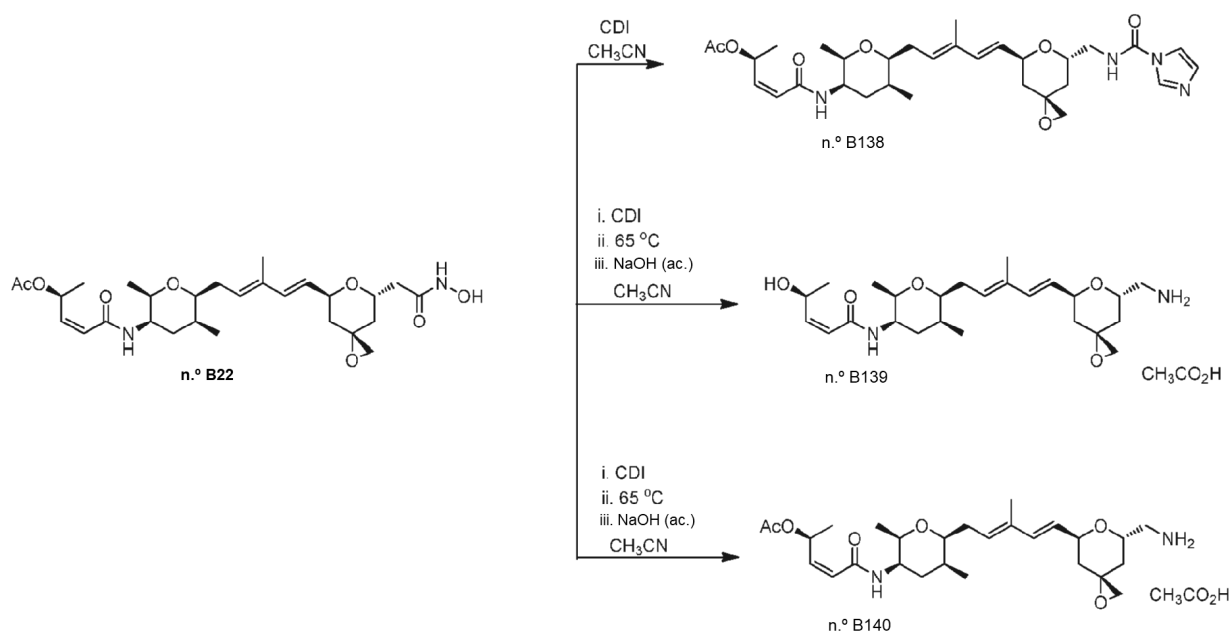
15 **Preparación de** (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-il-4-metilpiperazin-1-carboxilato (n.º **B137**).



20 **Etapa 1.** Síntesis de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-il-4-metilpiperazin-1-carboxilato, sal acetato (n.º **B137**).: El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 27 % a partir de 37 mg (0,078 mmol) de trietilamina (39,7 mg, 0,39 mmol, 5 equiv.), 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (6,7 mg, 0,055 mmol, 0,7 equiv.), bis-(4-nitrofenil)-carbonato (84,7 mg, 0,273 mmol, 3,5 equiv.) y 1-Me-piperazina (19,5 mg, 0,195 mmol, 2,5 equiv.) usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B133**. CLEM (Protocolo C): *m/z* 603,4 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 1,29 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,77 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,32 (s, 1 H), 6,77 (s, 1 H), 6,32-6,19 (m, 2 H), 6,10 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 5,89 (dd, *J* = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,60 (dd, *J* = 16,0 y 5,9 Hz, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 4,58-4,50 (m, 1 H), 4,35-4,26 (m, 1 H), 3,71-3,61 (m, 2 H), 3,55-3,47 (m, 2 H), 2,65-2,53 (m, 3 H), 2,36-2,14 (m, 8 H), 1,89 (s, 3 H), 1,85-1,74 (m, 3 H), 1,72-1,61 (m, 5 H), 1,42-1,33 (m, 1 H), 1,26 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,96 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H).

#### Ejemplo A46

30 **Preparación de acetato de** (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-[(1H-imidazol-1-ilcarbonil)amino]metil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B138**). Y (2Z,4S)-*N*-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-(aminometil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]-4-hidroxipent-2-enamida, sal acetato (n.º **B139**) y acetato de (2S,3Z)-5-1[(2R,3R,5S,6S)-6-1(2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-(aminometil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º **B140**).



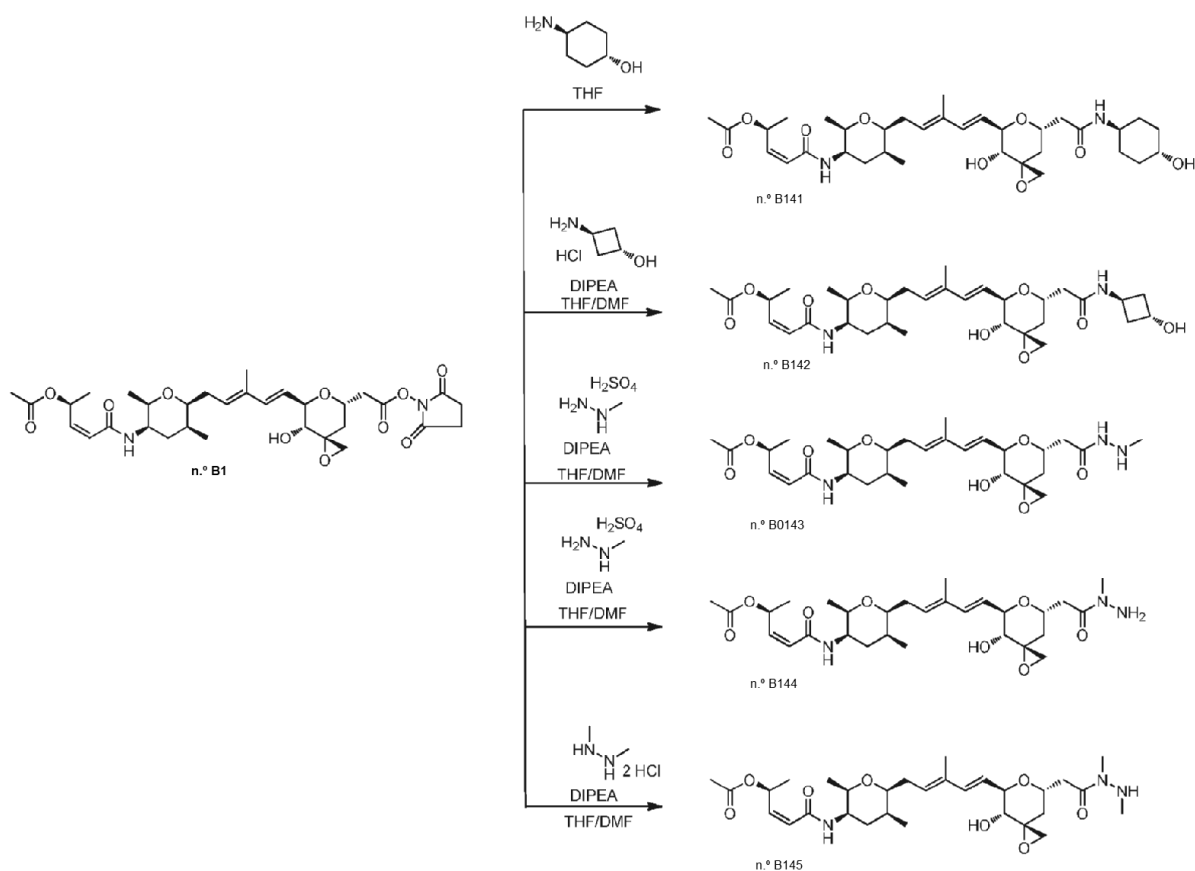
**Etapa 1a.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-((1H-imidazol-1-ilcarbonyl)amino)metil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B138): A una solución de n.º **B22** (15,9 mg, 0,030 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (0,6 ml) a ta se le añadió carbonildiimidazol (7,4 mg, 0,045 mmol, 1,5 equiv.), y la reacción se dejó en agitación durante 10 min. Después, la reacción se calentó a 60 °C durante 5,5 horas y se enfrió a ta. Se añadieron agua y diclorometano y la capa acuosa se extrajo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico y se filtraron y los disolventes se retiraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B138** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 3,4 mg, 0,0059 mmol, 20 %. CLEM (Protocolo C): *m/z* 585,4 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,40 minutos. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 7,426 minutos (pureza del 83 %).

**Etapa 1b.** Síntesis de (2Z,4S)-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-(aminometil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]-4-hidroxipent-2-enamida, sal acetato (n.º B139): A una solución de n.º **B22** (35,2 mg, 0,066 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (2,2 ml) a ta se le añadió carbonil diimidazol (16,2 mg, 0,099 mmol, 1,5 equiv.), y la reacción se dejó en agitación durante 30 min. Después, la reacción se calentó a 60 °C durante 5 horas. La reacción se enfrió a ta, se añadió a una solución de acetonitrilo (33 ml), agua (17 ml) y NaOH 1 N (17 ml) y se dejó agitar a ta durante 15 min. La reacción se diluyó con agua y el acetonitrilo se retiró al vacío. La solución acuosa se extrajo con diclorometano, se neutralizó con ácido acético (0,5 ml) y se concentró al vacío. El residuo se recogió en acetonitrilo, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B139** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 7,7 mg, 0,015 mmol, 23 %. CLEM (Protocolo C): *m/z* 449,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,93 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 7,76 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 6,26 (d, *J* = 15,6 Hz, 1 H), 5,97 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 5,86 (dd, *J* = 11,7 y 7,0 Hz, 1 H), 5,67 (dd, *J* = 15,6 y 5,8 Hz, 1 H), 5,56-5,49 (m, 1 H), 5,21-5,13 (m, 1 H), 4,54-4,46 (m, 1 H), 3,79-3,71 (m, 1 H), 3,70-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,46 (m, 1 H), 2,80 (dd, *J* = 12,9 y 7,4 Hz, 1 H), 2,62 (s, 2 H), 2,58-2,53 (m, 1 H), 2,37-2,14 (m, 2 H), 1,89-1,56 (m, 11 H), 1,44 (dd, *J* = 13,3 y 7,4 Hz, 1 H), 1,11 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,96 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H).

**Etapa 1c.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,5S,7S)-7-(aminometil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º B140): A una solución de n.º **B22** (50,8 mg, 0,095 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (3,1 ml) a ta se le añadió carbonil diimidazol (23,4 mg, 0,143 mmol, 1,5 equiv.), y la reacción se dejó en agitación durante 30 min. Después, la reacción se calentó a 65 °C durante 4 horas. La reacción se enfrió a ta, se añadió a una solución de acetonitrilo (83 ml), agua (6 ml) y NaOH 1 N (6 ml) y se dejó agitar a ta durante 35 min. La reacción se neutralizó con ácido acético (0,35 ml) y se concentró al vacío. El residuo se recogió en acetonitrilo, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B140** Rendimiento: 15 mg, 0,030 mmol, 32 %. CLEM (Protocolo C): *m/z* 491,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,13 minutos. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 6,969 minutos (pureza del 87 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 7,78 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 6,42-6,30 (m, 1 H), 6,26 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 11,5 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,5 y 7,4 Hz, 1 H), 5,67 (dd, *J* = 16,0 y 5,8 Hz, 1 H), 5,56-5,49 (m, 1 H), 4,54-4,46 (m, 1 H), 3,81-3,73 (m, 1 H), 3,69-3,61 (m, 2 H), 3,54-3,46 (m, 1 H), 2,80 (dd, *J* = 12,9 y 7,4 Hz, 1 H), 2,63 (s, 2 H), 2,58-2,53 (m, 1 H), 2,37-2,14 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,84-1,56 (m, 8 H), 1,44 (dd, *J* = 13,3 y 7,4 Hz, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 0,96 (d, *J* = 7,0 Hz, 3 H).

## Ejemplo A47

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-[(trans-4-hidrox ciclohexil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B141). Y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-[(cis-3-hidrox ciclobutil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]aminol-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B142). Y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-(2-metilhidrazinil)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B143). Y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-(1-metilhidrazinil)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-illamino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B144). Y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-(1,2-dimetilhidrazinil)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B145).



Etapa 1a. Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-[(trans-4-hidrox ciclohexil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B141): A una solución de n.º B1 (19,7 mg, 0,031 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahidrofurano (0,5 ml) se le añadió trans-4-aminociclohexanol (5,7 mg, 0,049 mmol, 1,6 equiv.) Después de agitar durante 1,5 hora, la reacción se diluyó con agua, se extrajo con diclorometano y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico y se filtraron. Los disolventes se retiraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B141 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 11,8 mg, 0,019 mmol, 60 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 7,408 minutos (pureza del 94 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 633,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,73 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,79 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,68 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 6,42-6,32 (m, 1 H), 6,28 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 11,5 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,5 y 7,4 Hz, 1 H), 5,59 (dd, *J* = 16,0 y 5,5 Hz, 1 H), 5,54-5,45 (m, 1 H), 5,00 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 4,49 (d, *J* = 4,3 Hz, 1 H), 4,30-4,15 (m, 2 H), 3,70-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,39 (m, 2 H), 3,26-3,20 (m, 1 H), 2,74 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,58 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,37-2,10 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 1,89-1,59 (m, 10 H), 1,51-1,41 (m, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,20-1,10 (m, 4 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H).

Etapa 1b. Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-{2-[(cis-3-hidrox ciclobutil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-

piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B142**). A una solución de n.º **B1** (16,2 mg, 0,026 mmol, 1 equiv.) en tetrahydrofurano/*N,N*-dimetilformamida (5:1,0,6 ml) a la que se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (13,7 µl, 0,078 mmol, 3 equiv.) y clorhidrato de trans-3-aminociclobutanol (4,8 mg, 0,039 mmol, 1,5 equiv.) (12:48 pm) y la reacción se agitó durante 2 horas. Se añadieron *N,N*-dimetilformamida (100 µl), *N,N*-diisopropiletilamina (13 µl, 0,078 mmol, 3 equiv.) y clorhidrato de trans-3-aminociclobutanol (3 mg, 0,024 mmol, 0,9 equiv.) adicionales y la reacción se agitó durante un adicional de 30 min. La reacción se diluyó con dimetilsulfóxido y se concentró al vacío para retirar el tetrahydrofurano. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B142** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 9,5 mg, 0,016 mmol, 61 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 7,057 minutos (pureza del 91 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 627,1 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,72 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,03 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,79 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 6,42-6,32 (m, 1 H), 6,28 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,59 (dd, *J* = 16,0 y 5,5 Hz, 1 H), 5,55-5,48 (m, 1 H), 5,07-4,97 (m, 2 H), 4,30-4,17 (m, 2 H), 3,81-3,71 (m, 1 H), 3,70-3,59 (m, 3 H), 3,54-3,46 (m, 1 H), 3,27-3,20 (m, 1 H), 2,75 (d, *J* = 4,9 Hz, 1 H), 2,58 (d, *J* = 4,9 Hz, 1 H), 2,48-2,39 (m, 2 H), 2,36-2,13 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 1,89-1,61 (m, 9 H), 1,49-1,41 (m, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H).

*Etapa 1c.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-(2-metilhidrazinil)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B143**) y acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-(1-metilhidrazinil)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B144**): A una solución de n.º **B1** (32,4 mg, 0,051 mmol, 1 equiv.) en tetrahydrofurano/*N,N*-dimetilformamida (2:1, 0,75 ml) se le añadieron a la *N,N*-diisopropiletilamina (71,8 µl, 0,408 mmol, 8 equiv.) y sulfato de *N*-metilhidrazina (22,1 mg, 0,15 mmol, 3 equiv.) y la reacción se agitó durante 20 min. Se añadió *N,N*-dimetilformamida adicional (250 µl). Después de un adicional de 30 min, se añadieron más *N,N*-diisopropiletilamina (35 µl, 0,20 mmol, 4 equiv.) y sulfato de *N*-metilhidrazina añadieron (15 mg, 0,10 mmol, 2 equiv.) y la reacción se agitó durante 45 min. La reacción se diluyó con agua y acetato de etilo y la capa acuosa se extrajo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B143** y n.º **B144** en forma de sólidos de color blanco.

n.º **B143** Rendimiento: 1,9 mg, 0,0034 mmol, 7 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 564,2 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,73 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,31 (d, *J* = 5,9 Hz, 1 H), 7,81 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 6,41-6,32 (m, 1 H), 6,29 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,87 (dd, *J* = 11,6 y 7,6 Hz, 1 H), 5,59 (dd, *J* = 16,0 y 5,6 Hz, 1 H), 5,54-5,48 (m, 1 H), 5,04 (d, *J* = 5,4 Hz, 1 H), 4,80-4,72 (m, 1 H), 4,29-4,20 (m, 2 H), 3,69-3,61 (m, 2 H), 3,53-3,46 (m, 1 H), 3,27-3,21 (m, 1 H), 2,75 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,58 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,45-2,13 (m, 7 H), 1,98 (s, 3 H), 1,89-1,74 (m, 3 H), 1,72-1,58 (m, 4 H), 1,53-1,45 (m, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H).

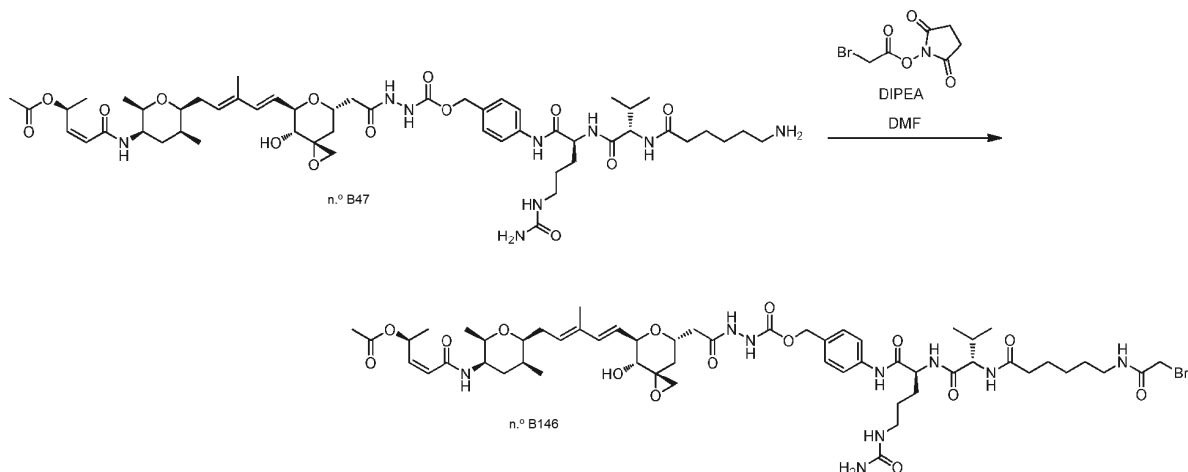
n.º **B144** Rendimiento: 2,3 mg, 0,0040 mmol, 8 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 564,2 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,76 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,81 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 6,41-6,27 (m, 2 H), 6,11 (d, *J* = 11,5 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,5 y 7,3 Hz, 1 H), 5,60 (dd, *J* = 16,1 y 5,9 Hz, 1 H), 5,56-5,48 (m, 1 H), 4,94 (d, *J* = 6,4 Hz, 1 H), 4,67 (s, 1 H), 4,32-4,20 (m, 2 H), 3,69-3,62 (m, 2 H), 3,53-3,47 (m, 1 H), 3,26-3,21 (m, 1 H), 3,06 (dd, *J* = 15,4 y 7,3 Hz, 1 H), 2,98 (s, 2 H), 2,75 (d, *J* = 4,9 Hz, 1 H), 2,62-2,53 (m, 2 H), 2,35-2,13 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 1,89-1,74 (m, 3 H), 1,72-1,58 (m, 5 H), 1,25 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H).

*Etapa 1d.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-[2-(1,2-dimetilhidrazinil)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B145**). : A una solución de n.º **B1** (29,7 mg, 0,047 mmol, 1 equiv.) en tetrahydrofurano/*N,N*-dimetilformamida (1:1, 1 ml) a la que se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (116 µl, 0,658 mmol, 14 equiv.) seguido de diclorhidrato de *N,N*-dimetilhidrazina (31,3 mg, 0,235 mmol, 5 equiv.) y la reacción se agitó durante 30 min. La reacción se diluyó con agua y acetato de etilo y la capa acuosa se extrajo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B145** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 2,2 mg, 0,0038 mmol, 8 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 578,2 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,82 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,81 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 6,41-6,27 (m, 2 H), 6,11 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,7 y 7,6 Hz, 1 H), 5,60 (dd, *J* = 15,9 y 5,4 Hz, 1 H), 5,56-5,48 (m, 1 H), 4,94 (d, *J* = 6,6 Hz, 1 H), 4,79 (c, *J* = 5,7 Hz, 1 H), 4,32-4,19 (m, 2 H), 3,68-3,61 (m, 2 H), 3,53-3,47 (m, 1 H), 3,26-3,21 (m, 1 H), 3,01 (d, *J* = 15,2 y 7,3 Hz, 1 H), 2,93 (s, 3 H), 2,76-2,73 (m, 1 H), 2,60-2,53 (m, 2 H), 2,44 (d, *J* = 5,7 Hz, 3 H), 2,35-2,15 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 1,87-1,75 (m, 3 H), 1,72-1,56 (m, 5 H), 1,25 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H).

## Ejemplo A48

Preparación de N-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil}-D-valil-N-[4-[[2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinil]carbonil]oxi]metil]fenil]-N-5-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B146).

5



**Etapa 1.** Síntesis de N-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil}-D-valil-N-[4-[[2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinil]carbonil]oxi]metil]fenil]-N-5-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B146). A una solución de n.º B47 (10,4 mg, 0,009 mmol, 1 equiv.) en *N,N* dimetilformamida (0,3 ml) a ta se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (6,3 µl, 0,036 mmol, 4 equiv.) seguido de 1-[(bromoacetil)oxi]pirrolidin-2,5-diona (4,2 mg, 0,017 mmol, 1,9 equiv.) y se agitó durante 15 minutos y después se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar n.º B146 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 4,6 mg, 0,004 mmol, 43 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>): tiempo de retención = 7,597 minutos (pureza del 87 %). CLEM (Protocolo C): *m/z* 1188,6 [M+H]<sup>+</sup> tiempo de retención = 1,37 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,99 (s, 1 H), 9,68 (s, 1 H), 9,12 (s, 1 H), 8,26-8,18 (m, 1 H), 8,11-8,04 (m, 1 H), 7,84-7,74 (m, 2 H), 7,64-7,54 (m, 2 H), 7,34-7,21 (m, 2 H), 6,41-6,27 (m, 2 H), 6,11 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 6,00-5,93 (m, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,65-5,47 (m, 2 H), 5,40 (s, 2 H), 5,04 (d, *J* = 5,5 Hz, 1 H), 5,02-4,96 (m, 2 H), 4,43-4,34 (m, 1 H), 4,30-4,16 (m, 3 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,45 (m, 1 H), 3,26-3,20 (m, 1 H), 3,09-2,88 (m, 4 H), 2,77-2,73 (m, 1 H), 2,62-2,55 (m, 1 H), 2,36-2,07 (m, 5 H), 1,98 (s, 3 H), 1,84-1,76 (m, 1 H), 1,73-1,61 (m, 5 H), 1,54-1,33 (m, 5 H), 1,29-1,21 (m, 5 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H), 0,84 (dd, *J* = 11,3 y 6,6 Hz, 6 H).

10

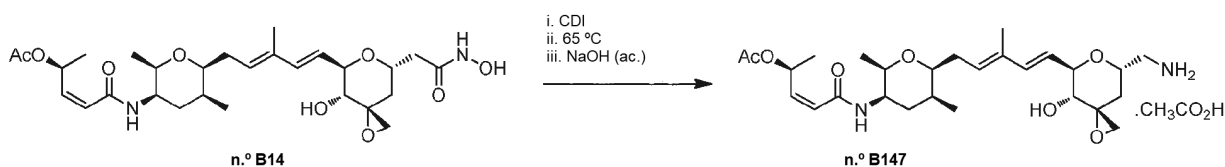
15

20

## Ejemplo A49

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(aminometil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º B147).

25



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(aminometil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B147): A una solución de n.º B14 (40 mg, 0,073 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (2,3 ml) se le añadió CDI (29,8 mg, 0,182 mmol, 2,5 equiv.) a ta y la reacción se agitó durante 40 min. Después, la reacción se calentó a 65 °C durante 4 horas. Después de enfriar a ta, la mezcla de reacción se añadió a una solución de acetonitrilo (63 ml), agua (4,5 ml) y NaOH 1 N (4,5 ml) y se agitó durante 30 min. Se añadió ácido acético (270 µl) y la mezcla se concentró al vacío. El residuo obtenido se recogió en acetonitrilo, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B147 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 5,1 mg, 0,0088 mmol, 12 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 6,778 minutos (pureza del 89 %). CLEM (Protocolo C): *m/z* 507,2 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,98 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,77 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H), 6,41-6,24 (m, 2 H), 6,11 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,7 y

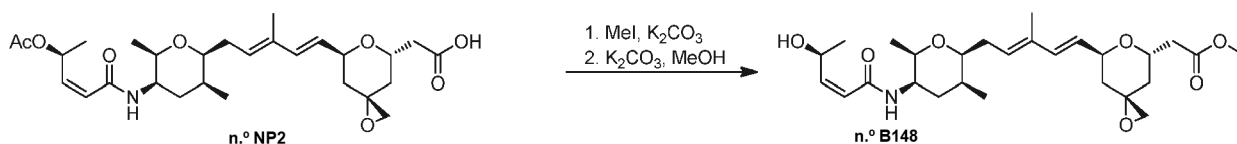
30

35

7,4 Hz, 1 H), 5,65 (dd,  $J = 16,0$  y  $6,2$  Hz, 1 H), 5,56-5,48 (m, 1 H), 5,00-4,91 (m, 1 H), 4,27-4,20 (m, 1 H), 3,78-3,60 (m, 3 H), 3,55-3,46 (m, 1 H), 3,22-3,18 (m, 1 H), 2,80-2,71 (m, 2 H), 2,62-2,53 (m, 2 H), 2,33-2,15 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 1,89-1,77 (m, 5 H), 1,73-1,61 (m, 4 H), 1,48-1,41 (m, 1 H), 1,25 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,0$  Hz, 3 H).

## 5 Ejemplo A50

**Preparación de [(3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B148).**

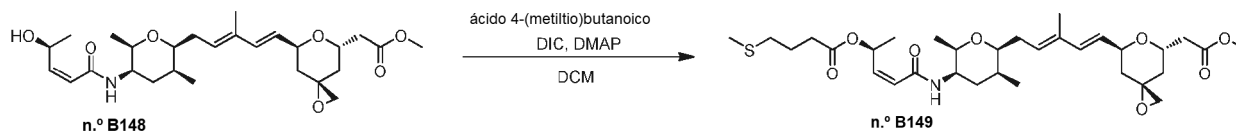


10 **Etapa 1.** Síntesis de [(3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B148): A una solución de n.º NP2 (204 mg, 0,393 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (4,5 ml) a ta se le añadieron carbonato potásico (272 mg, 1,96 mmol, 5 equiv.) y yodometano (740  $\mu$ l, 11,8 mmol, 30 equiv.) y la reacción se agitó durante 1,5 horas. La reacción se filtró, se lavó con agua (3 x), se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró al vacío. CLEM (protocolo D):  $m/z$  534,42  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,89 min. El material en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

15 **Etapa 2.** Síntesis de [(3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B148). A una solución del material en bruto de la Etapa 1 del ejemplo A n.º 50 en metanol (3,5 ml) a ta se le añadió carbonato potásico (136 mg, 0,056 mmol, 2,5 equiv.) y la reacción se agitó durante 2 horas. La reacción se filtró con metanol, se diluyó con dimetilsulfóxido (2 ml) y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía líquida a presión media de fase inversa eluída con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (10 % al 90 %) proporcionó n.º B148 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 91,6 mg, 0,18 mmol, 48 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  492,47  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,80 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,76 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1 H), 6,25 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1 H), 5,97 (d,  $J = 11,9$  Hz, 1 H), 5,87 (d,  $J = 11,9$  y  $7,0$  Hz, 1 H), 5,65-5,48 (m, 2 H), 5,22-5,13 (m, 1 H), 5,10 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1 H), 4,56-4,48 (m, 1 H), 4,36-4,25 (m, 1 H), 3,69-3,61 (m, 2 H), 3,60 (s, 3 H), 3,55-3,46 (m, 1 H), 2,74-2,56 (m, 4 H), 2,38-2,13 (m, 2 H), 1,90-1,60 (m, 9 H), 1,44 (dd,  $J = 13,2$  y  $7,0$  Hz, 1 H), 1,11 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,06 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,0$  Hz, 3H).

## 30 Ejemplo A51

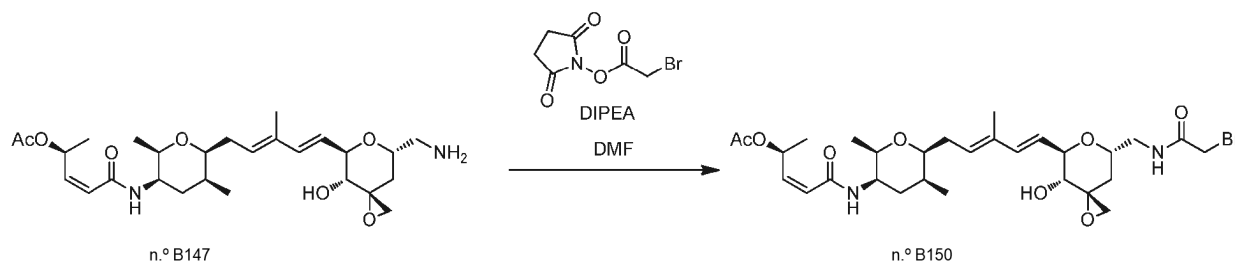
**Preparación de 4-(metilsulfanil)butanoato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B149).**



35 **Etapa 1.** Síntesis de 4-(metilsulfanil)butanoato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B149). A una solución de n.º B148 (12 mg, 0,024 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (0,5 ml) se le añadieron ácido 4-(metiltio)butanoico (32,2 mg, 0,24 mmol, 10 equiv.), 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (2,9 mg, 0,023 mmol, 1 equiv.) y DIC (41,3  $\mu$ l, 0,264 mmol, 11 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 1 hora. La reacción se diluyó con dimetilsulfóxido (0,8 ml) y se concentró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B149 en forma de una goma. Rendimiento: 9,7 mg, 0,016 mmol, 66 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  608,2  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,05 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,79 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1 H), 6,44-6,32 (m, 1 H), 6,25 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1 H), 6,12 (d,  $J = 11,7$  Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,7$  y  $7,4$  Hz, 1 H), 5,62-5,50 (m, 2 H), 4,57-4,48 (m, 1 H), 4,36-4,25 (m, 1 H), 3,70-3,62 (m, 2 H), 3,60 (s, 3 H), 3,55-3,47 (m, 1 H), 2,74-2,56 (m, 4 H), 2,48-2,43 (m, 2 H), 2,41-2,15 (m, 4 H), 2,02 (s, 3 H), 1,88-1,60 (m, 11 H), 1,44 (dd,  $J = 12,9$  y  $6,6$  Hz, 1 H), 1,26 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3H).

## Ejemplo A52

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[[[(bromoacetil)amino]metil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo] (n.º B150).



5

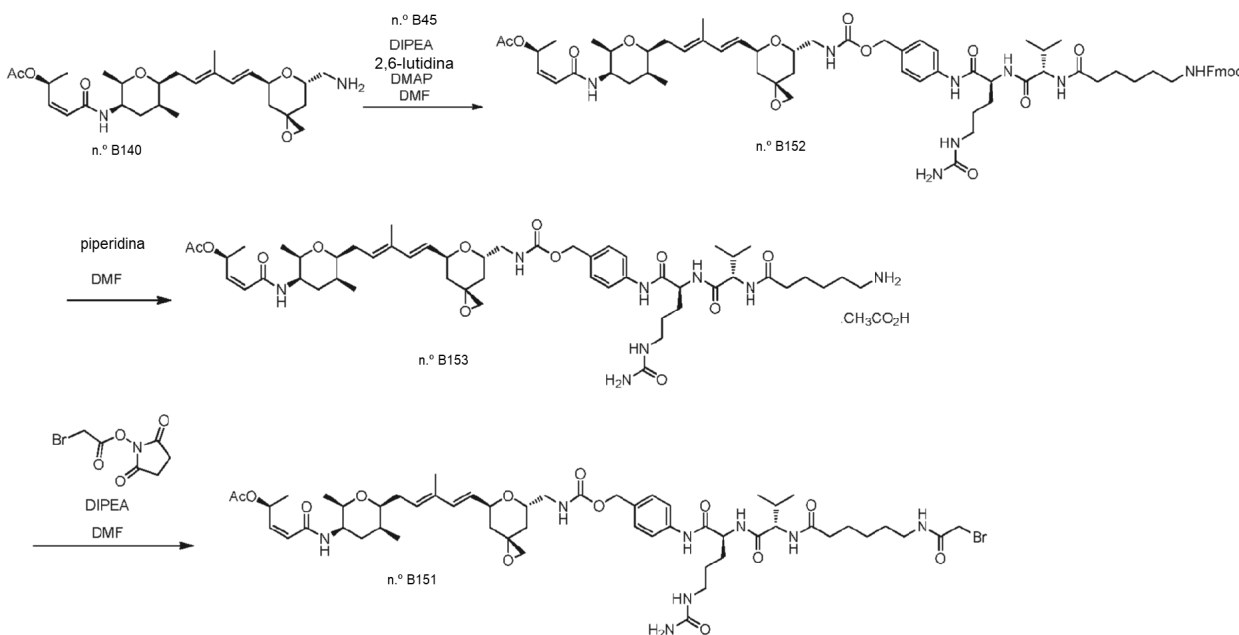
**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[[[(bromoacetil)amino]metil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo] (n.º B150): A una solución de n.º B147 (7 mg, 0,01 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,4 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (8,5 µl, 0,048 mmol, 4 equiv.) y 1-[[[(bromoacetil)oxi]pirrolidin-2,5-diona (4,2 mg, 0,018 mmol, 1,5 equiv.) y la reacción se agitó durante 10 min. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B150 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 2,9 mg, 0,005 mmol, 40 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 649,2 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,81 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,42-8,32 (m, 1 H), δ 7,79 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 6,44-6,32 (m, 1 H), 6,28 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,3 y 7,4 Hz, 1 H), 5,61 (dd, *J* = 16,0 y 5,5 Hz, 1 H), 5,56-5,49 (m, 1 H), 5,02 (d, *J* = 5,9 Hz, 1 H), 4,33-4,26 (m, 1 H), 3,95-3,83 (m, 3 H), 3,72-3,59 (m, 2 H), 3,55-3,45 (m, 1 H), 3,40-3,32 (m, 1 H), 3,28-3,14 (m, 2 H), 2,77 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,61 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,31-2,12 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,88-1,75 (m, 3 H), 1,73-1,61 (m, 4 H), 1,51-1,41 (m, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,0 Hz, 3 H).

10

15

## Ejemplo A53

20 Preparación de *N*-{6-[[[(bromoacetil)amino]hexanoil]-*L*-valil-*N*-(4-[[[(3R,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]metil]carbamoil)oxi]metil]fenil)-*N*-5~-carbamoil-*L*-ornitinamida] (n.º B151).



25

**Etapa 1.** Síntesis de *N*-{6-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]hexanoil]-*L*-valil-*N*-(4-[[[(3R,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]metil]carbamoil)oxi]metil]fenil)-*N*-5~-carbamoil-*L*-ornitinamida] (n.º B152). A una solución de n.º B140 (10,7 mg, 0,022 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida a ta se le añadieron 2,6-lutidina (10,2 µl, 0,088 mmol, 4 equiv.), *N,N*-diisopropiletilamina (15,5 µl, 0,088 mmol, 4 equiv.), 4-*N,N*-



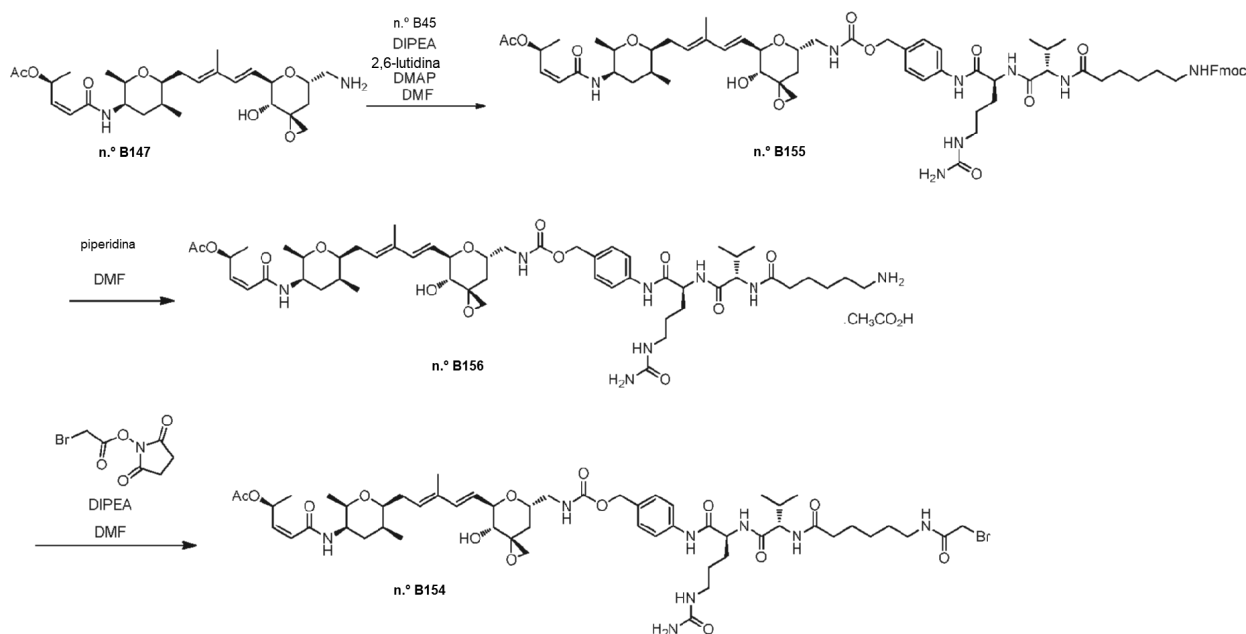
dimetilaminopiridina (2,7 mg, 0,022 mmol, 1 equiv.) y n.º B45 (22,9 mg, 0,026 mmol, 1,2 equiv.), y la reacción se agitó durante 40 min. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B152 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 14,9 mg, 0,012 mmol, 55 %. CLEM (Protocolo C):  $m/z$  1231,6  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,97 minutos.

5 *Etapa 2.* Síntesis de N-(6-(aminohexanoil)-L-valil-N-(4-(((3R,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)metil)carbamoil)oxi)metil)fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida, sal acetato (n.º B153): El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 86 % a partir de 14,9 mg (0,012 mmol, 1,0 equiv.) del n.º B152 y 20,4 mg (0,24 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º B47. CLEM (Protocolo C):  $m/z$  1009,83  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,35 minutos.

15 *Etapa 3.* Síntesis de N-(6-((bromoacetil)amino)hexanoil)-L-valil-N-(4-(((3R,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)metil)carbamoil)oxi)metil)fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B151). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 70 % a partir de 11 mg (0,01 mmol, 1,0 equiv.) de n.º B153 y 3,5 mg (0,015 mmol, 1,5 equiv.) 1-((bromoacetil)oxi)pirrolidin-2,5-diona y 5,2 mg (0,04 mmol, 4,0 equiv.) de N,N-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º B150. HPLC (Protocolo A) tiempo de retención = 8,413 minutos (pureza del 87 %). CLEM (Protocolo C):  $m/z$  1151,5  $[M+Na]^+$ , tiempo de retención = 1,61 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,96 (s, 1 H), 8,25-8,18 (m, 1 H), 8,06 (d,  $J$  = 7,4 Hz, 1 H), 7,83-7,74 (m, 2 H), 7,62-7,54 (m, 2 H), 7,31-7,20 (m, 3 H), 6,41-6,31 (m, 1 H), 6,25 (d,  $J$  = 15,8 Hz, 1 H), 6,11 (d,  $J$  = 11,7 Hz, 1 H), 6,00-5,92 (m, 1 H), 5,87 (dd,  $J$  = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,61 (dd,  $J$  = 15,8 y 5,9 Hz, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 5,39 (s, 2 H), 5,00-4,88 (m, 2 H), 4,59-4,49 (m, 1 H), 4,43-4,34 (m, 1 H), 4,24-4,15 (m, 2 H), 3,99-3,88 (m, 1 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,58 (m, 2 H), 3,53-3,36 (m, 2 H), 3,10-2,88 (m, 5 H), 2,63 (s, 2 H), 2,31-2,08 (m, 4 H), 2,02-1,92 (m, 4 H), 1,83-1,56 (m, 10 H), 1,55-1,29 (m, 7 H), 1,28-1,20 (m, 5 H), 1,05 (d,  $J$  = 6,6 Hz, 3 H), 0,94 (d,  $J$  = 7,4 Hz, 3 H), 0,85 (dd,  $J$  = 11,3 y 6,6 Hz, 6 H).

## 25 Ejemplo A54

**Preparación de N-(6-((bromoacetil)amino)hexanoil)-L-valil-N-(4-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)metil)carbamoil)oxi)metil)fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B154).**



30 *Etapa 1.* Síntesis de N-(6-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)hexanoil)-L-valil-N-(4-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)metil)carbamoil)oxi)metil)fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B155). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 41 % a partir de 13 mg (0,023 mmol) de n.º B147, 9,9 mg, (0,092 mmol, 4 equiv.) de 2,6-lutidina, 12,0 mg (0,092 mmol, 4 equiv.) de N,N-diisopropiletilamina, 2,8 mg, (0,023 mmol, 1 equiv.) de 4-N,N-dimetilaminopiridina y 24,6 mg (0,028 mmol, 4 equiv.) de n.º B45 (22,9 mg, 0,026 mmol, 1,2 equiv.) usando el procedimiento descrito para la preparación de n.º B152. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1247,93  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,91 minutos.

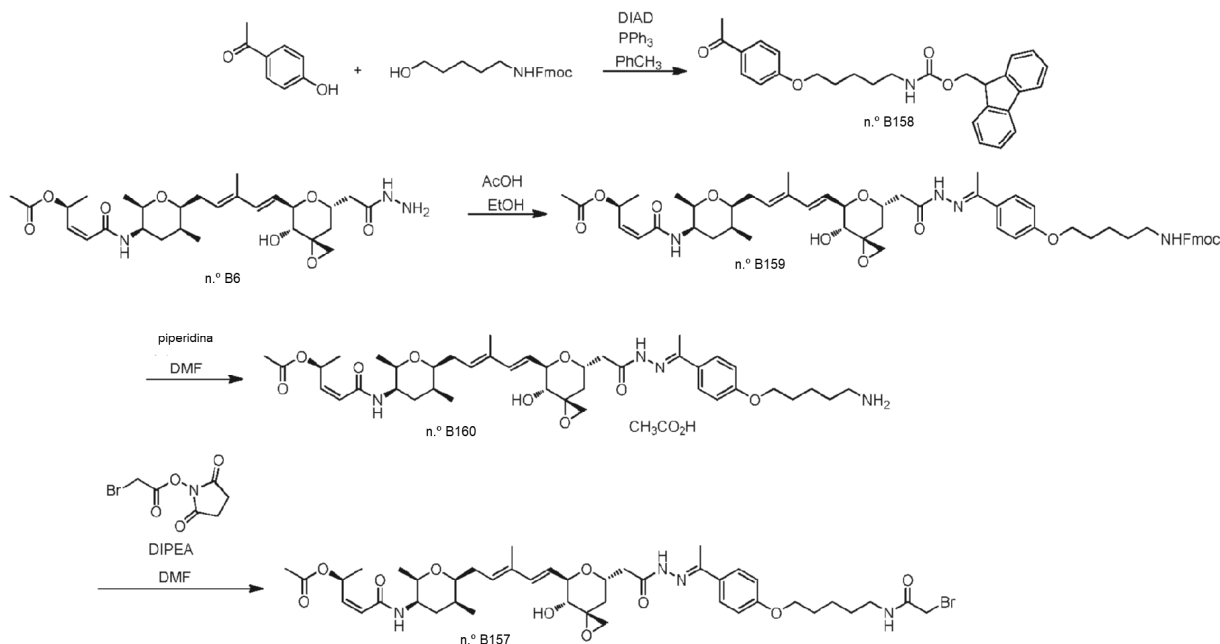
35

**Etapa 2.** Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-(4-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]metil]carbamoil]oxi]metil]fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida, sal acetato (n.º **B156**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 66 % a partir de 11,9 mg (0,01 mmol, 1,0 equiv.) de n.º **B155** y **17,0 mg (0,2 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina** usando el procedimiento descrito para la preparación del n.º **B153**. HPLC (Protocolo A<sup>a</sup>) tiempo de retención = 7,001 minutos (pureza del 82 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 1025,4 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,69 minutos.

**Etapa 3.** Síntesis de N-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil}-L-valil-N-(4-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]metil]carbamoil]oxi]metil]fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B154**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del en 46 % a partir de 6,1 mg (0,006 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B156**, 5,0 mg (0,015 mmol, 7,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina y 3,5 mg, 0,015 mmol, 1,5 equiv.) de 1-[(bromoacetil)oxi]pirrolidin-2,5-diona usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B150**. HPLC (Protocolo A<sup>a</sup>) tiempo de retención = 7,669 minutos (pureza del 84 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 1151,5 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,79 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,99 (s, 1 H), 8,27-8,19 (m, 1 H), 8,16-8,06 (m, 1 H), 7,89-7,73 (m, 2 H), 7,62-7,54 (m, 2 H), 7,31-7,20 (m, 3 H), 6,41-6,31 (m, 1 H), 6,27 (d, *J* = 16,4 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 10,9 Hz, 1 H), 6,05-5,94 (m, 1 H), 5,86 (dd, *J* = 10,9 y 7,0 Hz, 1 H), 5,67-5,56 (m, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 5,40 (s, 2 H), 5,02-4,88 (m, 3 H), 4,44-4,33 (m, 2 H), 4,30-4,23 (m, 1 H), 4,22-4,15 (m, 2 H), 3,96-3,84 (m, 1 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,58 (m, 2 H), 3,53-3,43 (m, 2 H), 3,10-2,89 (m, 5 H), 2,79-2,71 (m, 1 H), 2,61-2,56 (m, 1 H), 2,31-2,10 (m, 4 H), 2,04-1,91 (m, 4 H), 1,84-1,32 (m, 15 H), 1,30-1,18 (m, 4 H), 1,06 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,94 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H), 0,84 (dd, *J* = 10,9 y 6,6 Hz, 6 H).

### Ejemplo A55

**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-2-[(2E)-2-{1-[4-[(5-[(bromoacetil)amino]pentil]oxi]fenil]etilideno]hidrazinil]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo** (n.º **B157**).



**Etapa 1.** Síntesis de [5-(4-acetilfenoxi)pentil]carbamoilato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (n.º **B158**): A una solución de 5-hidroxi-pentilcarbamoilato de (9H-fluoren-9-il)metilo (5 g, 15,4 mmol, 1 equiv.), 1-(4-hidroxi-fenil)etanona (2,1 g, 15,4 mmol, 1 equiv.) y trifenilfosfina (4,53 g, 16,9 mmol, 1,1 equiv.) en tolueno (50 ml) se le añadió gota a gota DIAD (3,43 g, 16,9 mmol, 1,1 equiv.) a 0-10 °C. La solución se agitó a ta durante 1 hora, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. Las capas orgánicas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluido con éter de petróleo:acetato de etilo de 10:1 a 7:1 y se purificó además por cromatografía de fase inversa para proporcionar n.º **B158** (3,6 g, 53 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,93 (d, 2 H), 7,76 (d, 2 H), 7,59 (d, 2 H), 7,42 (m, 2 H), 7,33 (m, 2 H), 6,92 (d, 2 H), 4,79 (m, 1 H), 4,43 (m, 2 H), 4,23 (m, 1 H), 4,04 (m, 2 H), 3,25 (m, 2 H), 2,55 (s, 3 H), 1,84 (m, 2 H), 1,58-1,52 (m, 4 H).

**Etapa 2.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-2-[(2E)-2-(1-[4-[(5-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]pentil]oxi]fenil]etilideno]hidrazinil]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-

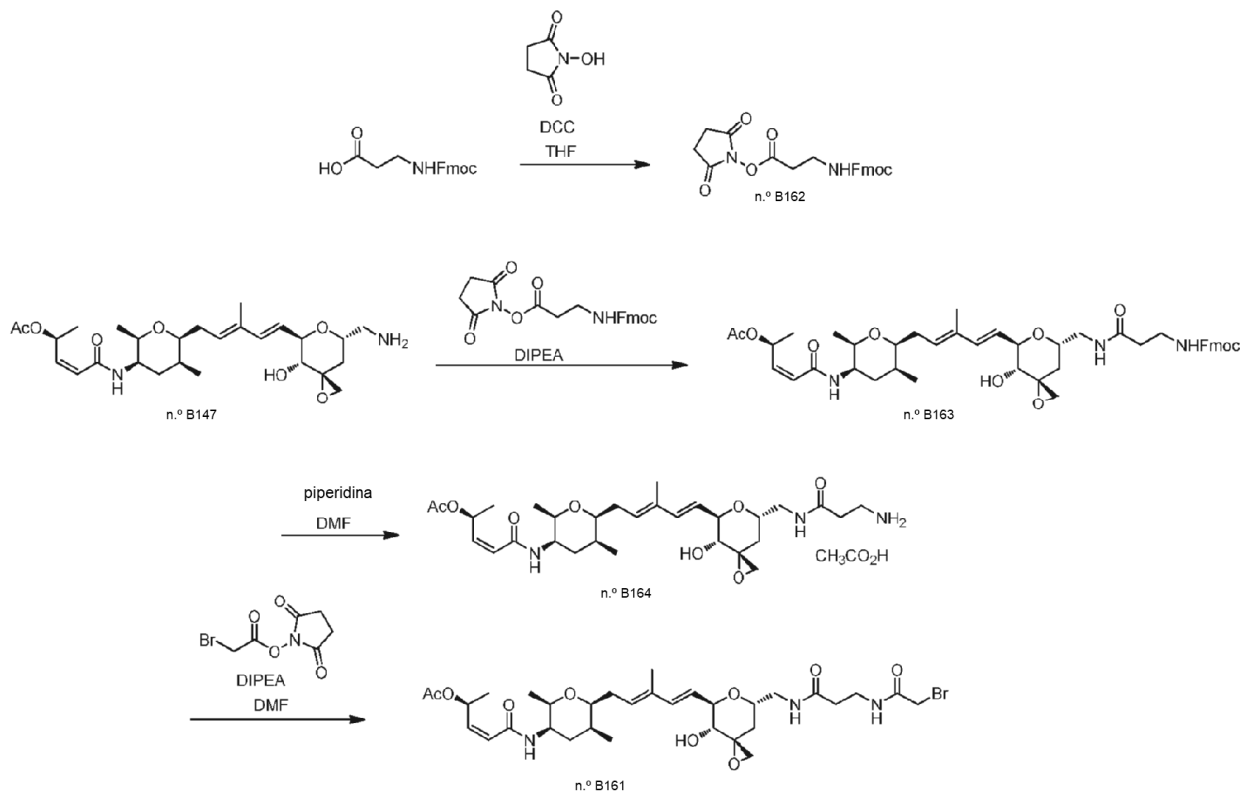
dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B159**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 33 % a partir de 30,8 mg (0,056 mmol, 1,0 equiv.) de n.º **B6** y 124,0 mg (0,28 mmol, 5,0 equiv.) del n.º **B158** usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B20**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  975,4  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,05 minutos.

5 *Etapa 3.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2E)-2-(1-{4-[(5-aminopentil)oxi]fenil)etilideno]hidrazinil]-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º **B160**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 64 % a partir de 17,8 mg (0,018 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B159** y 30,7 mg (0,36 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del n.º **B47**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  753,62  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,66 minutos.

15 *Etapa 4.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2E)-2-(1-{4-[(5-[(bromoacetil)amino]pentil)oxi]fenil)etilideno]hidrazinil]-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B157**): El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 46 % a partir de 6,2 mg (0,008 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B160** y 2,8 mg (0,012 mmol, 1,5 equiv.) de 1-[(bromoacetil)oxi]pirrolidin-2,5-diona y 4,2 mg (0,032 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B150**. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 8,668 minutos (pureza del 53 %). CLEM (Protocolo D):  $m/z$  873,3  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,88 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-<sub>d</sub><sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 10,39-10,25 (m, 1 H), 8,30-8,20 (m, 1 H), 7,82-7,66 (m, 3 H), 6,99-6,90 (m, 2 H), 6,42-6,22 (m, 2 H), 6,16-6,06 (m, 1 H), 5,92-5,81 (m, 1 H), 5,68-5,34 (m, 3 H), 5,09-4,92 (m, 1 H), 4,51-4,25 (m, 3 H), 4,03-3,94 (m, 2 H), 3,82 (s, 2 H), 3,70-3,55 (m, 2 H), 3,50-3,40 (m, 1 H), 3,15-3,05 (m, 2 H), 2,90-2,71 (m, 2 H), 2,64-2,56 (m, 2 H), 2,30-2,10 (m, 5 H), 1,98 (s, 3 H), 1,94-1,84 (m, 1 H), 1,83-1,55 (m, 8 H), 1,53-1,33 (m, 4 H), 1,29-1,20 (m, 3 H), 1,12-1,00 (m, 3 H), 0,98-0,88 (m, 3 H).

#### Ejemplo A56

25 **Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[[N-(bromoacetil)-beta-alanil]amino]metil]-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B161**)**



30 *Etapa 1.* Síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-beta-alaninato (n.º **B162**). A una solución de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-beta-alanina (297 mg, 0,95 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (3,5 ml) a ta se le añadieron *N*-hidroxisuccinimida (112 mg, 0,954 mmol, 1 equiv.) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (228 mg, 1,05 mmol, 1,1 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 4 horas. La reacción se filtró lavándose con acetato de etilo y se concentró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía

líquida de presión media de fase inversa eluida con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (10 % al 95 %) para dar n.º **B162** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 320 mg, 0,78 mmol, 82 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  431,0  $[M+Na]^+$ , tiempo de retención = 0,91 minutos.

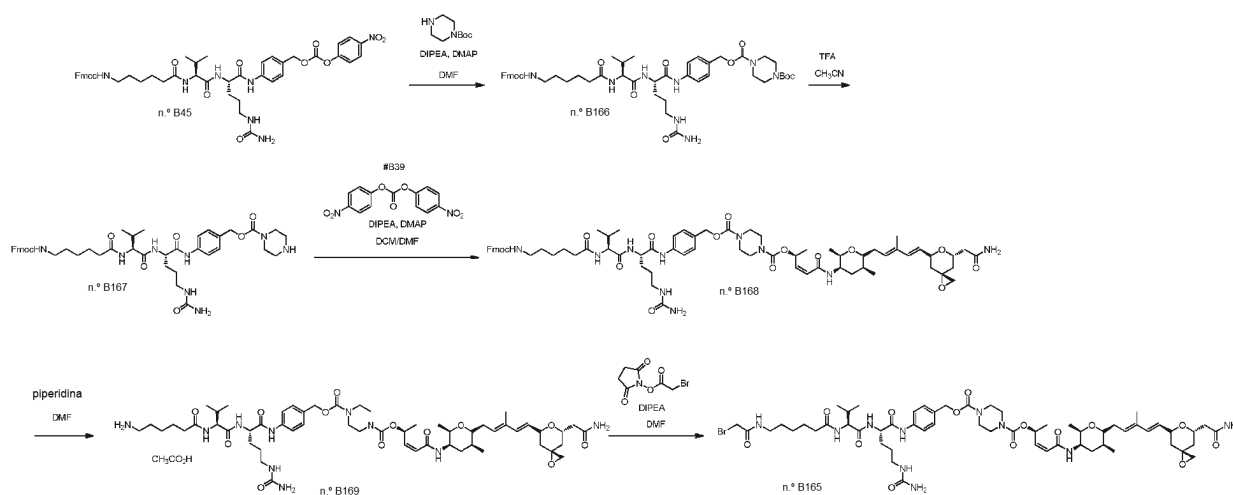
**Etapa 2.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-((N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-beta-alanil)amino)metil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B163**). A una solución de n.º **B147** (15,1 mg, 0,027 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (14,3 µl, 0,081 mmol, 3 equiv.) y n.º **B162** (22,1 mg, 0,054 mmol, 2 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 30 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar una mezcla del n.º **B163** deseado y n.º **B162** sin reaccionar CLEM (Protocolo D):  $m/z$  800,4  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,97 minutos. Este material se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

**Etapa 3.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-((beta-alanilamino)metil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º **B164**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 63 % a partir de 15,7 mg (0,02 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B163** y 34,1 mg (0,4 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B47**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  578,41  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,62 minutos.

**Etapa 4.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-((N-(bromoacetil)-beta-alanil)amino)metil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B161**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 43 % a partir de 7,3 mg (0,013 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B164** y 4,5 mg (0,019 mmol, 1,5 equiv.) de 1-((bromoacetil)oxi)pirrolidin-2,5-diona y 6,8 mg (0,052 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B150**. HPLC (Protocolo A) tiempo de retención = 6,564 minutos (pureza del 72 %). CLEM (Protocolo D):  $m/z$  698,1  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,79 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,31-8,23 (m, 1 H), 8,02-7,93 (m, 1 H),  $\delta$  7,78 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1 H), 6,41-6,32 (m, 1 H), 6,28 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1 H), 6,11 (d,  $J = 11,7$  Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,7$  y 7,4 Hz, 1 H), 5,61 (dd,  $J = 15,8$  y 5,5 Hz, 1 H), 5,56-5,45 (m, 1 H), 5,00 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1 H), 4,31-4,24 (m, 1 H), 3,93-3,79 (m, 3 H), 3,72-3,59 (m, 2 H), 3,55-3,45 (m, 1 H), 3,27-3,08 (m, 3 H), 3,28-3,14 (m, 2 H), 2,77 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,61 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,36-2,14 (m, 4 H), 1,98 (s, 3 H), 1,88-1,75 (m, 3 H), 1,73-1,61 (m, 4 H), 1,51-1,41 (m, 1 H), 1,25 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,0$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A57

**Preparación de N-(6-((bromoacetil)amino)hexanoil)-L-valil-N-4-(((4-(((2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-il)oxi)carbonil)piperazin-1-il)carbonil)oxi)metil)fenil)-N-5-~carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B165**).**



**Etapa 1.** Síntesis de N-(6-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)hexanoil)-L-valil-N-4-(((4-(terc-butoxicarbonil)piperazin-1-il)carbonil)oxi)metil)fenil)-N-5-~carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B166**). A una solución de piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (32 mg, 0,17 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,9 ml) se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (90,8 µl, 0,52 mmol, 3 equiv.) y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (4,2 mg, 0,034 mmol, 0,2 equiv.) seguido del n.º **B45** (151 mg, 0,17 mmol, 1 equiv.) y la reacción se agitó durante 30 min. La reacción se diluyó con DMSO (2,5 ml) y se purificó por cromatografía líquida a presión media de fase inversa eluyendo con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (10 % al 95 %)

para dar **n.º B166** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 114 mg, 0,12 mmol, 71 %. CLEM (Protocolo C):  $m/z$  927,5  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,89 minutos.

**Etapa 2.** Síntesis de N-(6-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)hexanoil)-L-valil-N~5~-carbamoil-N-(4-((piperazin-1-ilcarbonil)oxi)metil)fenil)-L-ornitinamida (**n.º B167**). En dos recipientes separados, una suspensión de **n.º B166** (106 mg total, 0,11 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (6 ml) a ta se añadió a TFA (800  $\mu$ l) y las reacciones se agitaron durante 1,5-2 horas. Las reacciones se concentraron al vacío, se volvieron a diluir con acetonitrilo y se concentraron (3 x) al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía líquida de presión media de fase inversa eluída con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (10 % al 100 %) para dar **n.º B167** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 62 mg, 0,066 mmol, 57 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  827,4  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,72 minutos.

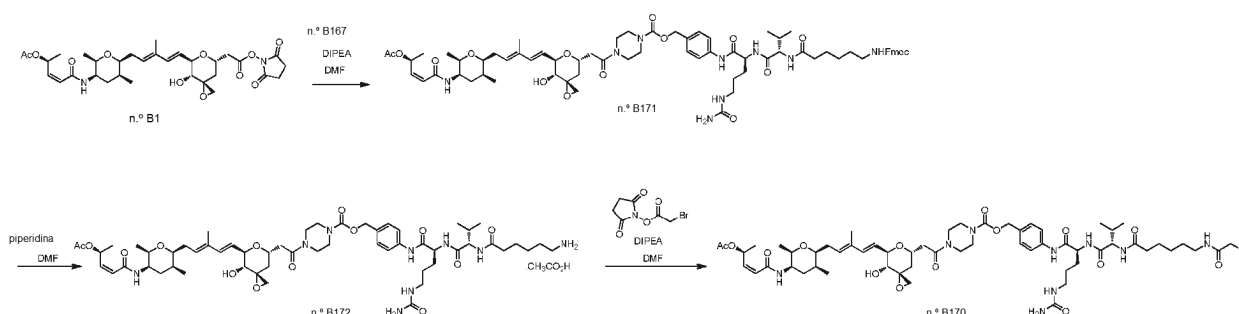
**Etapa 3.** Síntesis de N-(6-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)hexanoil)-L-valil-N-{4-(((4-(((2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-il)oxi)carbonil)piperazin-1-il)carbonil)oxi)metil)fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B168**). A una solución de **n.º B39** (13,5 mg, 0,028 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (0,4 ml) a ta se le añadieron 4-N,N-dimetilaminopiridina (3,4 mg, 0,028 mmol, 1 equiv.), N,N-diisopropiletilamina (24,7  $\mu$ l, 0,14 mmol, 5 equiv.) y bis(4-nitrofenil)carbonato (10,6 mg, 0,034 mmol, 1,2 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 6 horas. Se añadió una solución de **n.º B167** (34,5 mg, 0,037 mmol, 1,3 equiv.) y N,N-diisopropiletilamina (12  $\mu$ l, 0,07 mmol, 2,5 equiv.) en N,N-dimetilformamida (500  $\mu$ l) y la reacción se dejó en agitación durante 1 hora. La reacción se diluyó con DMSO (500  $\mu$ l) y el diclorometano se retiró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B168** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 13 mg, 0,01 mmol, 35 %. CLEM (Protocolo C):  $m/z$  1329,6  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,81 minutos.

**Etapa 4.** Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-{4-(((4-(((2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-il)oxi)carbonil)piperazin-1-il)carbonil)oxi)metil)fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida, sal acetato (**n.º B169**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 80 % a partir de 13 mg (0,01 mmol, 1,0 equiv.) de **n.º B168** y 17,0 mg (0,2 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B47**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1107,5  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,69 minutos.

**Etapa 5.** Síntesis de N-(6-(bromoacetil)amino)hexanoil)-L-valil-N-{4-(((4-(((2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-il)oxi)carbonil)piperazin-1-il)carbonil)oxi)metil)fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B165**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 69 % a partir de 9,4 mg (0,008 mmol, 1,0 equiv.) de **n.º B169** y 2,8 mg (0,012 mmol, 1,5 equiv.) de 1-((bromoacetil)oxi)pirrolidin-2,5-diona y 4,2 mg (0,032 mmol, 4,0 equiv.) de N,N-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B150**. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 7,741 minutos (pureza del 91 %). CLEM (Protocolo C):  $m/z$  1229,4  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,48 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9,99 (s, 1 H), 8,27-8,19 (m 1 H), 8,13-8,04 (m, 1 H), 7,85-7,73 (m, 2 H), 7,64-7,55 (m, 2 H), 7,35-7,26 (m, 3 H), 6,77 (s, 1H), 6,32-6,21 (m, 2 H), 6,10 (d,  $J$  = 12,1 Hz, 1 H), 6,01-5,85 (m, 2 H), 5,59 (dd,  $J$  = 16,0 y 5,5 Hz, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 5,40 (s, 2 H), 5,02 (s, 2 H), 4,58-4,49 (m, 1 H), 4,45-4,25 (m, 2 H), 4,24-4,14 (m, 2 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,60 (m, 2 H), 3,53-3,45 (m, 2 H), 3,43-3,33 (m, 6 H), 3,10-2,89 (m, 4 H), 2,64-2,53 (m, 2 H), 2,38-2,09 (m, 5 H), 2,03-1,92 (m, 1 H), 1,87-1,56 (m, 11 H), 1,55-1,31 (m, 7 H), 1,30-1,19 (m, 5 H), 1,07 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J$  = 7,0 Hz, 3 H), 0,84 (dd,  $J$  = 10,9 y 6,6 Hz, 6 H).

### Ejemplo A58

**Preparación de N-(6-((bromoacetil)amino)hexanoil)-L-valil-N-{4-(((4-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)piperazin-1-il)carbonil)oxi)metil)fenil)-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B170**).**



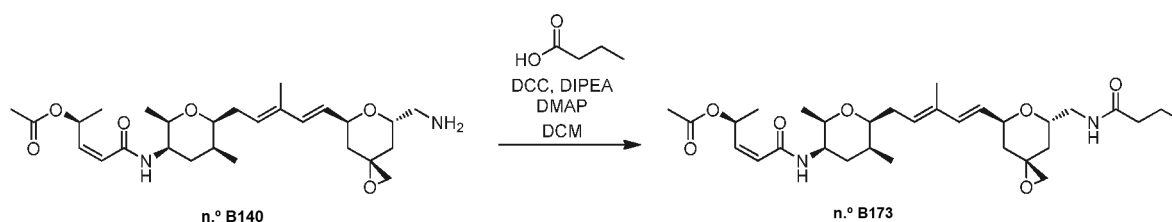
**Etapa 1.** Síntesis de N-(6-[[[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]hexanoil]-L-valil-N-[4-[[[(4-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[[[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]piperazin-1-il]carbonil]oxi]metil]fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B171**): A una solución de n.º **B1** (15 mg, 0,024 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,1 ml) a la que se le añadieron una solución de n.º **B167** (28,2 mg, 0,03 mol, 1,25 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (16,8 µl, 0,096 mmol, 4 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,6 ml), y la reacción se agitó durante 1,5 horas. La reacción se diluyó con dimetilsulfóxido y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B171** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 17,8 mg, 0,013 mmol, 55 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1345,8 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,92 minutos.

**Etapa 2.** Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-[4-[[[(4-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[[[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]piperazin-1-il]carbonil]oxi]metil]fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B172**): El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 79 % a partir de 17,8 mg (0,013 mmol) del n.º **B171** y 22,1 mg (0,26 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B47**. CLEM (Protocolo C): *m/z* 1122,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,23 minutos.

**Etapa 3.** Síntesis de N-(6-[[bromoacetil]amino]hexanoil)-L-valil-N-[4-[[[(4-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[[[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]piperazin-1-il]carbonil]oxi]metil]fenil]-N~5~-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B170**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 57 % a partir de 12,1 mg (0,01 mmol) del n.º **B172** y 3,5 mg (0,015 mmol, 1,5 equiv.) de 1-[[bromoacetil]oxi]pirrolidin-2,5-diona y 5,2 mg (0,04 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B150**. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>) tiempo de retención = 7,925 minutos (pureza del 81 %). CLEM (Protocolo C): *m/z* 1244,4 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,45 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,99 (s, 1 H), 8,27-8,19 (m, 1 H), 8,13-8,04 (m, 1 H), 7,85-7,73 (m, 2 H), 7,64-7,55 (m, 2 H), 7,35-7,26 (m, 2 H), 6,44-6,24 (m, 2 H), 6,10 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 6,03-5,93 (m, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,61 (dd, *J* = 15,6 y 5,5 Hz, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 5,40 (s, 2 H), 5,02 (s, 2 H), 4,98 (d, *J* = 5,9 Hz, 1 H), 4,43-4,33 (m, 2 H), 4,30-4,16 (m, 3 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,60 (m, 2 H), 3,55-3,34 (m, 6 H), 3,26-3,22 (m, 1 H), 3,09-2,89 (m, 4 H), 2,75 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,63-2,55 (m, 2 H), 2,31-2,09 (m, 4 H), 1,98 (s, 3 H), 1,92-1,78 (m, 3 H), 1,73-1,31 (m, 12 H), 1,30-1,19 (m, 5 H), 1,07 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H), 0,84 (dd, *J* = 10,9 y 6,6 Hz, 6 H).

**Ejemplo A59**

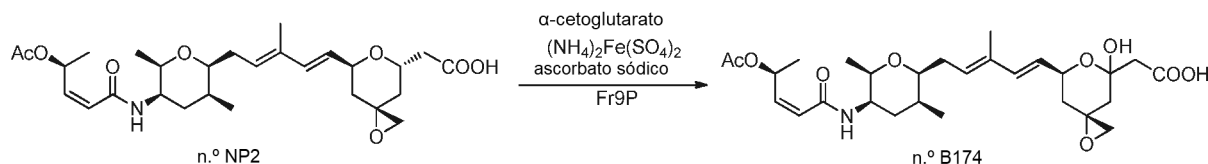
**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[[[(2E,4E)-5-[[[(3R,5S,7S)-7-[[butanoilamino]metil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B173**).**



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[[[(2E,4E)-5-[[[(3R,5S,7S)-7-[[butanoilamino]metil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B173**). A una solución de n.º **B140** (6,7 mg, 0,014 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (0,4 ml) a 0 °C se le añadieron 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (0,4 mg, 0,003 mmol, 0,2 equiv.), *N,N*-diisopropiletilamina (12,3 µl, 0,07 mmol, 5 equiv.) y ácido butírico (6,8 µl, 0,074 mmol, 5,3 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 2 horas a ta. A la reacción se le añadió DCC (8 mg, 0,042 mmol, 3 equiv.) y la reacción se agitó durante 45 min. La reacción se diluyó con acetato de etilo y bicarbonato sódico saturado, se extrajo, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B173** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 3,4 mg, 0,006 mmol, 43 %. HPLC (Protocolo A<sup>A</sup>): tiempo de retención = 8,927 minutos (pureza del 87 %). CLEM (Protocolo D): *m/z* 583,2 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,88 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,84-7,75 (m, 2 H), 6,42-6,32 (m, 1 H), 6,23 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 11,5 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,5 y 7,4 Hz, 1 H), 5,65-5,45 (m, 3 H), 4,60-4,51 (m, 1 H), 3,96-3,85 (m, 1 H), 3,70-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,46 (m, 1 H), 3,12-3,01 (m, 1 H), 2,63 (s, 2 H), 2,32-2,12 (m, 2 H), 2,09-2,01 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,75-1,56 (m, 7 H), 1,55-1,45 (m, 2 H), 1,41-1,33 (m, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,4 Hz, 3 H), 0,88-0,80 (m, 3 H).

## Ejemplo A60

**Preparación de ácido [(3R,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetil-tetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-5-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º B174) mediante biocatálisis con Fr9P recombinante**



5

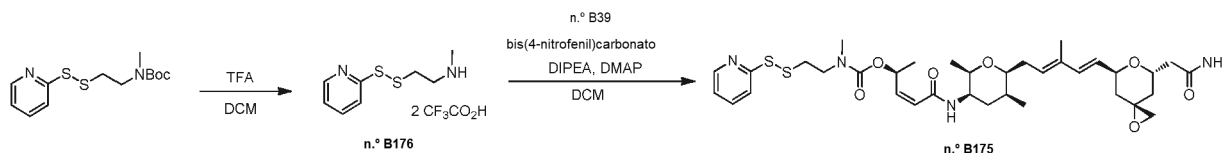
**Etapa 1.** Producción de enzima Fr9P recombinante en una purificación de *Escherichia coli*. El gen Fr9P optimizado en codones (como se describe en la etapa 1 del ejemplo 4) se sintetizó y se ligó en los sitios NcoI-HindIII de pGS-21a (GenScript) para generar pAE-PF16. La proteína recombinante marcada con His<sub>6</sub>-GST Fr9P se produjo y se purificó a partir de *E. coli* BL21 (DE3) después de la transformación con el plásmido pAE-PF16. Se inocularon dos matraces de Fernbach de 2,8 l que contenían 0,5 l de medio (caldo Terrific con 100 mg/l de ampicilina) con 20 ml de un cultivo de LB de una noche y se incubaron a 200 rpm, 25 °C. Cuando el OD<sub>600</sub> alcanzó ~0,9, las células se indujeron con IPTG 0,2 mM y la incubación se reanudó a 25 °C y 200 rpm. Después de 18-20 h, las células se recogieron por centrifugación y se congelaron a -80 °C. El sedimento celular se volvió a suspender en ~50 ml de tampón de lisis enfriado con hielo [tampón de fosfato 10 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM; glicerol al 10 %; lisozima 1 mg/ ml; Tween 20 al 0,5 % (v/v); β-mercaptoetanol 20 mM] y se incubó en hielo durante 30 min. Después de someterse a sonicación en hielo, el lisado celular se centrifugó a 14.000 rpm y 4 °C durante 45 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó de nuevo a 14.000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. Se añadieron 5 ml de suspensión de resina de Ni-NTA (Qiagen) a la fracción sobrenadante (lisado transparente) contenida en un pequeño vaso de precipitados sobre hielo y se agitó suavemente durante 1 hora. La suspensión se transfirió a un tubo Falcon y se centrifugó a 3.000 rpm y 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se descartó y la resina se lavó tres veces, cada uno con 30 ml de tampón de lavado enfriado con hielo [tampón fosfato 10 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM; imidazol 40 mM; glicerol al 10 %; β-ME 20 mM] seguido de centrifugación a 3.000 rpm y 4 °C durante 10 min. La resina se transfirió a una columna desechable y se lavó tres veces más, cada una con un tampón de lavado de 2,5 ml. La enzima eluyó con 3x 2,5 ml de tampón de elución [tampón fosfato 10 mM a pH 7,4; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM; glicerol al 10 %; β-ME 20 mM]. El tampón se cambió a MOPS 50 mM pH 7,5 usando una columna PD-10 y la solución se concentró usando una columna Vivaspín con un corte de peso molecular de 30 kDa. El tampón de almacenamiento contenía 50 mM de MOPS a pH 7,5, DTT 2 mM DTT y glicerol al 10 % (para almacenamiento a -80 °C) o glicerol al 50 % (para almacenamiento a -20 °C). El rendimiento de la enzima purificada ~25 mg por litro de cultivo.

**Etapa 2.** Síntesis de ácido [(3R,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-5-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º B174) usando Fr9P recombinante. A una solución acuosa de n.º NP2 (1 mg, 0,4 mM, 1 equiv.) en tampón MOPS 50 mM a pH 7,5 se le añadieron α-cetoglutarato (concentración final 0,8 mM, 2 equiv.), ascorbato sódico (0,08 mM, 0,2 equiv.), NH<sub>4</sub>Fe(II)SO<sub>4</sub> (0,04 mM, 0,1 equiv.) y Fr9P recombinante de la etapa 1 del ejemplo n.º A60 (1,2 μM, 0,003 equiv.). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se acidificó a pH ~4-5 con ácido acético y se extrajo tres veces con igual volumen de acetato de etilo. El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se volvió a suspender en 0,25 ml de acetonitrilo, se filtró y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento H). La fracción con tiempo de retención de 18,5 min se recogió y se neutralizó con hidróxido de amonio antes de concentrarse a presión reducida. El concentrado acuoso se acidificó a pH ~4 con ácido acético y se extrajo dos veces con igual volumen de acetato de etilo. El disolvente se retiró a presión reducida para proporcionar n.º B174 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 0,2 mg. HPLC (Protocolo P): tiempo de retención = 10,39 minutos. HRESIMS m/z 536,286 [M+H]<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, J en Hz) δ 12,24 (s a, OH), 8,00 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,37 (m, 1H), 6,23 (d, J = 15,9, 1H), 6,12 (dd, J = 0,7, 11,5, 1H), 5,88 (dd, J = 11,6, 7,5 Hz, 1H), 5,54 (m, 1H), 5,50 (m, 1H), 4,67 (m, 1H), 3,66 (m, 2H), 3,51 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 2,53 (m, 1H), 2,33 (m, 1H), 2,31 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,84 (m, 1H), 1,81 (m, 2H), 1,70 (s, 3H), 1,67 (m, 1H), 1,39 (m, 1H), 1,26 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 1,16 (m, 1H), 1,08 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 0,96 (d, J = 7,2 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 171,7, 170,5, 165,0, 142,7, 134,4, 133,3, 128,5, 127,3, 122,6, 95,3, 79,9, 74,8, 67,9, 67,2, 46,7, 46,1, 38,9, 37,7, 35,0, 31,5, 28,7, 20,8, 19,7, 17,6, 14,2, 12,2.

45

## Ejemplo A61

Preparación de metil[2-(piridin-2-ildisulfanil)etil]carbamato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B175).

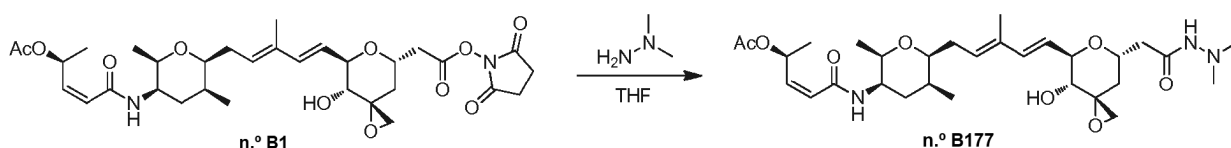


5  
 Etapa 1. Síntesis de *N*-metil-2-(piridin-2-ildisulfanil)etanamina, sal trifluoroacetato (n.º B176). A una solución de metil[2-(piridin-2-ildisulfanil)etil]carbamato de terc-butilo (Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 6469) (90 mg, 0,3 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (1 ml) a ta se le añadió TFA (1 ml) y la reacción se agitó durante 1 hora. La reacción se concentró al vacío se retiró azeotrópicamente con acetonitrilo (3 x) para dar n.º B176 en forma de un aceite. CLEM (protocolo D): *m/z* 201,1 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,43 min. El material en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

15  
 Etapa 2. Síntesis de metil[2-(piridin-2-ildisulfanil)etil]carbamato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B175): A una solución del n.º B39 (19,5 mg, 0,041 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (0,5 ml) a ta se le añadieron 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (5 mg, 0,041 mmol, 1 equiv.), *N,N*-diisopropiletilamina (21,7 µl, 0,123 mmol, 3 equiv.) y bis(4-nitrofenil)carbonato (18,9 mg, 0,62 mmol, 1,5 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 2,5 horas. Se añadió bis(4-nitrofenil)carbonato adicional (3,1 mg, 0,008 mmol, 0,2 equiv.) y la reacción se agitó durante 1,5 horas adicionales. Se añadió una solución de n.º B176 (44,1 mg, 0,103 mmol, 2,5 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (54 µl, 0,31 mmol, 7,5 equiv.) en diclorometano (0,4 ml) y la reacción se agitó durante 1 hora. Se añadió una solución del n.º B176 (17 mg, 0,04 mmol, 1 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (44 µl, 0,25 mmol, 6 equiv.) adicional en diclorometano (0,2 ml) y la reacción se agitó durante otros 15 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con DMSO (1 ml) y el diclorometano se retiró al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía líquida de presión media de fase inversa eluída con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y cido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (10 % al 100 %) para proporcionar n.º B175 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 7,6 mg, 0,011 mmol, 26 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 703,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,91 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) 8,49-8,43 (m, 1 H), 7,87-7,373 (m, 2 H), 7,32 (s, 1 H), 7,28-7,21 (m, 1 H), 6,78 (s, 1 H), 6,32 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 6,26 (d, *J* = 16,4 Hz, 1 H), 6,23-6,13 (m, 1 H), 6,11-5,98 (m, 1 H), 5,93-5,84 (m, 1 H), 5,76-5,67 (m, 1 H), 5,59 (dd, *J* = 15,9 y 5,6 Hz, 1 H)

## 30 Ejemplo A n.º 62

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[2-(2,2-dimetilhidrazinil)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B177).

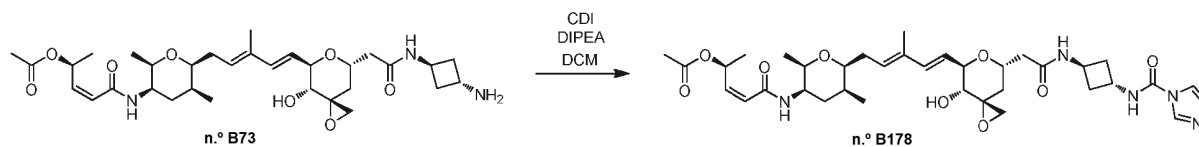


35  
 Etapa 1. Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[2-(2,2-dimetilhidrazinil)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B177). A una solución de n.º B1 (26,8 mg, 0,042 mmol, 1 equiv.) disuelta en tetrahidrofurano (1 ml) a ta se le añadió *N,N*-dimetilhidrazina (16 µ, 0,21 mmol, 5 equiv.) Después de agitar durante 40 min, se añadió más *N,N*-dimetilhidrazina (6,4 µl, 0,084 mmol, 2 equiv.) y la reacción se agitó durante 5 min. La reacción se diluyó con agua, se extrajo con acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico y se filtraron. Los disolventes se retiraron al vacío. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B177 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 14,5 mg, 0,025 mmol, 60 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 578,5 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,72 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,85 (s, 0,6 H), 8,33 (s, 0,4 H), 7,93-7,84 (m, 1 H), 6,40-6,27 (m, 2 H), 6,10 (d, *J* = 11,6 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,6 y 7,6 Hz, 1 H), 5,63-5,54 (m, 1 H), 5,53-5,46 (m, 1 H), 5,09 (d, *J* = 5,1 Hz, 0,6 H), 5,01 (d, *J* = 6,6 Hz, 0,4 H), 4,35-4,16 (m, 2 H), 3,68-3,60 (m, 2 H), 3,53-3,46 (m, 1 H), 3,27-3,21 (m, 1 H), 2,99-2,90 (m, 0,6 H), 2,76 (d, *J* = 5,4 Hz, 1 H), 2,60-2,53 (m, 1 H), 2,47-2,38 (m, 6,4 H), 2,34-2,26 (m, 1 H), 2,25-2,15 (m, 1 H), 2,06 (dd, *J* = 14,2 y 4,9 Hz, 1 H), 1,98 (s, 3 H), 1,87-1,72 (m, 3 H), 1,71-1,58 (m, 4 H), 1,51-1,43 (m, 1 H), 1,24 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,94 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H).



## Ejemplo A n.º 63

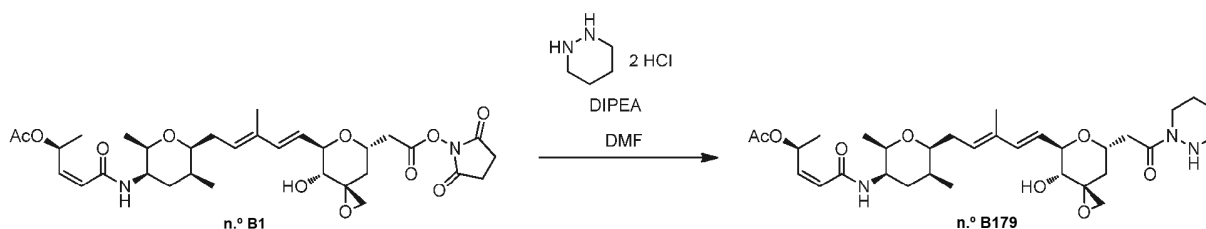
Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-((trans-3-[(1W-imidazol-1-ilcarbonil)amino]ciclobutil)amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B178).



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-((trans-3-[(1H-imidazol-1-ilcarbonil)amino]ciclobutil)amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B178). A una solución de n.º B73 (15,3 mg, 0,025 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (0,5 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (8,8 µl, 0,05 mmol, 2 equiv.) y carbonildimidazol (4,9 mg, 0,03 mmol, 1,2 equiv.) y la reacción se agitó durante 25 min. La reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico, se filtró, se diluyó con DMSO (0,8 ml) y se concentró para retirar el diclorometano. El material deseado en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B178 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 3,2 mg, 0,0045 mmol, 18 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  698,6  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,68 minutos. RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,67 (d,  $J = 6,9$  Hz, 1 H), 8,37 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 7,78 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1 H), 7,70-7,67 (m, 1 H), 7,02 (s, 1 H), 6,40-6,27 (m, 2 H), 6,10 (dd, 11,6 y 1,5 Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,6$  y 7,3 Hz, 1 H), 5,60 (dd,  $J = 15,7$  y 5,6 Hz, 1 H), 5,52-5,45 (m, 1 H), 5,01 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1 H), 4,43-4,34 (m, 1 H), 4,33-4,21 (m, 2 H), 3,67-3,54 (m, 2 H), 3,48-3,43 (m, 1 H), 3,30-3,26 (m, 1 H), 2,78 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,60-2,54 (m, 2 H), 2,39-2,13 (m, 7 H), 1,98 (s, 3 H), 1,83-1,74 (m, 3 H), 1,69 (s, 3 H), 1,65-1,53 (m, 3 H), 1,25 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 1,04 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 0,93 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 64

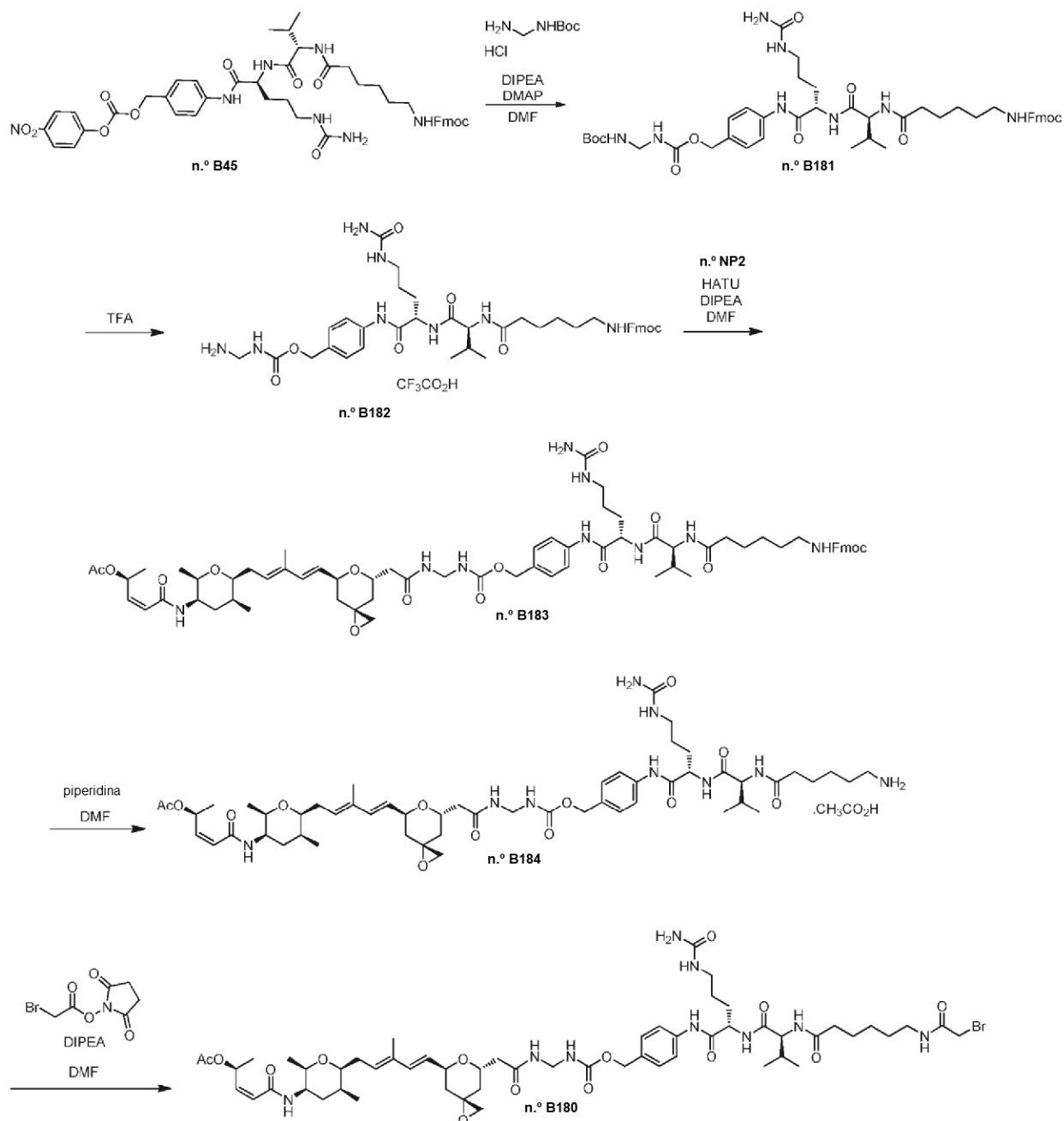
Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(tetrahidropiridazin-1(2H)-il)etil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B179).



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[2-oxo-2-(tetrahidropiridazin-1(2H)-il)etil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B179). A una solución de n.º B1 (18,1 mg, 0,029 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,6 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (51,1 µl, 0,29 mmol, 10 equiv.) y clorhidrato de hexahidropiridazina (18,5 mg, 0,12 mmol, 4 equiv.) y la reacción se agitó durante 30 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B179 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 10,7 mg, 0,018 mmol, 61 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  604,6  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,80 minutos. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,79 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H), 6,42-6,27 (m, 2 H), 6,11 (d,  $J = 11,7$  Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,7$  y 7,4 Hz, 1 H), 5,61 (dd,  $J = 16,0$  y 5,9 Hz, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 4,92 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1 H), 4,76 (t ap.,  $J = 7,0$  Hz, 1 H), 4,34-4,18 (m, 2 H), 3,70-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,40 (m, 3 H), 3,27-3,21 (m, 1 H), 3,03 (dd,  $J = 15,2$  y 7,4 Hz, 1 H), 2,81-2,70 (m, 3 H), 2,55 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1 H), 2,33-2,15 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,85-1,74 (m, 3 H), 1,71-1,56 (m, 5 H), 1,55-1,48 (m, 4 H), 1,25 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

Ejemplo A n.º 65

Preparación de *N*-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil}-*L*-valil-*N*⁵-carbamoil-*N*-[4-[[[(3*S*,5*S*,7*S*)-7-{(1*E*,3*E*-5-[(2*S*,3*S*,SR,6*R*)-5-[(2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino]metil]carbamoil]oxi]metil]fenil}-*N*-5-carbamoil-*L*-ornitinamida (n.º B180).



5

10

15

**Etapa 1.** Síntesis de *N*-{6-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}hexanoil}-*L*-valil-*N*⁵-carbamoil-*N*-[4-(9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,8-dioxo-4,6-diazadec-1-il)fenil]-*L*-ornitinamida (n.º **B181**). Una solución de clorhidrato de aminometilcarbamoil de terc-butilo (J. Org. Chem., 1980, 45, 1703, 32,9 mg, 0,18 mmol, 1 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (47 µl, 0,27 mmol, 3 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (1 ml) se añadió gota a gota a una solución de **n.º B45** (161,5 mg, 0,18 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (2 ml) a 0 °C. Se añadió 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (2 mg, 0,016 mmol, 0,1 equiv.) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se diluyó con terc-butil éter y se filtró. La torta de filtro se purificó por HPLC prep. para proporcionar **n.º B181** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 20 mg, 0,00023 mmol, 13 %. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ 7,82 (d, 2 H), 7,67 (d, 2H), 7,58 (d, 2 H), 7,42 (m, 6 H), 5,04 (a, 3 H), 4,63 (s, 4 H), 4,52 (m, 5 H), 4,36 (m, 2 H), 3,20 (m, 4 H), 2,32 (m, 2 H), 2,10 (m, 1H), 1,90 (m, 1 H), 1,77 (m, 1

H), 1,65 (m, 4 H), 1,44 (m, 7 H), 1,35 (m, 3 H), 0,98 (m, 6 H).

*Etapa 2.* Síntesis de N-(6-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)hexanoil)-L-valil-N-[4-(((aminometil)carbamoil)oxi)metil]fenil]-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida, sal trifluoroacetato (n.º **B182**). Al n.º **B181** (20 mg, 0,00023 mmol) se le añadió ácido trifluoroacético (1,3 ml) previamente enfriado a 0 °C y la reacción se dejó en agitación durante 10 min. La reacción se concentró, se tomó en acetonitrilo y se reconcentró tres veces para dar n.º **B182** en forma de una goma que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional: Rendimiento: 25 mg, 0,028 mmol, 100 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 787,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,75 minutos.

*Etapa 3.* Síntesis de N-(6-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)hexanoil)-L-valil-N-{4-(((3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)amino)metil]carbamoil)oxi)metil]fenil]-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B183**). A una solución de n.º **NP2** (14,5 mg, 0,028 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetil-formamida (0,4 ml) a la que se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (19,7 µl, 0,11 mmol, 4 equiv.) y hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (12 mg, 0,031 mmol, 1,1 equiv.). Se añadió n.º **B182** (25,2 mg, 0,028 mmol, 1 equiv.) en DMF (0,6 ml) y la reacción se dejó en agitación durante 45 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B183** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 9,8 mg, 0,0076 mmol, 27 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1288,94 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,94 minutos.

*Etapa 4.* Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-{4-(((3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)amino)metil]carbamoil)oxi)metil]fenil]-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida, sal acetato (n.º **B184**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 75 % a partir de 11,9 mg (0,009 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B183** y 15,3 mg (0,18 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1066,8 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,73 minutos.

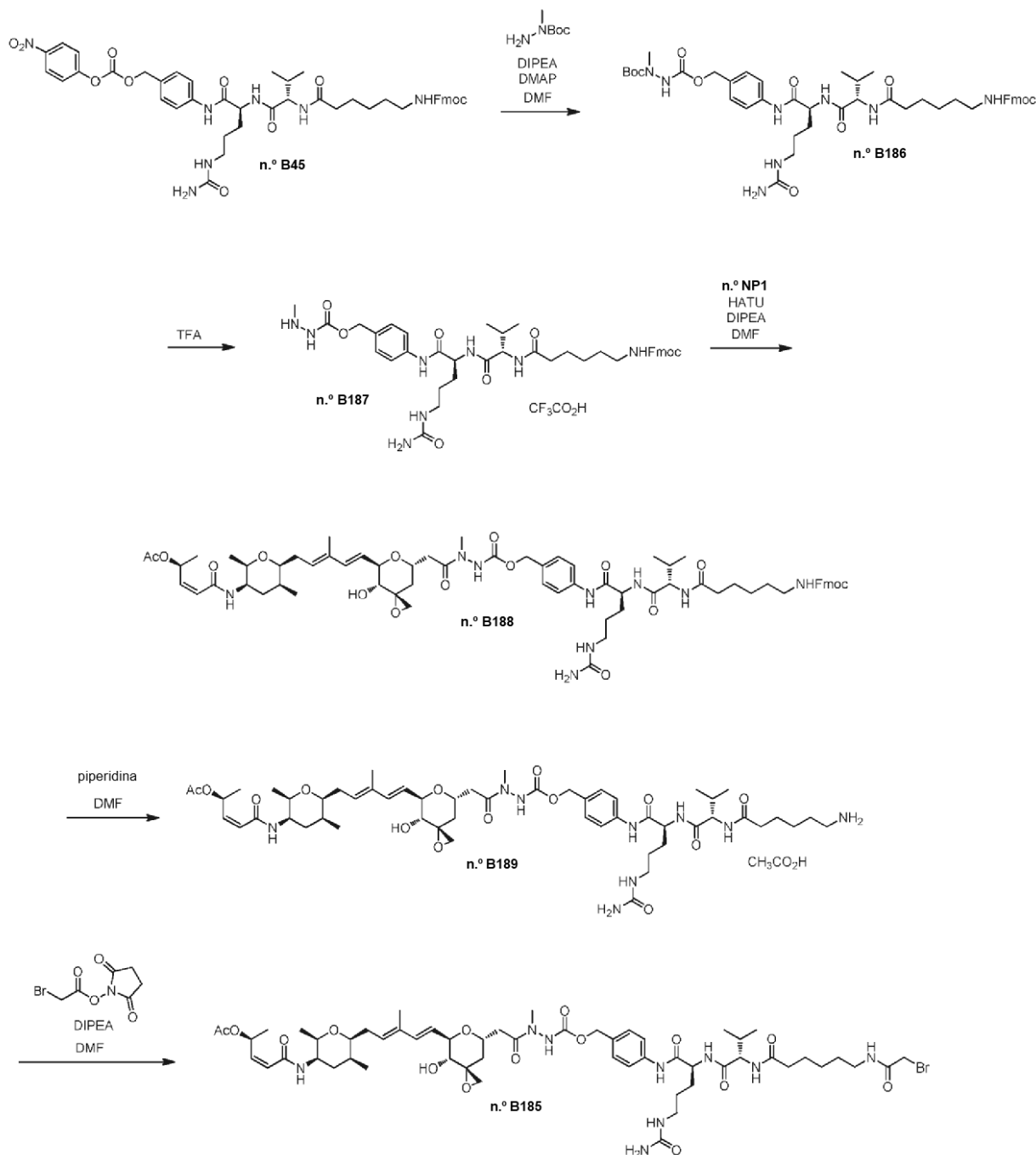
*Etapa 5.* Síntesis de N-(6-((bromoacetil)amino)hexanoil)-L-valil-N-{4-(((3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)amino)metil]carbamoil)oxi)metil]fenil]-N<sup>5</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B180**).

El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 61 % a partir de 7,6 mg (0,01 mmol) del n.º **B184** y 2,6 mg (0,011 mmol, 1,5 equiv.) de 1-((bromoacetil)oxi)pirrolidin-2,5-diona y 3,7 mg (0,028 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B150**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1188,8 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,81 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,98 (s, 1 H), 8,45-8,37 (m, 1 H), 8,27-8,20 (m, 1 H), 8,14-8,05 (m, 1 H), 7,85-7,73 (m, 2 H), 7,61-7,55 (m, 2 H), 7,30-7,24 (m, 2 H), 6,40-6,32 (m, 1 H), 6,25 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H), 6,10 (dd, *J* = 11,5 y 1,2 Hz, 1 H), 6,01-5,93 (m, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,7 y 7,6 Hz, 1 H), 5,60 (dd, *J* = 15,6 y 5,4 Hz, 1 H), 5,56-5,49 (m, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,02 (s, 2 H), 4,56-4,50 (m, 1 H), 4,42-4,23 (m, 3 H), 4,22-4,16 (m, 1 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,60 (m, 3 H), 3,52-3,45 (m, 2 H), 3,09-2,89 (m, 5 H), 2,66-2,53 (m, 3 H), 2,34-2,09 (m, 6 H), 2,01-1,92 (m, 4 H), 1,85-1,55 (m, 10 H), 1,54-1,31 (m, 7 H), 1,27-1,20 (m, 4 H), 1,06 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,94 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H), 0,86 (d, *J* = 6,9 Hz, 3 H), 0,83 (d, *J* = 6,9 Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 66

Preparación de *N*-{6-[[*N*-(4-[[2-[[*N*-(3*R*,5*S*,7*R*,8*R*)-7-[(1*E*,3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-[[2*Z*,4*S*]-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]-2-metilhidrazinil)carbonil]oxi]metil]fenil]-*N*<sup>5</sup>-carbamoil-*L*-ornitinamida (n.º B185).

5



10

**Etapa 1.** Síntesis de *N*-{6-[[*N*-(9-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]hexanoil}-*L*-valil-*N*-{4-[[[2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-metilhidrazinil]carbonil]oxi]metil]fenil]-*N*<sup>5</sup>-carbamoil-*L*-ornitinamida (n.º **B186**). A una solución de 1-metilhidrazinacarboxilato de *tert*-butilo (34,8 mg, 0,24 mmol, 1,3 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (1 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (64,4 µl, 0,37 mmol, 2 equiv.) y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (11,1 mg, 0,091 mmol, 0,5 equiv.) seguido de **n.º B45** (161 mg, 0,18 mmol, 1 equiv.) y la reacción se dejó en agitación. Después de 4 h, se añadió más 1-metilhidrazinacarboxilato de *tert*-butilo (14 mg, 0,096 mmol, 0,5 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,2 ml) y la reacción se agitó durante 1,5 h. La reacción se diluyó con DMSO (1 ml) y se purificó por cromatografía líquida a presión media de fase inversa eluída con ácido acético al 0,02 % en agua

(v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (10 % a 100 %) para dar **n.º B186** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 26,1 mg, 0,029 mmol, 16 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  887,6  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,92 minutos.

5 *Etapa 2.* Síntesis de N-(6-[[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]hexanoil)-L-valil-*N*<sup>6</sup>-carbamoil-N-[4-(((2-metilhidrazinil)carbonil]oxi)metil)fenil]-L-ornitinamida, sal trifluoroacetato (n.º **B187**). Al **n.º B186** (16,5 mg, 0,019 mmol, 1 equiv.) se le añadió ácido trifluoroacético (1 ml) a ta y la reacción se dejó en agitación durante 20 min. La reacción se concentró, se tomó en acetonitrilo y se reconcentró tres veces para dar **n.º B187** en forma de una goma que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional: CLEM (Protocolo D):  $m/z$  809,6  $[M+Na]^+$ , tiempo de retención = 0,80 minutos.

10 *Etapa 3.* Síntesis de N-(6-[[[9H-fluoren-9-ilmetoxi]carbonil]amino]hexanoil)-L-valil-N-[4-(((2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-  
 15 {{{(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-  
 metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]-2-metilhidrazinil)carbonil]oxi)metil)fenil]-*N*<sup>6</sup>-  
 carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B188**). A una solución de **n.º NP1** (8,7 mg, 0,016 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-  
 20 dimetilformamida (0,2 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (11,3 µl, 0,064 mmol, 4 equiv.) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (7,4 mg, 0,019 mmol, 1,2 equiv.) seguido de una solución de **n.º B187** (17,1 mg, 0,019 mmol, 1,2 equiv.) y *N,N*-diisopropiletilamina (5,7 µl, 0,032 mmol, 2 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,4 ml) y la reacción se dejó en agitación durante 30 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B188** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 8,3 mg, 0,0064 mmol, 40 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1304,9  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,93 minutos.

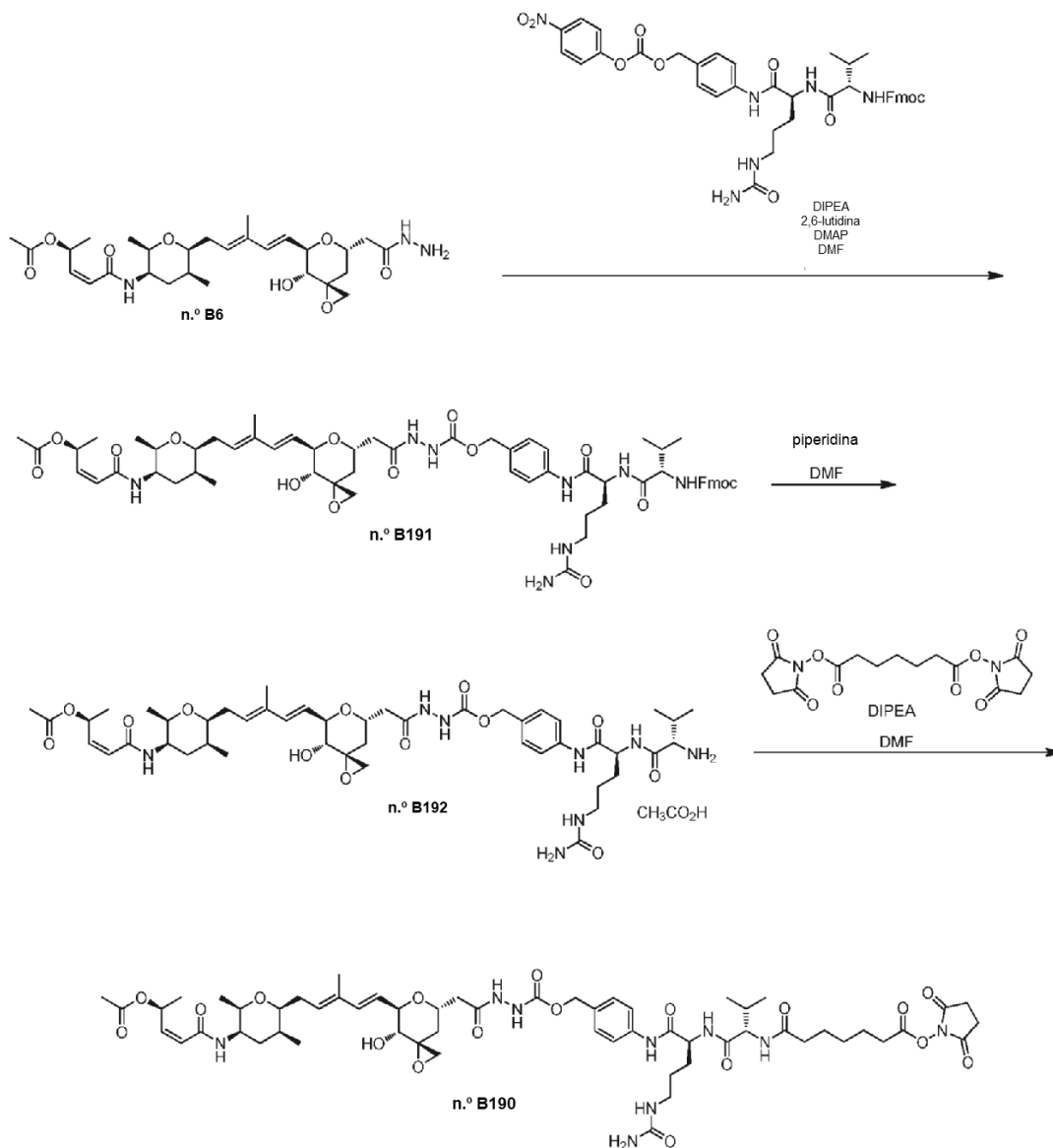
25 *Etapa 4.* Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-[4-(((2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[[[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]-2-metilhidrazinil)carbonil]oxi)metil)fenil]-*N*<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida, sal acetato (n.º **B189**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 80 % a partir de 8,3 mg (0,006 mmol, 1,0 equiv.) de **n.º B188** y 10,2 mg (0,12 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B47**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1082,81  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,66 minutos.

30 *Etapa 5.* Síntesis de N-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil)-L-valil-N-[4-(((2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[[[(1E,3E)-5-  
 35 [[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-  
 dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]-2-metilhidrazinil)carbonil]oxi)metil)fenil]-*N*<sup>6</sup>-carbamoil-L-  
 ornitinamida (n.º **B185**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 63 % a partir de 5,5 mg (0,005  
 40 mmol, 1 equiv.) de **n.º B189**, 1,7 mg (0,011 mmol, 1,5 equiv.) de 1-[(bromoacetil)oxi]pirrolidin-2,5-diona y 2,6 mg  
 (0,02 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del  
 compuesto **n.º B150**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1204,86  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,77 minutos. RMN <sup>1</sup>H  
 (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,01 (s, 1 H), 9,94-9,81 (m, 1 H), 8,28-8,20 (m, 1 H), 8,13-8,05 (m, 1 H), 7,86-7,76 (m, 2  
 H), 7,66-7,55 (m, 2 H), 7,37-7,25 (m, 2 H), 6,59-6,46 (m, 1 H), 6,40-6,29 (m, 2 H), 6,10 (dd, *J* = 11,6 y 1,5 Hz, 1  
 H), 6,01-5,95 (m, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,6 y 7,6 Hz, 1 H), 5,65-5,57 (m, 1 H), 5,56-5,50 (m, 1 H), 5,41 (m, 2 H),  
 5,12-4,96 (m, 4 H), 4,42-4,33 (m, 1 H), 4,32-4,24 (m, 1 H), 4,23-4,16 (m, 2 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,60 (m, 2 H),  
 3,52-3,47 (m, 1 H), 3,07-2,89 (m, 5 H), 2,77-2,73 (m, 1 H), 2,60-2,54 (m, 1 H), 2,34-2,08 (m, 4 H), 2,01-1,92 (m, 4  
 H), 1,86-1,31 (m, 14 H), 1,27-1,20 (m, 4 H), 1,06 (d, *J* = 6,1 Hz, 3 H), 0,94 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H), 0,86 (d, *J* = 6,9 Hz,  
 3 H), 0,83 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 67

Preparación de N-{7-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-7-oxoheptanoil}-L-valil-N-[4-(((2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinil)carbonil]oxi)metil)fenil]-N<sup>5</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B190).

5



10 **Etapa 1.** Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-[4-(((2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-  
 15 [(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-  
 dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinil)carbonil]oxi)metil)fenil]-N<sup>5</sup>-carbamoil-L-ornitinamida  
 (n.º **B191**). A una solución de **n.º B6** (19,4 mg, 0,035 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) a ta se le  
 añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (24,7 µl, 0,14 mmol, 4 equiv.), 2,6-lutidina (16,3 µl, 0,14 mmol, 4 equiv.), 4-  
*N,N*-dimetilaminopiridina (4,3 mg, 0,035 mmol, 1 equiv.) y N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N<sup>5</sup>-carbamoil-  
 N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil)fenil]-L-ornitinamida (40,6 mg, 0,053 mmol, 1,5 equiv.) y la reacción se  
 20 agitó durante 2,5 h. Se añadió más N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N<sup>5</sup>-carbamoil-N-[4-(((4-  
 nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil)fenil]-L-ornitinamida (13,5 mg, 0,018 mmol, 0,5 equiv.) y la reacción se agitó durante  
 otra 1 h. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B191** en forma  
 de un sólido de color blanco. Rendimiento: 9,4 mg, 0,0081 mmol, 23 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1177,8 [M+H]<sup>+</sup>,  
 tiempo de retención = 0,90 minutos.

20 **Etapa 2.** Síntesis de L-valil-N-[4-(((2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-  
 enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-

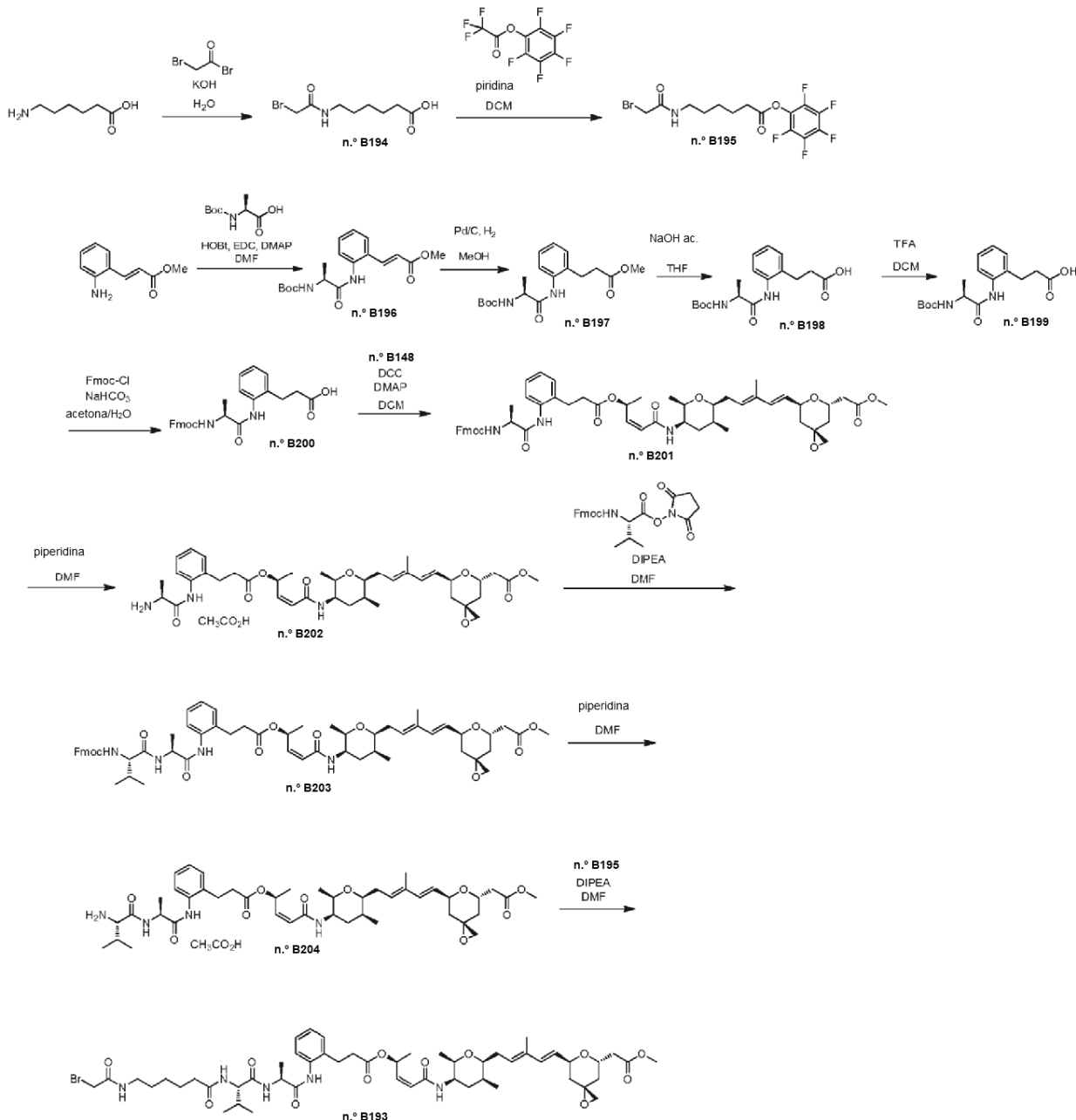
il]acetil]hidrazinil]carbonil]oxi]metil]fenil]-*N*<sup>6</sup>-carbamoil-*L*-ornitina, sal acetato (n.º **B192**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 56 % a partir de 9,4 mg (0,008 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B191** y 13,6 mg (0,16 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 955,8 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,65 minutos.

5 *Etapa 3*. Síntesis de *N*-{7-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-7-oxoheptanoil}-*L*-valil-*N*-[4-({(2-[(3*R*,5*S*,7*R*,8*R*)-7-((1*E*,  
3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-[(2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-  
10 1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinil]carbonil]oxi]metil]fenil]-*N*<sup>6</sup>-carbamoil-*L*-  
ornitina (n.º **B190**). A una solución de n.º **B192** (4,5 mg, 0,004 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetil-formamida  
(0,3 ml) a la que se le añadió *N,N*-diisopropil-etilamina (3,5 µl, 0,02 mmol, 5 equiv.) seguido de 1,1'-[(1,7-  
15 dioxoheptano-1,7-diil)bis(oxi)]dipirrolidin-2,5-diona (preparada como en *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2802, 8,9  
mg, 0,025 mmol) 6,2 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 35 min. La reacción se purificó por  
cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B190** en forma de un sólido de color blanco.  
Rendimiento: 1,65 mg, 0,0014 mmol, 34 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1194,80 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,75  
minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 9,06 (s, 1 H), 8,17 (s, 1 H), 7,71-7,63 (m, 2 H), 7,35-7,25 (m, 2 H), 7,19  
(d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 6,73 (d, *J* = 6,6 Hz, 1 H), 6,47 (d, *J* = 8,8 Hz, 1 H), 6,41-6,30 (m, 2 H), 5,96-5,85 (m, 2 H),  
5,67-5,50 (m, 2 H), 5,33-5,24 (m, 1 H), 5,08-4,99 (m, 2 H), 4,74 (s, 1 H), 4,57-4,48 (m, 1 H), 4,39-4,25 (m, 2 H),  
4,15-4,08 (m, 1 H), 3,82-3,75 (m, 1 H), 3,67-3,59 (m, 1 H), 3,55-3,47 (m, 1 H), 3,35-3,20 (m, 2 H), 3,12-2,99 (m, 2  
H), 2,82-2,73 (m, 5 H), 2,66-2,52 (m, 6 H), 2,46-2,38 (m, 2 H), 2,36-2,20 (m, 4 H), 1,98 (s, 3 H), 1,77-1,57 (m, 11  
H), 1,53-1,36 (m, 6 H), 1,30 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,06 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,00-0,91 (m, 9 H).

20

## Ejemplo A n.º 68

Preparación de N-[6-[(bromoacetil)amino]hexanoil]-L-valil-N-[2-(3-[[[(2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetil-tetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-il]oxi]-3-oxopropil)fenil]-L-alaninamida (n.º B193).



5

10

**Etapa 1.** Síntesis de ácido 6-[(bromoacetil)amino]hexanoico (n.º B194). Se añadió ácido 6-aminohexanoico (14,2 g, 0,11 mol, 1 equiv.) a KOH (6,2 g, 0,11 mol, 1 equiv.) en agua (30 ml) a 0 °C. Se añadió gota a gota bromuro de bromoacetilo (26,1 g, 0,13 mol, 1,2 equiv.) mientras se añadía gota a gota una solución de carbonato potásico (2,8 N) para ajustar el pH > 7,8. Después de la adición, la solución se agitó a 0 °C durante una hora. La mezcla de reacción se acidificó mediante HCl 0,5 M para ajustar el pH a 1 y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluido con diclorometano:metanol 50:1 para proporcionar n.º B194 (10,2 g, 38 %) en forma de un sólido de color blanco.

15

**Etapa 2.** Síntesis de 6-[(bromoacetil)amino]hexanoato de pentafluorofenilo (n.º B195). A una solución de n.º B194 (8 g, 31,7 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (400 ml) se le añadió trifluoroacetato de pentafluorofenilo (13,3 g, 45,7 mmol, 1,45 equiv.) y piridina (10 g, 127 mmol, 4 equiv.) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C



durante 10 minutos. La mezcla de reacción se lavó con HCl 0,5 M y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida eluida con acetato de etilo (49,2 % en PE) para proporcionar n.º **B195** (9,5 g, 71,7 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 6,53 (a, 1 H), 3,89 (s, 2 H), 3,35 (m, 2 H), 2,70 (m, 2 H), 1,83 (m, 2 H), 1,64 (m, 2 H), 1,48 (m, 2 H).

5 *Etapa 3.* Síntesis de (2E)-3-(2-([N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-alanil]amino)fenil)prop-2-enoato de metilo (n.º **B196**). Una mezcla de (2E)-3-(2-aminofenil)prop-2-enoato de metilo (14 g, 79,1 mmol, 1 equiv.), N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-alanina (22,4 g, 119 mmol, 1,5 equiv.), 1-hidroxibenzotriazol (16,1 g, 119 mmol, 1,5 equiv.), clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (22,8 g, 119 mmol, 1,5 equiv.) y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (1,93 g, 15,8 mmol, 0,2 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (600 ml) se agitó a 50 °C durante 3 d. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (1500 ml) y agua (500 ml). La capa orgánica se separó y se lavó con agua (300 ml x 2), se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluido con éter de petróleo:acetato de etilo de 20:1 a 5:1 para proporcionar n.º **B196** en bruto (21 g, 76,4 %) en forma de un aceite de color amarillo que se usó sin purificación adicional.

15 *Etapa 4.* Síntesis de 3-(2-([N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-alanil]amino)fenil)propanoato de metilo (n.º **B197**). A una solución de n.º **B196** en bruto (21 g, 60,3 mmol, 1 equiv.) en metanol (1 l) se le añadió Pd/C (4 g) a 20 °C, y la mezcla de reacción se agitó a ta en hidrógeno (241,32 kPa) durante 12 h. La mezcla de reacción se filtró y se concentró a sequedad para proporcionar n.º **B197** en bruto (19 g, 90,5 %) en forma de un aceite de color amarillo que se usó sin purificación adicional.

20 *Etapa 5.* Síntesis de ácido 3-(2-([N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-alanil]amino)fenil)propanoico (n.º **B198**). A una solución de n.º **B197** en bruto (19 g, 54,2 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (150 ml) se le añadió hidróxido sódico (110 ml, 2 M) a 0 °C y la reacción se agitó a 50 °C durante 3 h. El tetrahidrofurano se retiró al vacío, y la solución resultante se ajustó a pH = 3-4 mediante HCl 1 M y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 3). El extracto se lavó con salmuera (20 ml x 1), se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad para proporcionar n.º **B198** en bruto (16 g, 88,9 %) en forma de un aceite de color pardo.

25 *Etapa 3.* Síntesis de sal trifluoroacetato del ácido 3-[2-(L-alanilamino)fenil]propanoico (n.º **B199**). A una solución de n.º **B198** (16 g, 47,5 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (150 ml) se le añadió TFA (100 ml) a 0 °C y la reacción se agitó a 25 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el residuo se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

30 *Etapa 4.* Síntesis de ácido 3-[2-([N-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)-L-alanil]amino)fenil]propanoico (n.º **B200**). A una solución de n.º **B199** (5 g, 21,1 mmol, 1 equiv.) en acetona (50 ml) y agua (100 ml) se le añadió bicarbonato sódico (5,30 g, 63,4 mmol, 3 equiv.) a 0 °C. Después, se añadió gota a gota 9H-fluoren-9-ilmetilcarbonocloridato (4,94 g, 19,1 mmol, 0,9 equiv.) en acetona (50 ml) a 0 °C. La reacción se ajustó a pH = 3-4 con HCl 1 M y la fase acuosa se extrajo acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se concentraron al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluida con metanol:diclorometano (1,5 %~2 %) para proporcionar un producto en bruto, que se purificó adicionalmente por HPLC prep. para proporcionar un sólido de color blanco, que se purificó adicionalmente mediante separación SFC para proporcionar n.º **B200** (560 mg, 5,8 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 Hz, DMSO-<sub>d6</sub>): 9,65 (s, 1H), 7,92 (d, 2H), 7,76 (m, 3H), 7,43-7,14 (m, 8H), 4,32 (m, 4H), 2,80 (m, 2H), 2,50 (m, 2H), 1,37 (m, 3H).

40 *Etapa 5.* Síntesis de 3-[2-([N-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)-L-alanil]amino)fenil]propanoato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B201**). A una solución de n.º **B148** (21,2 mg, 0,043 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (0,5 ml) a ta se le añadió 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (3,5 mg, 0,029 mmol, 0,67 equiv.), una solución de n.º **B200** (39,4 mg, 0,086 mmol, 2 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,3 ml) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (23,2 mg, 0,107 mmol, 2,5 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 2,5 h. Se añadió más DCC (23 mg, 0,107 mmol, 2,5 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante un adicional de 2 h. La reacción se diluyó con DMSO (0,7 ml) y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B201** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 8,6 mg, 0,009 mmol, 21 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 954,57 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,10 minutos.

50 *Etapa 6.* Síntesis de 3-[2-(L-alanilamino)fenil]propanoato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º **B202**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 70 % a partir de 15,1 mg (0,016 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B201** y 27,2 mg (0,32 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 955,8 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,65 minutos.

*Etapa 7.* Síntesis de N-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)-L-valil-N-[2-(3-((2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-il)oxi]-3-oxopropil)fenil]-L-alaninamida (n.º **B203**). A una solución de n.º **B202** (9 mg, 0,01 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,4 ml) a ta se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (8,5 µl,

0,048 mmol, 4 equiv.) seguido de 2,5-dioxopirrolidin-1-il-*N*-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-*L*-valinato (10,5 mg, 0,024 mmol, 2 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 20 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B203** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 7,4 mg, 0,007 mmol, 60 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1031,9 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 1,11 minutos.

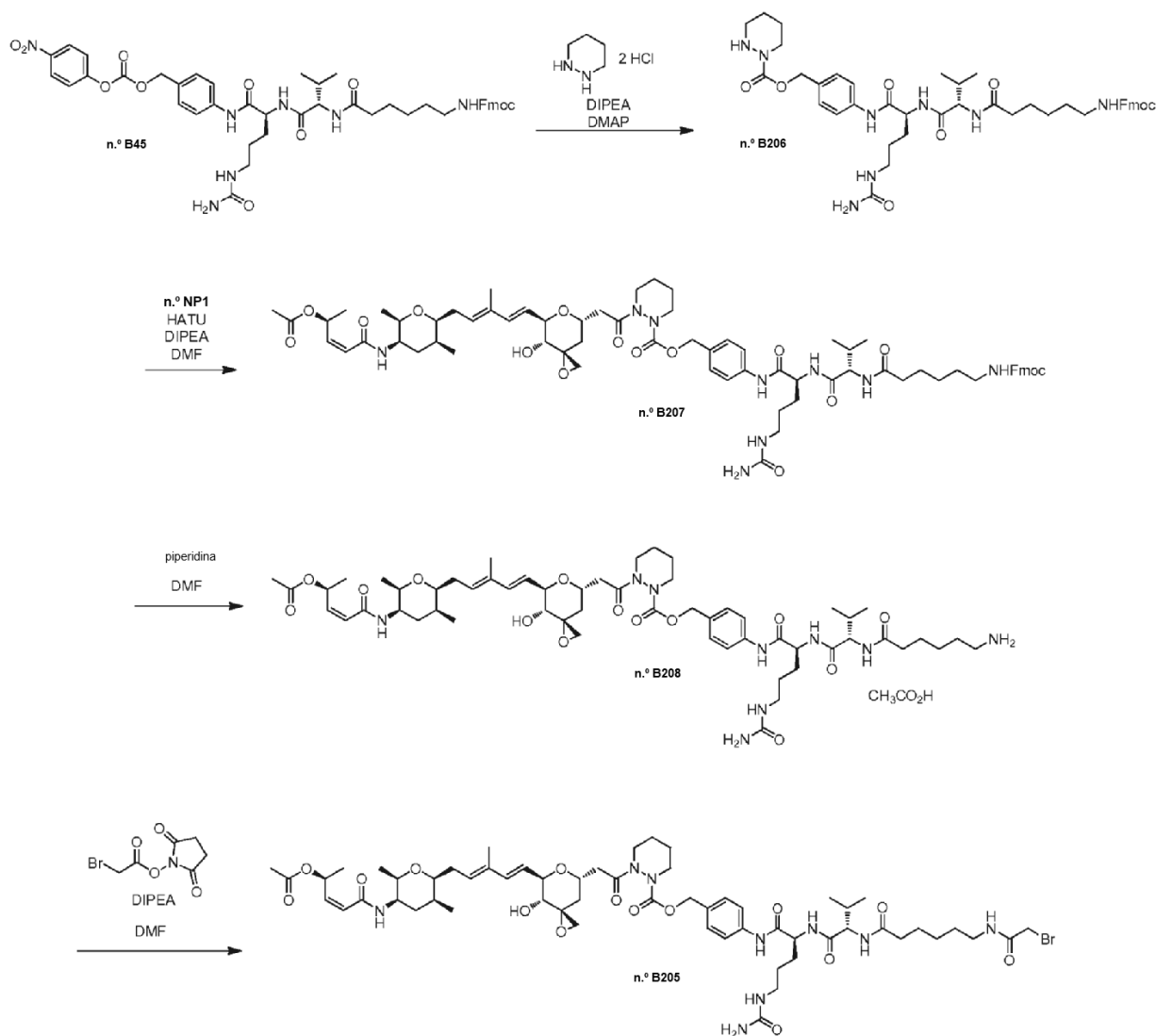
5 *Etapa 8.* Síntesis de *L*-valil-*N*-[2-(3-[[[(2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-il]oxi]-3-oxopropil)fenil]-*L*-alaninamida, sal acetato (**n.º B204**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 87 % a partir de 7,4 mg (0,007 mmol, 1,0 equiv.) del **n.º B203** y 11,9 mg (0,14 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 809,9 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,81 minutos.

10 *Etapa 9.* Síntesis de *N*-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil}-*L*-valil-*N*-[2-(3-[[[(2S,3S)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,4S,7S)-7-(2-metoxi-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-il]oxi]-3-oxopropil)fenil]-*L*-alaninamida (**n.º B193**). A una solución de **n.º B204** (5,3 mg, 0,006 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,4 ml) a *ta* se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (6,3 µl, 0,036 mmol, 6 equiv.) seguido de **n.º B195** (2,9 mg, 0,007 mmol, 1,2 equiv.), y la reacción se dejó en agitación durante 10 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B193** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 4,1 mg, 0,004 mmol, 65 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1044,9 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,95 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,42 (s, 1 H), 8,26-8,19 (m, 1 H), 8,14 (d, *J* = 6,9 Hz, 1 H), 7,85-7,77 (m, 2 H), 7,30-7,10 (m, 4 H), 6,42-6,33 (m, 1 H), 6,25 (d, *J* = 15,9 Hz, 1 H), 6,10 (dd, *J* = 11,7 y 1,2 Hz, 1 H), 5,83 (dd, *J* = 11,5 y 7,3 Hz, 1 H), 5,58 (dd, *J* = 15,9 y 5,1 Hz, 1 H), 5,56-5,50 (m, 1 H), 4,55-4,42 (m, 2 H), 4,34-4,26 (m, 1 H), 4,20 (dd, *J* = 8,8 y 6,9 Hz, 1 H), 3,81 (s, 2 H), 3,68-3,62 (m, 2 H), 3,60 (s, 3 H), 3,54-3,46 (m, 1 H), 3,07-2,99 (m, 2 H), 2,87-2,56 (m, 7 H), 2,35-2,08 (m, 5 H), 2,02-1,92 (m, 2 H), 1,88-1,61 (m, 8 H), 1,53-1,35 (m, 5 H), 1,33 (d, *J* = 7,1 Hz, 3 H), 1,28-1,19 (m, 4 H), 1,06 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H), 0,85 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 0,82 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H).

25

## Ejemplo A n.º 69

Preparación de *N*-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil}-*L*-valil-*N*-{4-[[2-[[[(3*R*,5*S*,7*R*,8*R*)-7-[(1*E*,3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-[(2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]tetrahidropiridazin-1(2*H*)-il]carbonil]oxi)metil]fenil}-*N*<sup>5</sup>-carbamoil-*L*-ornitinamida (n.º B205).



**Etapa 1.** Síntesis de *N*-{6-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}hexanoil}-*L*-valil-*N*<sup>5</sup>-carbamoil-*N*-{4-[[tetrahidropiridazin-1(2*H*)-ilcarbonil]oxi]metil]fenil}-*L*-ornitinamida (n.º B206). A una solución de clorhidrato de hexahidropiridazina (11,1 mg, 0,07 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,4 ml) a la que se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (49,3 µl, 0,28 mmol, 4 equiv.) y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (4,3 mg, 0,035 mmol, 0,5 equiv.) seguido de n.º B45 (61,6 mg, 0,07 mmol, 1 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 30 min. La reacción se purificó por cromatografía líquida a presión media de fase inversa eluyendo con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (5 % al 95 %) para dar n.º B206 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 19,8 mg, 0,024 mmol, 34 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 827,63 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,84 minutos.

**Etapa 2.** Síntesis de *N*-{6-[(9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}hexanoil}-*L*-valil-*N*-{4-[[2-[[[(3*R*,5*S*,7*R*,8*R*)-7-[(1*E*,3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-5-[(2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]tetrahidropiridazin-1(2*H*)-il]carbonil]oxi)metil]fenil}-*N*<sup>5</sup>-carbamoil-*L*-ornitinamida (n.º B207). A una solución de n.º NP1 (15,5 mg, 0,029 mmol, 2 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,15 ml) a la que se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (19,7 µl, 0,11 mmol, 8 equiv.) y hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (11,3 mg, 0,029 mmol, 2,1 equiv.) seguido de una solución de n.º B206 (11,4 mg, 0,014 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,6 ml) y la reacción se dejó en agitación durante 22 h. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa

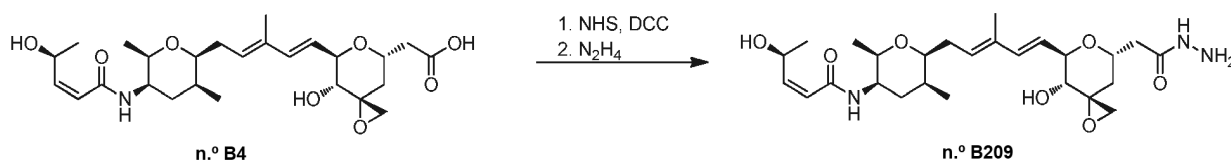
(Procedimiento A) para dar **n.º B207** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 4,2 mg, 0,003 mmol, 22 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1345,2  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,97 minutos.

**Etapa 3.** Síntesis de *N*-(6-aminohexanoil)-*L*-valil-*N*-{4-[(2-[(3*R*,5*S*,7*R*,8*R*)-7-[(1*E*,3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-[(2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino}-3,6-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil}tetrahidropiridazin-1(2*H*)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-*N*<sup>5</sup>-carbamoil-*L*-ornitina, sal acetato (**n.º B208**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 67 % a partir de 9,8 mg (0,007 mmol, 1,0 equiv.) del **n.º B207** y 11,9 mg (0,14 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B47**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1122,95  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,74 minutos.

**Etapa 4.** Síntesis de *N*-{6-[(bromoacetil)amino]hexanoil}-*L*-valil-*N*-{4-[(2-[(3*R*,5*S*,7*R*,8*R*)-7-[(1*E*,3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-[(2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino}-3,6-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil}tetrahidropiridazin-1(2*H*)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-*N*<sup>5</sup>-carbamoil-*L*-ornitina (**n.º B205**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 52 % a partir de 5,6 mg (0,005 mmol, 1 equiv.) del **n.º B208**, 1,7 mg (0,007 mmol, 1,5 equiv.) de 1-[(bromoacetil)oxi]pirrolidin-2,5-diona y 2,6 mg (0,02 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B150**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1244,9  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,83 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,04 (s a, 1 H), 8,24 (s a, 1 H), 8,13 (s a, 1 H), 7,87-7,77 (m, 2 H), 7,65-7,55 (m, 2 H), 7,36-7,24 (m, 2 H), 6,88-6,77 (m, 1 H), 6,41-6,26 (m, 2 H), 6,10 (d, *J* = 11,5 Hz, 1 H), 6,04-5,95 (m, 1 H), 5,86 (dd, *J* = 11,5 y 7,3 Hz, 1 H), 5,66-5,48 (m, 2 H), 5,42 (s a, 1 H), 5,18-5,06 (m, 1 H), 5,05-4,94 (m, 1 H), 4,39-4,15 (m, 5 H), 4,11-3,98 (m, 1 H), 3,81 (s, 2 H), 3,68-3,60 (m, 2 H), 3,53-3,45 (m, 1 H), 3,28-3,20 (m, 2 H), 3,08-2,89 (m, 4 H), 2,85-2,72 (m, 2 H), 2,34-2,08 (m, 5 H), 2,02-1,92 (m, 4 H), 1,86-1,31 (m, 18 H), 1,28-1,20 (m, 4 H), 1,09-1,03 (m, 3 H), 0,94 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H), 0,85 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 0,82 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H).

#### Ejemplo A n.º 70

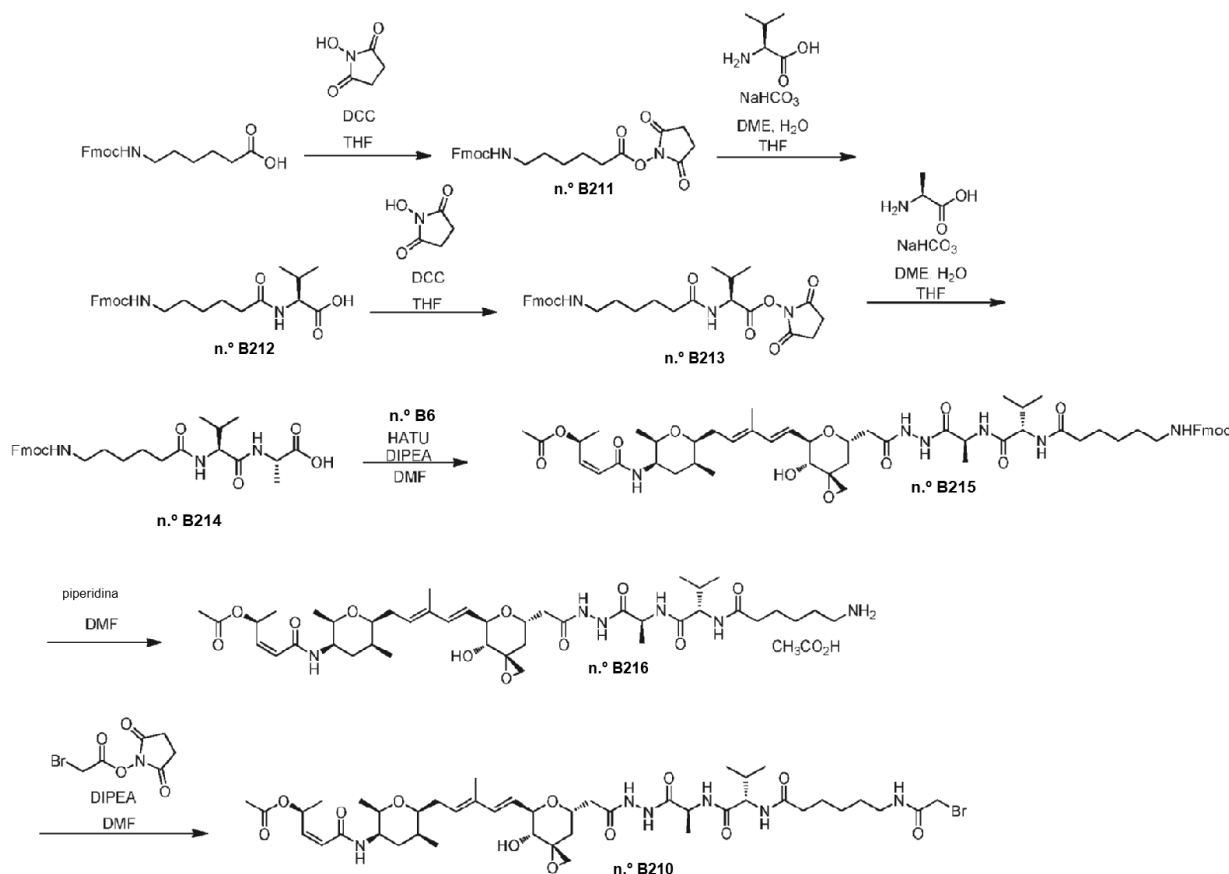
**Preparación de (2*Z*,4*S*)-*N*-[(2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-[(2*E*,4*E*)-5-[(3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-3-il]-4-hidroxipent-2-enamida (**n.º B209**).**



**Etapa 1.** Síntesis de (2*Z*,4*S*)-*N*-[(2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-[(2*E*,4*E*)-5-[(3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-3-il]-4-hidroxipent-2-enamida (**n.º B209**). A una solución de **n.º B4** (13,1 mg, 0,027 mmol, 1 equiv.) en tetrahydrofurano (0,4 ml) a 0 °C se le añadió DCC (11,7 mg, 0,054 mmol, 2 equiv.) y la reacción se agitó durante 10 min. Se añadió *N*-hidroxisuccinimida (6,3 mg, 0,054 mmol, 2 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 5 h a ta. La reacción se diluyó con acetonitrilo, se filtró y se concentró. El residuo se recogió en diclorometano (0,5 ml) y se añadió una solución de hidrazina (1 M en THF, 270 µl, 0,27 mmol, 10 equiv.). La reacción se agitó durante 10 min, se diluyó con dimetilsulfóxido, se concentró para retirar el diclorometano y se filtró. El residuo en bruto se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para proporcionar **n.º B209** en forma de un sólido. Rendimiento: 8,1 mg, 59 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  508,6  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,59 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,00 (s, 1 H), 7,76 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H), 6,29 (d, *J* = 15,8 Hz, 1 H), 5,98 (d, *J* = 11,3 Hz, 1 H), 5,86 (dd, *J* = 11,3 y 7,4 Hz, 1 H), 5,60 (dd, *J* = 15,8 y 5,5 Hz, 1 H), 5,56-5,48 (m, 1 H), 5,23-5,07 (m, 2 H), 5,06-4,98 (m, 1 H), 4,32-4,09 (m, 3 H), 3,70-3,59 (m, 2 H), 3,55-3,45 (m, 1 H), 3,25-3,19 (m, 1 H), 2,74 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,58 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,44 (dd, *J* = 14,4 y 8,6 Hz, 1 H), 2,36-2,14 (m, 3 H), 1,93-1,58 (m, 8 H), 1,50-1,42 (m, 1 H), 1,11 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,96 (d, *J* = 7,0 Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 71

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-((6S,9S)-19-bromo-6-metil-2,5,8,11,18-pentaoxo-9-(propan-2-il)-3,4,7,10,17-pentaazonadec-1-il)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metil-penta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B210).



5

**Etapa 1.** Síntesis de 9H-fluoren-9-ilmetil-{6-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-6-oxohexil}carbamato (n.º B211). A una solución de ácido 6-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)hexanoico (6 g, 16,9 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (250 ml) se le añadieron *N*-hidroxisuccinimida (2,13 g, 18,5 mmol, 1,1 equiv.) y DCC (3,5 g, 18,59 mmol, 1,1 equiv.) a 0 °C y la reacción se agitó a 20 °C durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a -20 °C, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se agitó en MTBE (300 ml) durante 20 min y se filtró de nuevo. La torta de filtro se secó al vacío para proporcionar n.º B211 (5,6 g, 73 %) en forma de un sólido de color blanco.

10

**Etapa 2.** Síntesis de *N*-(6-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)hexanoil)-*L*-valina (n.º B212). A una solución de *L*-valina (1,5 g, 12,8 mmol, 1 equiv.) en agua (60 ml) y tetrahidrofurano (30 ml) a 0 °C se le añadió NaHCO<sub>3</sub> (1,37 g, 16,3 mmol, 1,3 equiv.). Después se añadió gota a gota una solución de n.º B211 (5,67 g, 12,6 mmol, 0,98 equiv.) en dimetoxietano (80 ml) y tetrahidrofurano (80 ml) a 0-10 °C y la reacción se agitó a 20 °C durante 18 h. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 4 mediante la adición de ácido cítrico y la mezcla de reacción se concentró. Se añadieron acetato de etilo (450 ml) y metanol (50 ml) y la mezcla se agitó durante 10 min. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluída con diclorometano:metanol de 100:1 a 8:1 para proporcionar n.º B212 (2,6 g, 45 %) en forma de un sólido de color blanco.

15

20

**Etapa 3.** Síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il-*N*-(6-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)hexanoil)-*L*-valinato (n.º B213). A una solución de n.º B212 (2 g, 4,42 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (60 ml) a 0 °C se le añadieron *N*-hidroxisuccinimida (0,53 g, 4,65 mmol, 1,05 equiv.) y DCC (0,88 g, 4,65 mmol, 1,05 equiv.) y la reacción se agitó a 20 °C durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a -20 °C, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se agitó en MTBE (300 ml) durante 20 min y se filtró. La torta de filtro se secó al vacío para proporcionar n.º B213 (1,9 g, 79 %) en forma de un sólido de color blanco.

25

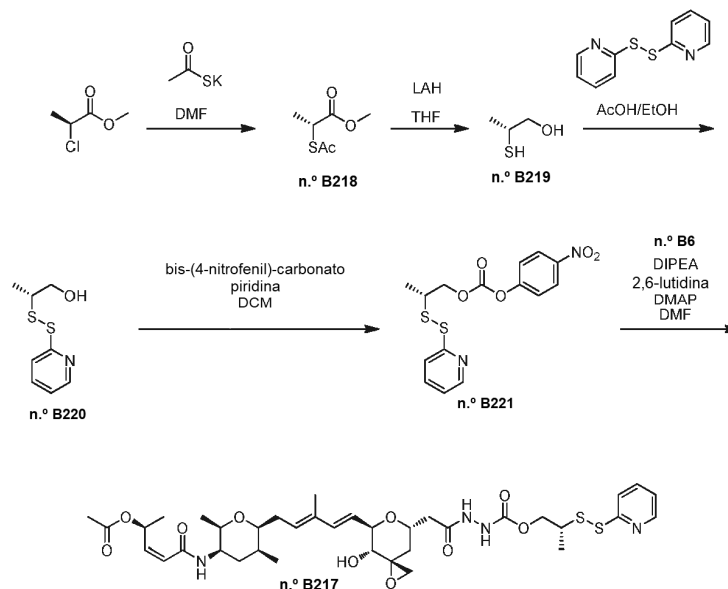
**Etapa 4.** Síntesis de *N*-(6-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)hexanoil)-*L*-valil-*L*-alanina (n.º B214). A una solución de *L*-alanina (0,32 g, 3,6 mmol, 1,04 equiv.) en agua (15 ml) y tetrahidrofurano (10 ml) a 0 °C se le añadió NaHCO<sub>3</sub> (0,44 g, 5,19 mmol, 1,5 equiv.). Después, se añadió gota a gota una solución de n.º B213 (1,9 g,

30

- 3,46 mmol, 1 equiv.) en dimetoxietano (30 ml) a 0-10 °C y la reacción se agitó a 20 °C durante 18 horas. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 4 mediante la adición de ácido cítrico y la mezcla de reacción se concentró. Se añadieron diclorometano (400 ml) y metanol (50 ml) y la mezcla se agitó durante 10 min. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluída con diclorometano:metanol de 100:1 a 8:1 para proporcionar un residuo que se recristalizó con metanol/tetrahidrofurano (3:1) tres veces para dar **n.º B214** (490 mg, 27 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO): 12,48 (a, 1 H), 8,21 (a, 1 H), 7,91 (d, 2 H), 7,77 (d, 1 H), 7,68 (m, 2 H), 7,41 (m, 2 H), 7,33 (m, 2 H), 7,31 (m, 1 H), 4,29 (m, 2 H), 4,18 (m, 3 H), 2,94 (m, 2 H), 2,16 (m, 2 H), 1,93 (m, 1 H), 1,47 (m, 2 H), 1,37 (m, 2 H), 1,25 (m, 3 H), 1,21 (m, 2 H), 0,86 (m, 6 H).
- 5
- 10 *Etapa 5.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-((12S,15S)-1-(9H-fluoren-9-yl)-15-metil-3,10,13,16,19-pentaoxo-12-(propan-2-yl)-2-oxa-4,11,14,17,18-pentaazaicosan-20-yl)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-yl)-3-metilpenta-2,4-dien-1-yl)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-yl)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B215**). A una solución de **n.º B214** (11,5 mg, 0,022 mmol, 1,2 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,2 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (12,7 µl, 0,072 mmol, 4 equiv.) y hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (8,5 mg, 0,022 mmol, 1,2 equiv.) seguido de una solución de **n.º B6** (10 mg, 0,018 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml), y la reacción se dejó en agitación durante 35 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B215** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 14,6 mg, 0,014 mmol, 77 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1056,0 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,94 minutos.
- 15
- 20 *Etapa 6.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-(2-{2-[(2S)-2-((2S)-2-[(6-amino-hexanoil)amino]-3-metilbutanoil)amino]propanoil}hidrazinil)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-yl)-3-metilpenta-2,4-dien-1-yl)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-yl)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo, sal acetato (n.º **B216**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 85 % a partir de 20,8 mg (0,02 mmol, 1,0 equiv.) del **n.º B215** y 34,1 mg (0,4 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 833,9 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,65 minutos.
- 25
- 30 *Etapa 7.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-((6S,9S)-19-bromo-6-metil-2,5,8,11,18-pentaoxo-9-(propan-2-yl)-3,4,7,10,17-pentaazonadec-1-yl)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-yl)-3-metilpenta-2,4-dien-1-yl)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-yl)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B210**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 57 % a partir de 15,2 mg (0,017 mmol, 1 equiv.) del **n.º B216**, 6,1 mg (0,026 mmol, 1,5 equiv.) de 1-[(bromoacetil)oxil]pirrolidin-2,5-diona y 8,9 mg (0,068 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B150**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 975,68 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,76 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,93-9,80 (m, 2 H), 8,26-8,19 (m, 1 H), 8,14 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,98 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 7,85-7,73 (m, 2 H), 6,56 (s a, 1 H), 6,41-6,26 (m, 2 H), 6,11 (d, *J* = 11,5 Hz, 1 H), 5,86 (dd, *J* = 11,7 y 7,6 Hz, 1H), 5,61 (dd, *J* = 15,9 y 5,6 Hz, 1 H), 5,56-5,48 (m, 1 H), 5,10-5,03 (m, 1 H), 4,39-4,13 (m, 4 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,60 (m, 2 H), 3,54-3,45 (m, 1 H), 3,25-3,19 (m, 1 H), 3,09-3,00 (m, 2 H), 2,74 (d, *J* = 5,0 Hz, 1 H), 2,58 (d, *J* = 5,0, 1 H), 2,35-2,25 (m, 2 H), 2,24-2,05 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 1,96-1,75 (m, 4 H), 1,73-1,60 (m, 4 H), 1,55-1,33 (m, 5 H), 1,29-1,18 (m, 7 H), 1,07 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H), 0,87-0,77 (m, 6 H).
- 35

## Ejemplo A n.º 72

Preparación de (2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propil-2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinacarboxilato (n.º B217).



5

**Etapla 1.** Síntesis de (2R)-2-(acetilsulfanil)propanoato de metilo (n.º B218). A una solución de tioacetato potásico (3,9 g, 34,4 mmol, 1,2 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (60 ml) se le añadió una solución de S-metil-2-cloropropanoato (3,5 g, 28,7 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (10 ml) a ta y la mezcla se agitó a ta durante una noche. La mezcla se vertió en agua (150 ml) y se extrajo con éter de petróleo (100 ml) tres veces. Los extractos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron al vacío para proporcionar n.º B218 (4,4 g, 94,8 %) en forma de un aceite de color amarillo brillante.

10

**Etapla 2.** Síntesis de (2R)-2-sulfanilpropan-1-ol (n.º B219). A una suspensión de LAH (3,4 g, 89,5 mmol, 5 equiv.) en tetrahidrofurano (116 ml) se le añadió una solución de n.º B218 (2,9 g, 17,9 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano (29 ml) a 0 °C, y la mezcla se agitó a ta durante 1 h. La reacción se interrumpió cuidadosamente con HCl 2 N (50 ml). La mezcla se extrajo con diclorometano (100 ml) cinco veces y los extractos se secaron sobre sulfato sódico. La solución se concentró al vacío a aproximadamente 150 ml y la solución se usó en la siguiente etapa directamente sin purificación adicional.

15

**Etapla 3.** Síntesis de (2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-ol (n.º B220). A una solución de aldritol-2 (5,9 g, 26,8 mmol, 1,5 equiv.) y ácido acético (1,07 g, 17,9 mmol, 1 equiv.) en etanol (120 ml) a 0 °C se le añadió una solución de n.º B219 en THF (150 ml, -17,9 mmol, 1 equiv.) y la mezcla se agitó a ta durante una noche. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluido con éter de petróleo:acetato de etilo (10:1 a 4:1) para proporcionar un aceite de color amarillo que se volvió a purificar por SFC para proporcionar n.º B220 (860 mg, 24 %) en forma de un aceite de color amarillo claro. RMN <sup>1</sup>H (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): 8,50 (m, 1 H), 7,59 (m, 1 H), 7,40 (d, 1 H), 7,16 (m, 1 H), 5,98 (m, 1 H), 3,70 (m, 1 H), 3,41 (m, 1 H), 3,12 (m, 1 H), 1,31 (d, 3 H).

20

25

**Etapla 4.** Síntesis de carbonato de 4-nitrofenil-(2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propilo (n.º B221). A una solución de n.º B220 (111 mg, 0,554 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (0,9 ml) a ta se le añadió piridina (99,4 µl, 1,22 mmol, 2,2 equiv.) seguido de una solución de 4-nitrofenilcloroformiato (140 mg, 0,665 mmol, 1,2 equiv.) en diclorometano (0,9 ml) gota a gota, y la reacción se agitó durante una noche. La reacción se diluyó con diclorometano y agua, se extrajo dos veces y se lavó con salmuera, y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con diclorometano para dar n.º B221 en forma de una goma. Rendimiento: 45 mg, 0,123 mmol, 22 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 367,2 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,99 minutos.

30

**Etapla 5.** Síntesis de (2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propil-2-[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]hidrazinacarboxilato (n.º B217). A una solución de n.º B6 (9,8 mg, 0,018 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,1 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (12,7 µl, 0,072 mmol, 4 equiv.), 2,6-lutidina (8,4 µl, 0,072 mmol, 4 equiv.), 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (2,2 mg, 0,018 mmol, 1 equiv.) una solución de n.º B221 (10 mg, 0,027 mmol, 1,5 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,3 ml) y la reacción se dejó en agitación durante 5,5 h. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º

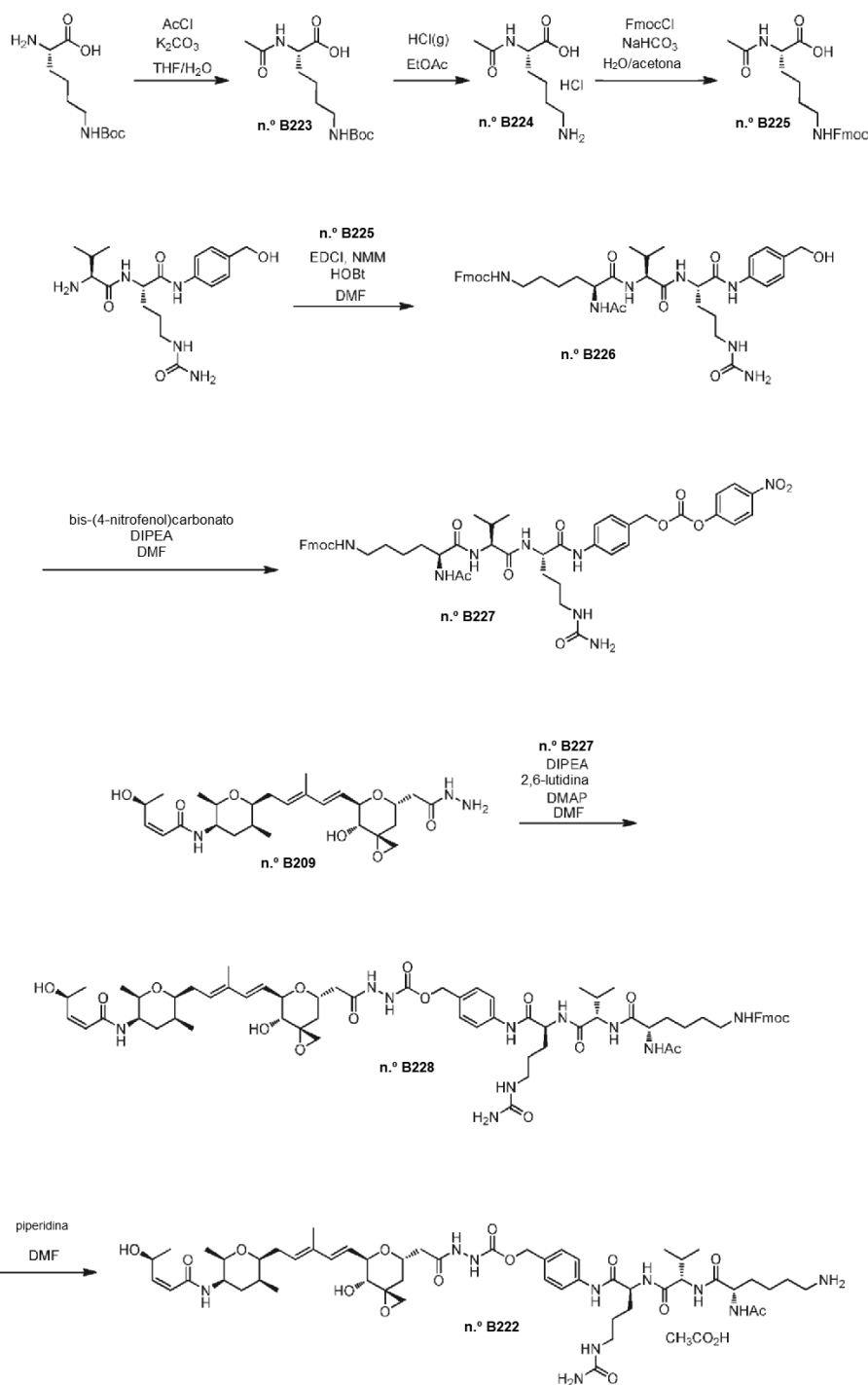
35

40

**B217** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 5,9 mg, 0,0076 mmol, 42 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  777,51  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,84 minutos. RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3CN$ )  $\delta$  8,45-8,38 (m, 1 H), 8,15 (s a, 1 H), 7,84-7,73 (m, 2 H), 7,35 (s a, 1 H), 7,16 (ddd,  $J = 7,3, 4,9, y 1,2$  Hz, 1 H), 6,48-6,28 (m, 3 H), 5,97-5,84 (m, 2 H), 5,63 (dd,  $J = 15,7$  y  $5,9$  Hz, 1 H), 5,59-5,52 (m, 1 H), 4,40-4,26 (m, 2 H), 4,20-4,04 (m, 2 H), 3,83-3,75 (m, 1 H), 3,69-3,61 (m, 1 H), 3,56-3,49 (m, 1 H), 3,32 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1 H), 3,24 (s a, 1 H), 2,79 (d,  $J = 4,9$  Hz, 1 H), 2,65-2,53 (m, 2 H), 2,47-2,38 (m, 1 H), 2,36-2,19 (m, 4 H), 1,97 (s, 3 H), 1,77-1,67 (m, 4 H), 1,66-1,58 (m, 1 H), 1,35-1,26 (m, 6 H), 1,07 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 0,98 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 73

Preparación de **N**<sup>2</sup>-acetil-*L*-lisil-*L*-valil-*N*<sup>6</sup>-carbamoil-*N*-[4-{{[2-{{[3*R*,5*S*,7*R*,8*R*]-8-hidroxi-7-{{1*E*,3*E*}-5-[[2*S*,3*S*,5*R*,6*R*]-5-{{(2*Z*,4*S*)-4-hidroxipent-2-enoil}amino}-3,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il]-3-metil-penta-1,3-dien-1-il}-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetil}hidrazinil)carbonil]oxi}metil)fenil]-*L*-ornitinamida, sal acetato (n.º **B222**).





*Etapa 1.* Síntesis de N<sup>2</sup>-acetil-N<sup>6</sup>-(*terc*-butoxicarbonil)-L-lisina (n.º **B223**). A una mezcla de N<sup>6</sup>-(*terc*-butoxicarbonil)-L-lisina (22,5 g, 91,5 mmol, 1 equiv.) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (63,1 g, 0,457 mol, 5 equiv.) en tetrahydrofurano/agua (200 ml/200 ml) a 0 °C se le añadió cloruro de acetilo (8,62 g, 0,109 mol, 1,2 equiv.) y la mezcla se agitó a ta durante 4 h. La mezcla se concentró al vacío para retirar el tetrahydrofurano y la capa acuosa se ajustó a pH = 1 con HCl 2 M y se extrajo con EtOAc (100 ml) tres veces. El extracto se lavó con salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato sódico y se concentró al vacío para proporcionar n.º **B223** (23,1 g, 87,7 %) en forma de un aceite de color amarillo.

*Etapa 2.* Síntesis de sal clorhidrato de N<sup>2</sup>-acetil-L-lisina (n.º **B224**). A una solución de n.º **B223** (23,1 g, 0,080 mmol, 1 equiv.) en acetato de etilo (400 ml) a 0 °C se le añadió HCl (g) en acetato de etilo (250 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a ta durante 4 h y se filtró. El sólido se lavó con acetato de etilo y se secó al vacío para proporcionar n.º **B224** (18,5 g, >100 %) en forma de un sólido de color blanco que se usó sin purificación adicional.

*Etapa 3.* Síntesis de N<sup>2</sup>-acetil-N<sup>6</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisina (n.º **B225**). A una mezcla de n.º **B224** (8 g, 35,6 mmol, 1 equiv.) y NaHCO<sub>3</sub> (5,99 g, 71,3 mmol, 2 equiv.) en acetona/agua (80 ml/80 ml) a 0 °C se le añadió una solución de Fmoc-Cl (9,41 g, 36,3 mmol, 1,02 equiv.) en acetona (80 ml) y la mezcla se agitó a ta durante 2 h. La mezcla se ajustó a pH = 3-4 con HCl 2 N y se extrajo con acetato de etilo (100 ml) tres veces. Los extractos se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato sódico y se concentró al vacío para dar el producto en bruto (7 g) en forma de un aceite de color amarillo. Al producto en bruto se le añadieron diclorometano y *terc*-butil metil éter (100 ml), y la suspensión se agitó durante 30 min y después se filtró. La torta de filtro se secó al vacío para proporcionar n.º **B225** (3,25 g, 22,2 %) en forma de un sólido de color blanco.

*Etapa 4.* Síntesis de N<sup>2</sup>-acetil-N<sup>6</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil-L-valil-N<sup>6</sup>-carbamoil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-ornitina (n.º **B226**). A una mezcla de n.º **B225** (1,04 g, 2,54 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetil-formamida (20 ml) a 0 °C se le añadieron *N*-metilmorfolina (769 mg, 7,61 mmol, 3 equiv.), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (632 mg, 3,30 mmol, 1,3 equiv.), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (445 mg, 3,30 mmol, 1,3 equiv.) y L-valil-N<sup>6</sup>-carbamoil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-ornitina (del documento WO04010957, 1,01 g, 2,66 mmol, 1,05 equiv.) en una atmósfera de nitrógeno, y la mezcla se agitó a ta durante 2 h. la mezcla se vertió en *terc*-butil metil éter (300 ml) y se filtró. El sólido se lavó con diclorometano (50 ml) y agua (50 ml) y se secó al vacío para proporcionar n.º **B226** (1,87 g, 95,6 %) en forma de un sólido de color blanco.

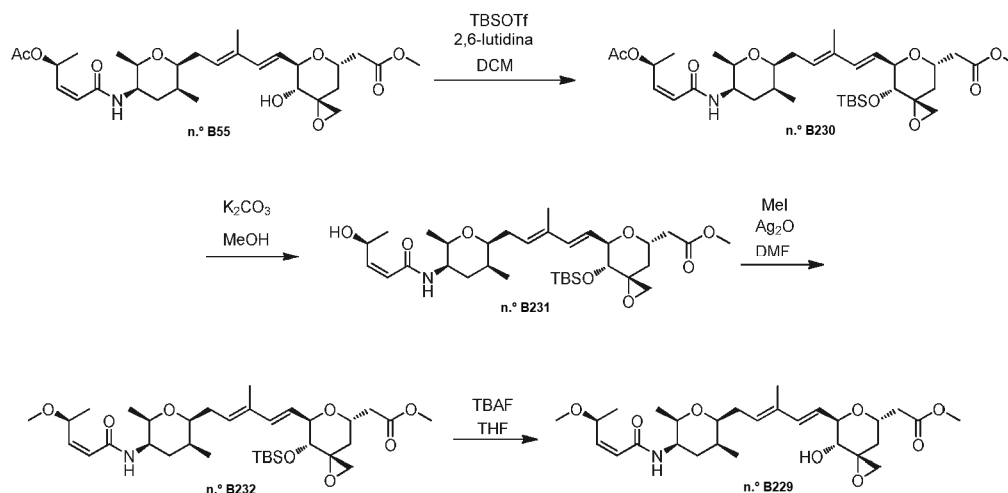
*Etapa 5.* Síntesis de N<sup>2</sup>-acetil-N<sup>6</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil-L-valil-N<sup>6</sup>-carbamoil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil]fenil]-L-ornitina (n.º **B227**). A una mezcla de n.º **B226** (1,87 g, 2,43 mmol, 1 equiv.) y bis-(4-nitrofenil)carbonato (2,21 g, 7,28 mmol, 3 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (30 ml) a 0 °C se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (313 mg, 2,43 mmol, 1 equiv.) en una atmósfera de nitrógeno y la mezcla se agitó a ta durante una noche. La mezcla se vertió en *terc*-butil metil éter (50 ml) y se filtró. El sólido (1,95 g) se purificó por HPLC prep. para dar n.º **B227** (580 mg, 25,7 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400Hz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10,1 (s, 1 H), 8,29 (d, 2 H), 8,00 (d, 1 H), 7,86 (d, 1 H), 7,65 (d, 2 H), 7,64 (d, 1 H), 7,61 (m, 4 H), 7,40 (m, 2 H), 7,38 (m, 4 H), 7,30 (m, 3 H), 6,01 (a, 1 H), 5,21 (s, 2 H), 4,35 (a, 1 H), 4,27-4,15 (m, 5 H), 2,96 (m, 4 H), 1,98 (m, 1 H), 1,82 (s, 3 H), 1,65 (a, 3 H), 1,43-1,24 (m, 7 H), 0,83 (m, 6 H).

*Etapa 6.* Síntesis de N<sup>2</sup>-acetil-N<sup>6</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil-L-valil-N<sup>6</sup>-carbamoil-N-[4-(((2-(((3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoi)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil]fenil]-L-ornitina (n.º **B228**). A una solución de n.º **B209** (8,1 mg, 0,016 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,4 ml) a ta se le añadieron 2,6-lutidina (7,5 µl, 0,064 mmol, 4 equiv.), *N,N*-diisopropiletilamina (11,3 µl, 0,064 mmol, 4 equiv.) y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (2 mg, 0,016 mmol, 1 equiv.) seguido de n.º **B227** (17,8 mg, 0,019 mmol, 1,2 equiv.) y la reacción se agitó durante 5 h. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B228** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 5,5 mg, 0,004 mmol, 26 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1306,1 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,81 minutos.

*Etapa 7.* Síntesis de N<sup>2</sup>-acetil-L-lisil-L-valil-N<sup>6</sup>-carbamoil-N-[4-(((2-(((3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoi)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil]fenil]-L-ornitina (n.º **B222**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 79 % a partir de 9,5 mg (0,007 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B228** y 11,9 mg (0,14 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1084,1 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,58 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,10 (s, 1 H), 8,22-8,12 (m, 1 H), 8,03 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,87-7,74 (m, 2 H), 7,64-7,53 (m, 2 H), 7,34-7,18 (m, 2 H), 6,31 (d, *J* = 15,9 Hz, 1 H), 6,09-6,01 (m, 1 H), 5,98 (d, *J* = 11,8 Hz, 1 H), 5,86 (dd, *J* = 11,8 y 7,1 Hz, 1 H), 5,66-5,56 (m, 1 H), 5,55-5,49 (m, 1 H), 5,44 (s a, 1 H), 5,23-4,91 (m, 3 H), 4,43-4,33 (m, 1 H), 4,30-4,21 (m, 2 H), 4,20-4,12 (m, 1 H), 3,69-3,59 (m, 1 H), 3,53-3,45 (m, 1 H), 3,07-2,88 (m, 2 H), 2,76-2,71 (m, 1 H), 2,61-2,56 (m, 1 H), 2,35-2,14 (m, 4 H), 2,04-1,53 (m, 18 H), 1,52-1,18 (m, 10 H), 1,11 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 1,06 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H), 0,85 (d, *J* = 6,9 Hz, 3 H), 0,82 (d, *J* = 6,9 Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 74

Preparación de [(3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-metoxipent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B229).



5

**Etapa 1.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B230). A una solución del n.º B55 (66,8 mg, 0,122 mmol, 1 equiv.) en diclorometano a 0 °C se le añadió 2,6-lutidina (71,1 µl, 0,61 mmol, 5 equiv.) seguido de terc-butil(cloro)dimetilsilano (86,3 µl, 0,366 mmol, 3 equiv.) y la reacción se dejó calentar a ta. Después de 1 h, la reacción se enfrió a 0 °C, se detuvo con  $NaHCO_3$  acuoso, se extrajo con diclorometano tres veces, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía líquida a presión media de fase inversa eluída con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (10 % al 100 %) para dar n.º B230 en forma de una goma. Rendimiento: 68 mg, 0,001 mmol, 84 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  686,58  $[M+Na]^+$ , tiempo de retención = 1,16 minutos.

10

15

**Etapa 2.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-8-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B231). A una solución de n.º B230 (68 mg, 0,1 mmol, 1 equiv.) en metanol (1 ml) a ta se le añadió  $K_2CO_3$  (35,2 mg, 0,255 mmol, 2,5 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 1 h. La reacción se filtró lavándose con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía líquida a presión media de fase inversa eluída con ácido acético al 0,02 % en agua (v/v) y ácido acético al 0,02 % en acetonitrilo (v/v) (10 % al 100 %) para dar n.º B231 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 33,2 mg, 0,053 mmol, 52 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  622,55  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,09 minutos.

20

25

**Etapa 3.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-8-[[terc-butil(dimetil)silil]oxi]-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-metoxipent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B232). A una solución de n.º B231 (24,7 mg, 0,04 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) a ta se le añadieron MeI (37,5 µl, 0,6 mmol, 15 equiv.) y  $Ag_2O$  (55,6 mg, 0,24 mmol, 6 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 23 h en la oscuridad. Se añadieron más MeI (38 µl, 0,6 mmol, 15 equiv.) y  $Ag_2O$  (55 mg, 0,24 mmol, 6 equiv.) y la reacción se agitó durante unas 25 h adicionales. La reacción se filtró sobre celite y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B232 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 9,4 mg, 0,015 mmol, 37 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  636,7  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 1,19 minutos.

30

35

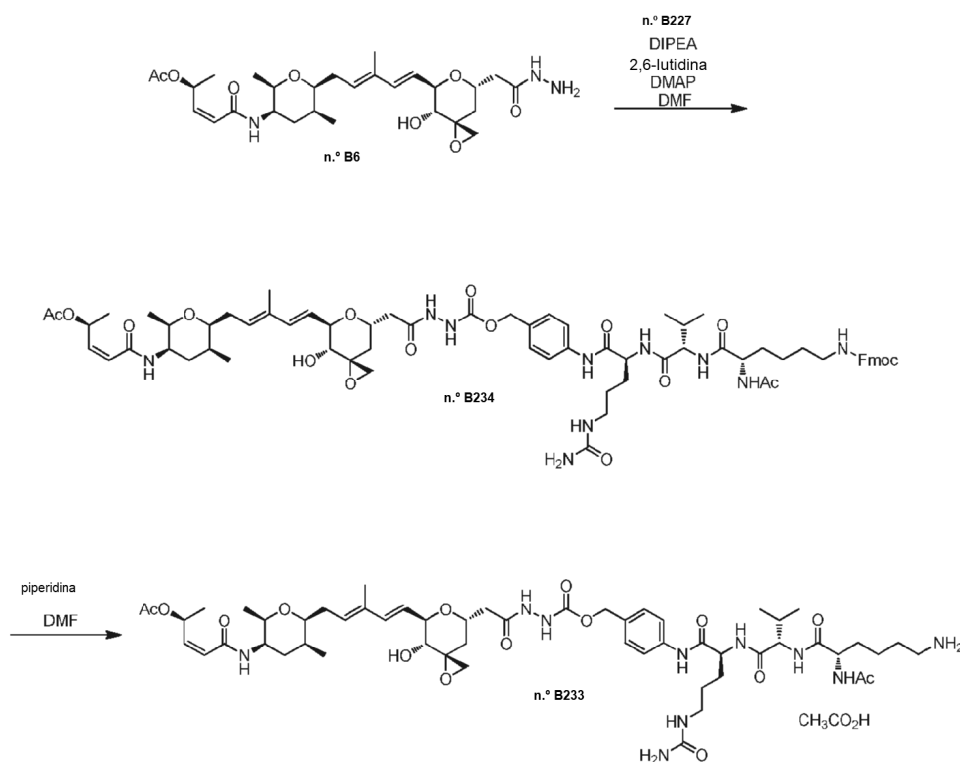
**Etapa 4.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-metoxipent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B229). A una solución de n.º B232 (12,6 mg, 0,02 mmol, 1 equiv.) en tetrahydrofurano (0,4 ml) a 0 °C se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en tetrahydrofurano, 20,7 µl, 0,02 mmol, 1 equiv.) y la reacción se dejó calentar a ta y se agitó durante 1 h. Se añadió más fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en tetrahydrofurano, 10,3 µl, 0,01 mmol, 0,5 equiv.) y la reacción se agitó durante 45 min. La reacción se concentró, se recogió en DMSO, y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B229 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 4,9 mg, 0,01 mmol, 47 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  522,50  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,79 minutos. RMN  $^1H$  (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  7,75 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1 H), 6,28 (d,  $J$  = 15,8 Hz, 1 H), 6,16 (d,  $J$  = 11,7 Hz, 1 H), 5,75 (dd,  $J$  = 11,7 y 8,1 Hz, 1 H), 5,58 (dd,  $J$  = 15,8 y 5,1 Hz, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 5,10-4,99 (m, 2 H), 4,31-4,21 (m, 2 H), 3,69-3,62 (m, 2 H), 3,60 (s, 3 H), 3,54-3,47 (m, 1 H), 3,28-3,22 (m, 1 H),

40

3,14 (s, 3 H), 2,76 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1 H), 2,69-2,55 (m, 3 H), 2,35-2,14 (m, 2 H), 1,90-1,75 (m, 3 H), 1,73-1,60 (m, 4 H), 1,57-1,48 (m, 1 H), 1,12 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 1,07 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A n.º 75

5 **Preparación de N<sup>2</sup>-acetil-L-lisil-L-valil-N-[4-(((2-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida, sal acetato (n.º B233).**

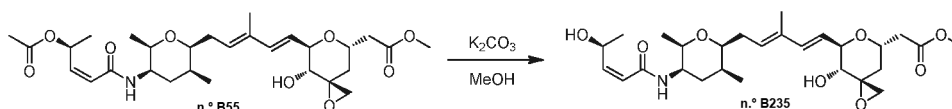


10 **Etapa 1.** Síntesis de N<sup>2</sup>-acetil-N<sup>6</sup>-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-lisil-L-valil-N-[4-(((2-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B234). A una solución de n.º B6 (20,5 mg, 0,037 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,8 ml) a ta se le añadieron 2,6-lutidina (17,3 µl, 0,148 mmol, 4 equiv.), *N,N*-diisopropiletilamina (26 µl, 0,148 mmol, 4 equiv.) y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (4,5 mg, 0,037 mmol, 1 equiv.) seguido de n.º B227 (45 mg, 0,048 mmol, 1,3 equiv.) y la reacción se agitó durante 4 h. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B234 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 18,5 mg, 0,014 mmol, 37 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1348,1 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,88 minutos.

20 **Etapa 2.** Síntesis de N<sup>2</sup>-acetil-L-lisil-L-valil-N-[4-(((2-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)acetil)hidrazinil)carbonil)oxi)metil)fenil]-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida, sal acetato (n.º B233). A una solución de n.º B234 (18,5 mg, 0,014 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,7 ml) a ta se le añadió piperidina (27,6 µl, 0,28 mmol, 20 equiv.) y la reacción se agitó durante 20 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar un sólido de color blanco que se purificó adicionalmente por cromatografía de fase inversa (Procedimiento C, columna Phenomenex Luna PFP(2)) para dar n.º B233 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 8 mg, 0,07 mmol, 50 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1125,91 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,63 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,11 (s, 1 H), 8,43 (s, 1 H), 8,19-8,11 (m, 1 H), 8,05 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1 H), 7,86-7,76 (m, 2 H), 7,64-7,53 (m, 2 H), 7,34-7,18 (m, 2 H), 6,42-6,27 (m, 2 H), 6,16-6,04 (m, 2 H), 5,86 (dd,  $J = 11,5$  y 7,3 Hz, 1 H), 5,66-5,38 (m, 3 H), 5,12-4,89 (m, 3 H), 4,43-4,33 (m, 1 H), 4,32-4,22 (m, 2 H), 4,20-4,14 (m, 1 H), 3,68-3,59 (m, 1 H), 3,54-3,45 (m, 1 H), 3,07-2,86 (m, 2 H), 2,79-2,72 (m, 1 H), 2,71-2,65 (m, 1 H), 2,61-2,55 (m, 1 H), 2,34-2,14 (m, 4 H), 2,04-1,94 (m, 4 H), 1,92-1,75 (m, 7 H), 1,74-1,54 (m, 8 H), 1,53-1,19 (m, 12 H), 1,06 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 0,94 (d,  $J = 7,1$  Hz, 3 H), 0,86 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3 H), 0,82 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 76

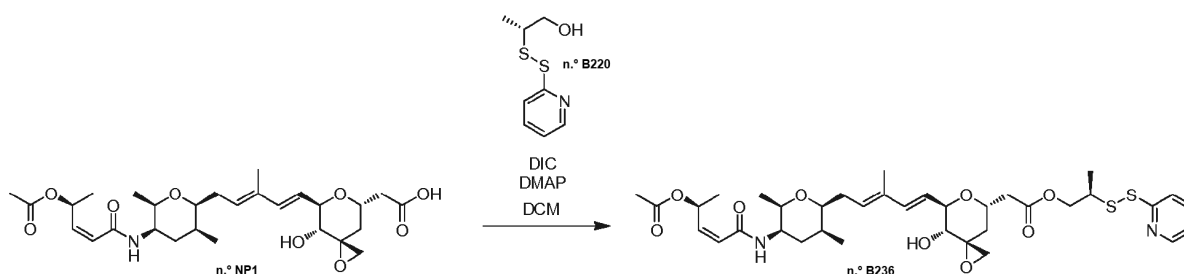
Preparación de [(3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B235).



5  
 Etapa 1. Síntesis de [(3R,5S,7R,5R)-8-hidroxi-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B235). A una solución de n.º B55 (60 mg, 0,11 mmol, 1 equiv.) en metanol (1 ml) a ta se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (37,7 mg, 0,273 mmol, 2,5 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 1 h. La reacción se filtró lavándose con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B235 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 31,2 mg, 0,06 mmol, 56 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 530,43 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,72 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,78 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 6,28 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 5,98 (d, *J* = 11,8 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,8 y 7,6 Hz, 1 H), 5,58 (dd, *J* = 16,0 y 5,2 Hz, 1 H), 5,55-5,49 (m, 1 H), 5,23-5,14 (m, 1 H), 5,10 (d, *J* = 4,7 Hz, 1 H), 5,02 (d, *J* = 6,1 Hz, 1 H), 4,31-4,22 (m, 2 H), 3,69-3,62 (m, 2 H), 3,60 (s, 3 H), 3,54-3,47 (m, 1 H), 3,28-3,22 (m, 1 H), 2,76 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,69-2,55 (m, 3 H), 2,35-2,15 (m, 2 H), 1,90-1,73 (m, 3 H), 1,73-1,61 (m, 4 H), 1,57-1,49 (m, 1 H), 1,11 (d, *J* = 6,5 Hz, 3 H), 1,06 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,96 (d, *J* = 7,5 Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 77

20 Preparación de (2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propil-[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato (n.º B236).



25 Etapa 1. Síntesis de (2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propil-[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato (n.º B236). A una solución de n.º NP1 (10,4 mg, 0,019 mmol, 1 equiv.) y n.º B220 (11,5 mg, 0,057 mmol, 3 equiv.) en diclorometano (0,3 ml) a ta se le añadieron 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (2,3 mg, 0,019 mmol, 1 equiv.) y *N,N*-di-*iso*-propilcarbodiimida (8,9 µl, 0,057 mmol, 3 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 75 min. La reacción se concentró, se recogió en DMSO, y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B236 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 7,6 mg, 0,011 mmol, 55 %.

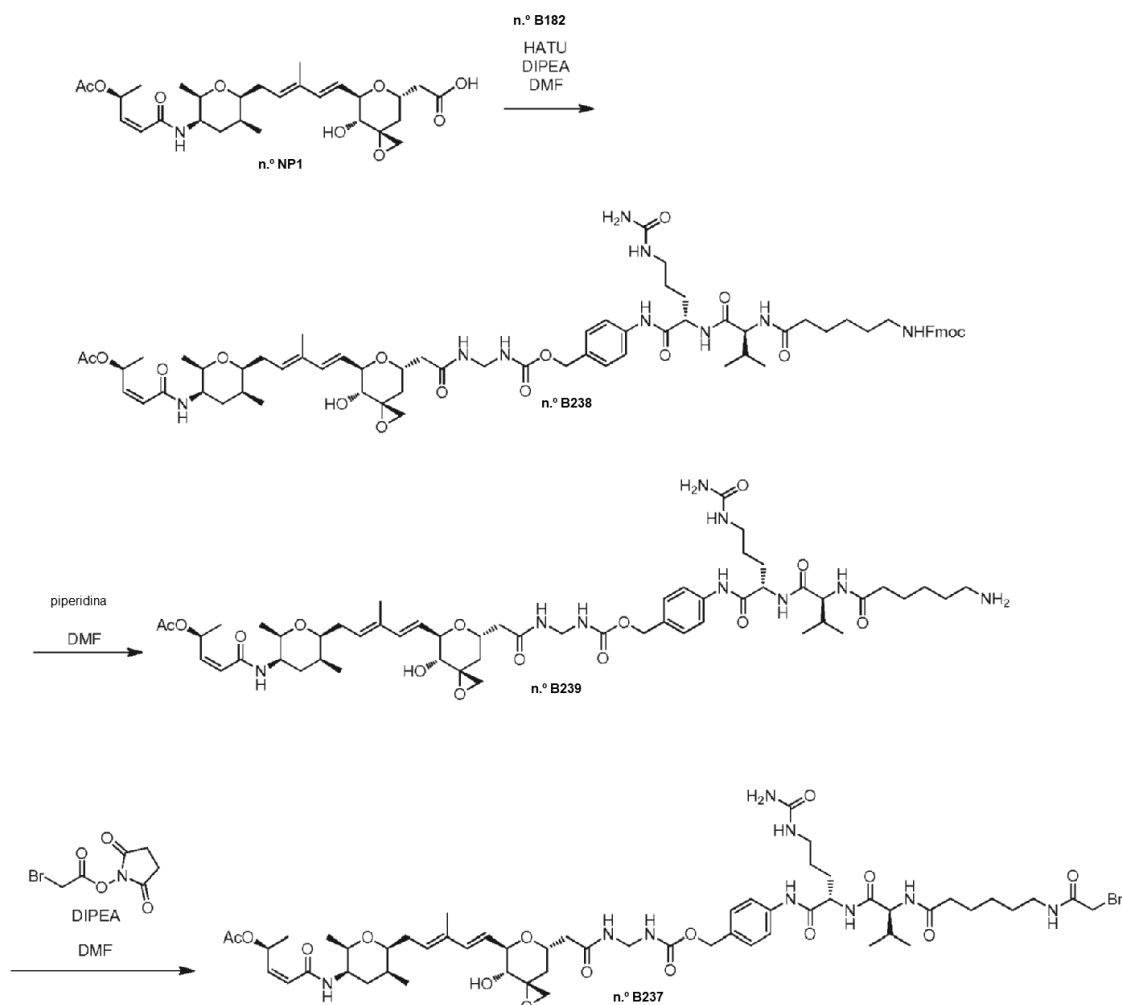
30 CLEM (Protocolo D): *m/z* 719,58 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,94 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,46-8,40 (m, 1 H), 7,86-7,74 (m, 3 H), 7,27-7,20 (m, 1 H), 6,41-6,32 (m, 1 H), 6,27 (d, *J* = 16,1 Hz, 1 H), 6,10 (dd, *J* = 11,7 y 1,5 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,7 y 7,6 Hz, 1 H), 5,61 (dd, *J* = 16,1 y 5,9 Hz, 1 H), 5,52-5,45 (m, 1 H), 5,02 (d, *J* = 6,1 Hz, 1 H), 4,31-4,20 (m, 2 H), 4,18-4,06 (m, 2 H), 3,68-3,58 (m, 2 H), 3,52-3,44 (m, 1 H), 3,28-3,23 (m, 1 H), 2,76 (d, *J* = 4,9 Hz, 1 H), 2,70 (dd, *J* = 15,2 y 9,3 Hz, 1 H), 2,62-2,53 (m, 2 H), 2,34-2,14 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,86-1,72 (m, 4 H), 1,70-1,59 (m, 4 H), 1,29-1,21 (m, 6 H), 1,06 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,94 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H).

35

## Ejemplo A n.º 78

Preparación de N-(6-[(bromoacetil)amino]hexanoil)-L-valil-N-{4-[[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metil-penta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)metil]carbamoil]oxi)metil]fenil}-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B237).

5



**Etapa 1.** Síntesis de N-(6-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino)hexanoil)-L-valil-N-{4-[[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metil-penta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)metil]carbamoil]oxi)metil]fenil}-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B238**). A una solución de **n.º NP1** (20,4 mg, 0,038 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,4 ml) a la que se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (40,2 µl, 0,228 mmol, 6 equiv.) y hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio (19 mg, 0,049 mmol, 1,3 equiv.) seguido de una solución de **n.º B182** (34,2 mg, 0,038 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,7 ml) y la reacción se dejó en agitación durante 45 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B238** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 16,1 mg, 0,012 mmol, 33 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1305,3 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,92 minutos.

**Etapa 2.** Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-{4-[[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metil-penta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)metil]carbamoil]oxi)metil]fenil}-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B239**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 88 % a partir de 16,1 mg (0,012 mmol, 1,0 equiv.) del **n.º B238** y 20,4 mg (0,24 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1083,1 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,67 minutos.

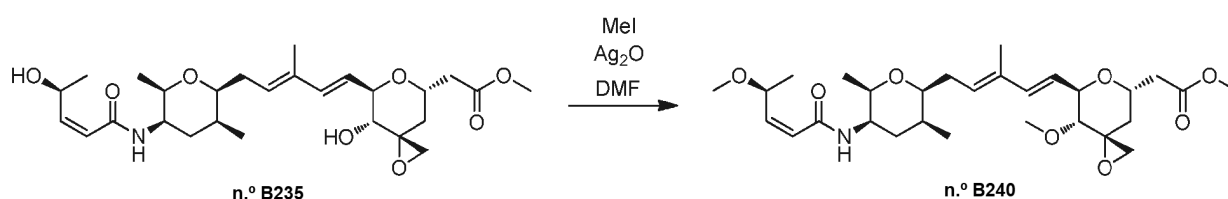
**Etapa 3.** Síntesis de N-(6-[(bromoacetil)amino]hexanoil)-L-valil-N-{4-[[[[(3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metil-penta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)metil]carbamoil]oxi)metil]fenil}-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B237**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 62 % a partir de 11,5 mg

25

(0,011 mmol) del n.º **B239**, 4 mg (0,017 mmol, 1,5 equiv.) de 1-[(bromoacetil)oxi]pirrolidin-2,5-diona y 5,7 mg (0,044 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B150**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1203,2  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,77 minutos. RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,99 (s, 1 H), 8,45-8,37 (m, 1 H), 8,28-8,20 (m, 1 H), 8,15-8,05 (m, 1 H), 7,86-7,73 (m, 2 H), 7,62-7,54 (m, 2 H), 7,31-7,22 (m, 2 H), 6,41-6,33 (m, 1 H), 6,30 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1 H), 6,11 (dd,  $J = 11,6$  y 1,5 Hz, 1 H), 6,02-5,94 (m, 1 H), 5,86 (dd,  $J = 11,6$  y 7,6 Hz, 1 H), 5,60 (dd,  $J = 15,9$  y 5,6 Hz, 1 H), 5,56-5,48 (m, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,04 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1 H), 4,95 (s, 2 H), 4,43-4,15 (m, 5 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,60 (m, 2 H), 3,53-3,45 (m, 1 H), 3,25-3,18 (m, 1 H), 3,09-2,88 (m, 4 H), 2,73 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1 H), 2,57 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1 H), 2,34-2,08 (m, 5 H), 2,03-1,91 (m, 4 H), 1,91-1,74 (m, 4 H), 1,73-1,30 (m, 12 H), 1,29-1,18 (m, 4 H), 1,06 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 0,94 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3 H), 0,86 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 0,83 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A n.º 79

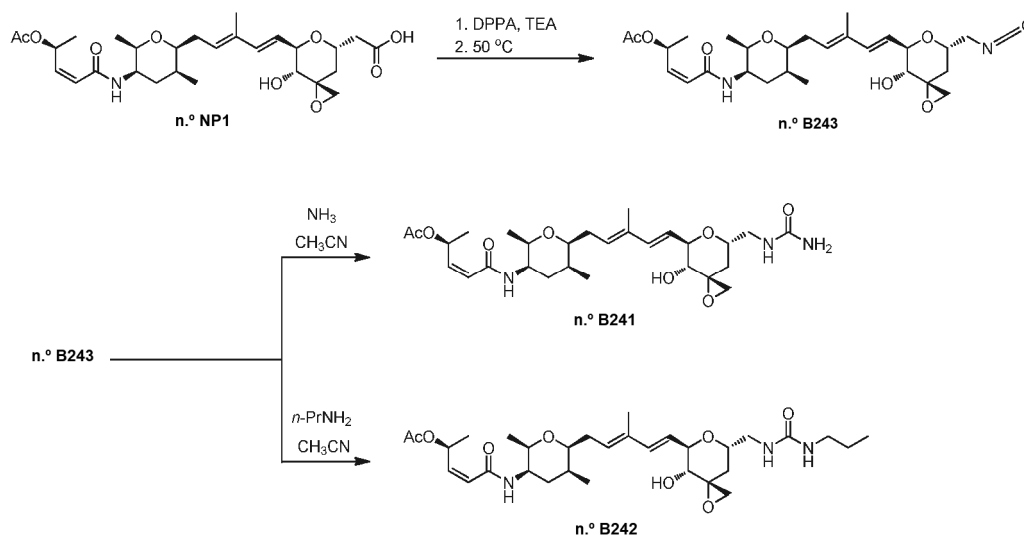
Preparación de [(3R,5S,7R,8R)-8-metoxi-7-[(1E,3E-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-metoxipent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º **B240**).



**Etapa 1.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-8-metoxi-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-metoxipent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º **B240**). A una solución de n.º **B235** (24,2 mg, 0,048 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) a la que se le añadieron 23 h en la oscuridad. Se añadieron más MeI (45  $\mu$ l, 0,7 mmol, 15 equiv.) y  $Ag_2O$  (66,7 mg, 0,29 mmol, 6 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 20 h en la oscuridad. Se añadieron más MeI (45  $\mu$ l, 0,7 mmol, 15 equiv.) y  $Ag_2O$  (67 mg, 0,29 mmol, 6 equiv.) y la reacción se agitó durante unas 24 h adicionales. La reacción se filtró sobre celite y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B240** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 12,2 mg, 0,023 mmol, 48 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  536,7  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,90 minutos. RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,75 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H), 6,36 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1 H), 6,16 (d,  $J = 11,7$  Hz, 1 H), 5,75 (dd,  $J = 11,7$  y 8,1 Hz, 1 H), 5,62-5,50 (m, 2 H), 5,10-4,99 (m, 1 H), 4,58-4,51 (m, 1 H), 4,28-4,18 (m, 1 H), 3,70-3,62 (m, 2 H), 3,60 (s, 3 H), 3,55-3,47 (m, 1 H), 3,32 (s, 3 H), 3,14 (s, 3 H), 2,96-2,91 (m, 1 H), 2,70-2,63 (m, 2 H), 2,58-2,52 (m, 1 H), 2,35-2,16 (m, 2 H), 2,06-1,97 (m, 1 H), 1,88-1,75 (m, 2 H), 1,73-1,60 (m, 4 H), 1,18-1,09 (m, 4 H), 1,07 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A n.º 80

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[(carbamoilamino)metil]-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B241**), y acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[[propil-carbamoil]amino]metil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B242**).



35

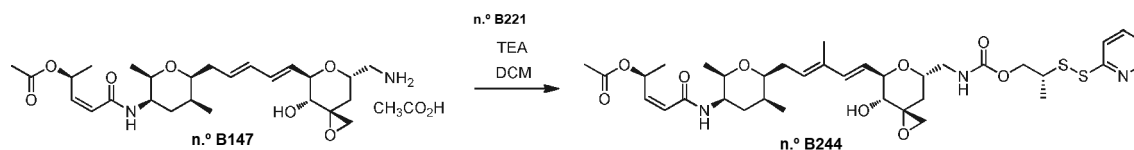
**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-(isocianatometil)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B243**). A una solución de n.º **NP1** (25,6 mg, 0,048 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (1 ml) a ta se le añadió trietilamina (7,3 mg, 0,072 mmol, 1,5 equiv.) seguido de difenilfosforilazida (11,7 µl, 0,053 mmol, 1,1 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 20 h. La reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> al 5 % (ac.) tres veces, se secó sobre sulfato sódico y se concentró al vacío para dar un aceite de color amarillo. El aceite se disolvió acetonitrilo (1 ml) y se calentó a 50 °C durante 1 h. La reacción se enfrió para dar n.º **B243** como una solución en acetonitrilo que se usó sin purificación adicional. Asumida la totalidad de la conversión. CLEM (Protocolo D): *m/z* 533,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,88 minutos.

**Etapa 2.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-[[carbamoilamino]metil]-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B241**). A una solución de n.º **B243** (12,8 mg, 0,024 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (0,5 ml) a ta se le añadió NH<sub>3</sub> (7 M en metanol, 34,3 µl, 0,24 mmol, 10 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 30 min. La reacción se concentró, se diluyó con DMSO y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B241** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 6,7 mg, 0,012 mmol, 51 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 550,6 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,72 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,79 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 6,41-6,25 (m, 2 H), 6,11 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 6,02-5,94 (m, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,7 y 7,4 Hz, 1 H), 5,64 (dd, *J* = 16,0 y 5,9 Hz, 1 H), 5,57-5,50 (m, 1 H), 5,46 (s, 1 H), 5,01 (d, *J* = 5,9 Hz, 1 H), 4,32-4,23 (m, 1 H), 3,88-3,77 (m, 1 H), 3,70-3,60 (m, 2 H), 3,55-3,46 (m, 1 H), 3,25-3,04 (m, 3 H), 2,75 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,60 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,35-2,13 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,88-1,59 (m, 8 H), 1,46-1,37 (m, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,0 Hz, 3 H).

**Etapa 3.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[[propilcarbamoil]amino]metil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B242**). A una solución de n.º **B243** (9 mg, 0,02 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (0,4 ml) a ta se le añadió n-propilamina (7 µl, 0,085 mmol, 5 equiv.) y la reacción se agitó durante 10 min. La reacción se diluyó con DMSO (0,7 ml) se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B242** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 8 mg, 0,014 mmol, 80 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 592,7 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,80 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,80' (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 6,41-6,32 (m, 1 H), 6,28 (d, *J* = 16,0 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 11,7 Hz, 1 H), 6,00-5,93 (m, 1 H), 5,91-5,81 (m, 2 H), 5,62 (dd, *J* = 16,0 y 5,6 Hz, 1 H), 5,54-5,46 (m, 1 H), 5,02 (d, *J* = 5,6 Hz, 1 H), 4,31-4,25 (m, 1 H), 3,86-3,77 (m, 1 H), 3,69-3,59 (m, 2 H), 3,53-3,45 (m, 1 H), 3,26-3,08 (m, 3 H), 2,97-2,88 (m, 2 H), 2,75 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,60 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,35-2,15 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,88-1,75 (m, 3 H), 1,73-1,60 (m, 4 H), 1,44-1,30 (m, 3 H), 1,25 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,07 (d, *J* = 6,4 Hz, 3 H), 0,95 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H), 0,82 (t ap., *J* = 7,3 Hz, 3 H).

### Ejemplo A n.º 81

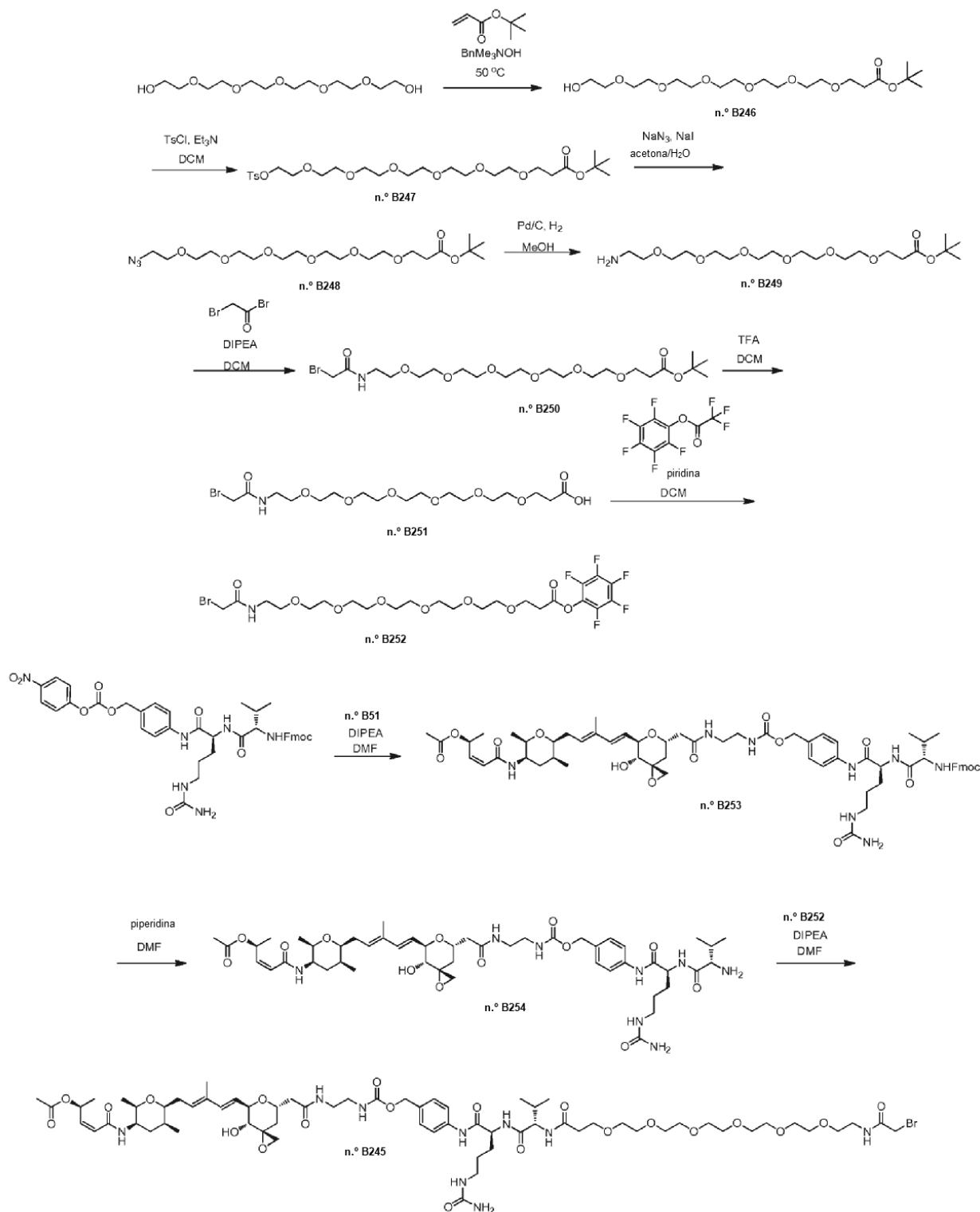
**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[[[(2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propil]oxi]carbonil]amino]metil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B244**).**



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-[[[(2R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propil]oxi]carbonil]amino]metil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B244**). A una solución de n.º **B147** (8,2 mg, 0,014 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (0,4 ml) a ta se le añadió trietilamina (12,3 µl, 0,088 mmol, 6,3 equiv.) seguido de n.º **B221** (9,4 mg, 0,026 mmol, 1,9 equiv.) en diclorometano (0,3 ml), y la reacción se agitó durante 30 min. Se añadió 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (1 mg, 0,008 mmol, 0,6 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 2 h. La reacción se concentró, se recogió en DMSO (800 µl) y se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B244** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 4 mg, 0,005 mmol, 40 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 734,33 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,91 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,46-8,40 (m, 1 H), 7,85-7,76 (m, 2 H), 7,36-7,29 (m, 1 H), 7,26-7,20 (m, 1 H), 6,41-6,32 (m, 1 H), 6,25 (d, *J* = 15,8 Hz, 1 H), 6,11 (d, *J* = 11,6 Hz, 1 H), 5,87 (dd, *J* = 11,6 y 7,6 Hz, 1 H), 5,61 (dd, *J* = 15,8 y 6,0 Hz, 1 H), 5,50-5,43 (m, 1 H), 4,98 (d, *J* = 6,2 Hz, 1 H), 4,29-4,22 (m, 1 H), 4,10-4,03 (m, 1 H), 4,01-3,85 (m, 2 H), 3,67-3,57 (m, 2 H), 3,52-3,44 (m, 1 H), 3,28-3,21 (m, 1 H), 3,02-2,93 (m, 1 H), 2,76 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,57 (d, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 2,34-2,13 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,85-1,53 (m, 9 H), 1,28-1,20 (m, 6 H), 1,05 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H), 0,93 (d, *J* = 7,3 Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 82

5 Preparación de N-(24-bromo-23-oxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-22-azatetracosan-1-ilo)-L-valil-N-{4-[[[2-((3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino]etil]carbamoil]oxi)metil]fenil}-N<sup>5</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B245).



**Etapa 1.** Síntesis de 1-hidroxi-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosa-21-oato de terc-butilo (n.º B246). Una mezcla de 3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecano-1,17-diol (25 g, 88,7 mmol, 1 equiv.), prop-2-enoato de terc-butilo (11,3 g, 88,7



mmol, 1 equiv.) e hidróxido de benciltrimetilamonio (2,5 ml) se agitó a 50 °C durante una noche. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:diclorometano (4 %~10 %) para proporcionar **n.º B246** (9,63 g, 25,7 %) en forma de un aceite de color amarillo.

5 **Etapa 2.** Síntesis de 1-[[[4-metilfenil]sulfonil]oxi]-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de terc-butilo (**n.º B247**). A una solución de **n.º B246** (9,63 g, 23,5 mmol, 1 equiv.) y trietilamina (3,56 g, 35,2 mmol, 1,5 equiv.) en diclorometano (150 ml) se le añadió cloruro de 4-metilbencenosulfonilo (6,69 g, 35,2 mmol, 1,5 equiv.) a 0 °C, y la solución se agitó a ta durante una noche. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso (150 ml) y la fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (200 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con metanol:diclorometano (0,5 %~0,8 %) para proporcionar **n.º B247** (9,21 g, 69,7 %) en forma de un aceite de color amarillo.

10 **Etapa 3.** Síntesis de 1-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de terc-butilo (**n.º B248**). A una solución de **n.º B247** (13,0 g, 23,0 mmol, 1 equiv.) en acetona/agua (150 ml/150 ml) se le añadieron azida sódica (3,20 g, 49,2 mmol, 2,1 equiv.) y yoduro sódico (621 mg, 3,45 mmol, 0,15 equiv.) y la reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante una noche. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (150 ml x 3) y las fases orgánicas se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con acetato de etilo:éter de petróleo (12-35 %) para proporcionar **n.º B248** (8,30 g, 83,1 %) en forma de un aceite de color amarillo.

15 **Etapa 4.** Síntesis de 1-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oato de *terc*-butilo (**n.º B249**). Una suspensión de **n.º B248** (8,30 g, 19,1 mmol, 1 equiv.) y Pd/C (1,0 g) en metanol se agitó en un globo de hidrógeno a ta durante una noche. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar **n.º B249** (7,80 g, 100 %) en forma de un aceite de color amarillo, que se usó directamente para la siguiente etapa.

20 **Etapa 5.** Síntesis de 1-bromo-2-oxo-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-3-azatetracosan-24-oato de terc-butilo (**n.º B250**). A una solución de **n.º B249** (5,80 g, 14,1 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (300 ml) se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (5,50 g, 42,6 mmol, 3 equiv.) y bromuro de bromoacetilo (4,24 g, 21,3 mmol, 1,5 equiv.) a 0 °C, y la reacción se agitó a 0 °C durante 15 min. La mezcla de reacción se concentró a sequedad, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con metanol:diclorometano (0,5-0,8 %) para proporcionar **n.º B250** (5,20 g, 69,3 %) en forma de un sólido de color amarillo.

25 **Etapa 6.** Síntesis de ácido 1-bromo-2-oxo-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-3-azatetracosan-24-oico (**n.º B251**). A una solución de **n.º B250** (5,20 g, 9,80 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (100 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (100 ml) a 0 °C y la solución se agitó a ta durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío para proporcionar **n.º B251** (6,00 g, 100 %) en forma de un aceite de color amarillo.

30 **Etapa 7.** Síntesis de 1-bromo-2-oxo-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-3-azatetracosan-24-oato de pentafluorofenilo (**n.º B252**). A una solución de **n.º B251** (4,65 g, 9,80 mmol, 1 equiv.) y trifluoroacetato de pentafluorofenilo (4,12 g, 14,7 mmol, 1,5 equiv.) en diclorometano (150 ml) se le añadió gota a gota piridina (4,65 g, 9,80 mmol, 1,5 equiv.) a 0 °C y la solución se agitó a durante 30 min. La mezcla de reacción se lavó con HCl 2 M (150 ml x 2) y la fase acuosa se extrajo diclorometano (150 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con metanol:diclorometano (1,5-2 %) para proporcionar un aceite de color amarillo, que se purificó adicionalmente por HPLC prep. para proporcionar **n.º B252** (1,20 g, 19,1 %) en forma de un aceite de color amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7,06 (a, 1 H), 3,89 (m, 4 H), 3,69-3,59 (m, 22 H), 3,58 (m, 2 H), 2,96 (m, 2 H).

35 **Etapa 8.** Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-[4-[[[2-((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[[2S,3S,5R,6R)-5-[[2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metil-penta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)etil]carbamoil]oxi)metil]fenil]-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B253**). A una solución de **n.º B51** (18,5 mg, 0,032 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetil-formamida (0,8 ml) a ta se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (22,5 µl, 0,128 mmol, 4 equiv.) seguido de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N<sup>6</sup>-carbamoil-N-[4-[[[4-nitrofenoxi)carbonil]oxi]metil]fenil]-L-ornitinamida (29,1 mg, 0,038 mmol, 1,2 equiv.) y la reacción se agitó durante 70 min. Se añadió más N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N<sup>6</sup>-carbamoil-N-[4-[[[4-nitrofenoxi)carbonil]oxi]metil]fenil]-L-ornitinamida (4,9 mg, 0,006 mmol, 0,2 equiv.) y la reacción se agitó durante un adicional 30 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B253** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 13,1 mg, 0,011 mmol, 34 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1206,2 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,91 minutos.

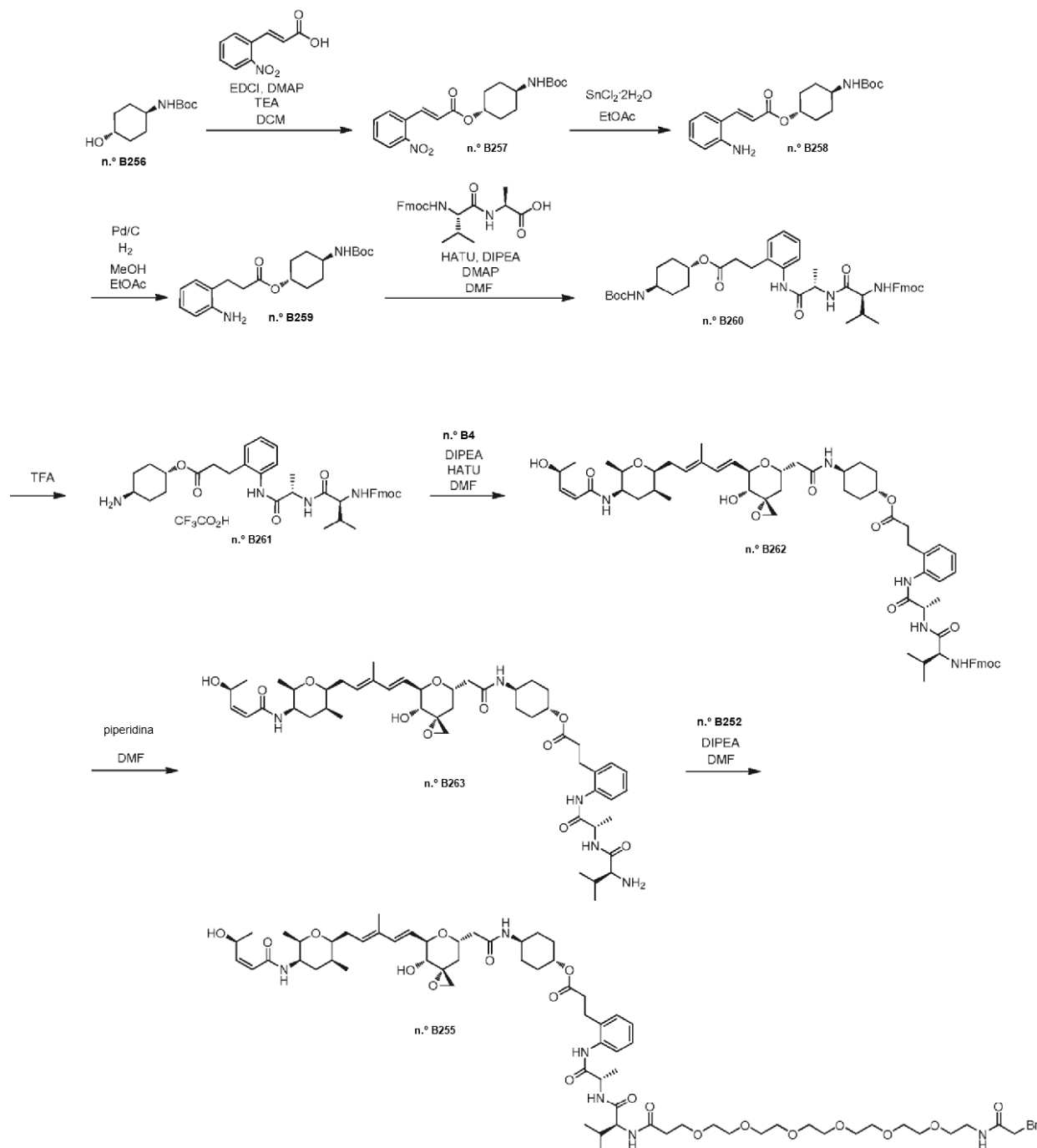
40 **Etapa 9.** Síntesis de L-valil-N-[4-[[[2-((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[[2S,3S,5R,6R)-5-[[2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoi]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metil-penta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)etil]carbamoil]oxi)metil]fenil]-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (**n.º B254**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 76 % a partir de 13,1 mg (0,011 mmol, 1,0 equiv.) del **n.º B253** y 18,7 mg (0,22 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 984,0 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,67 minutos.

Etapa 10. Síntesis de N-(24-bromo-23-oxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-22-azatetracosan-1-ol)-L-valil-N-{4-[[[2-  
 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65  
 70  
 75  
 80  
 85  
 90  
 95  
 100  
 105  
 110  
 115  
 120  
 125  
 130  
 135  
 140  
 145  
 150  
 155  
 160  
 165  
 170  
 175  
 180  
 185  
 190  
 195  
 200  
 205  
 210  
 215  
 220  
 225  
 230  
 235  
 240  
 245  
 250  
 255  
 260  
 265  
 270  
 275  
 280  
 285  
 290  
 295  
 300  
 305  
 310  
 315  
 320  
 325  
 330  
 335  
 340  
 345  
 350  
 355  
 360  
 365  
 370  
 375  
 380  
 385  
 390  
 395  
 400  
 405  
 410  
 415  
 420  
 425  
 430  
 435  
 440  
 445  
 450  
 455  
 460  
 465  
 470  
 475  
 480  
 485  
 490  
 495  
 500  
 505  
 510  
 515  
 520  
 525  
 530  
 535  
 540  
 545  
 550  
 555  
 560  
 565  
 570  
 575  
 580  
 585  
 590  
 595  
 600  
 605  
 610  
 615  
 620  
 625  
 630  
 635  
 640  
 645  
 650  
 655  
 660  
 665  
 670  
 675  
 680  
 685  
 690  
 695  
 700  
 705  
 710  
 715  
 720  
 725  
 730  
 735  
 740  
 745  
 750  
 755  
 760  
 765  
 770  
 775  
 780  
 785  
 790  
 795  
 800  
 805  
 810  
 815  
 820  
 825  
 830  
 835  
 840  
 845  
 850  
 855  
 860  
 865  
 870  
 875  
 880  
 885  
 890  
 895  
 900  
 905  
 910  
 915  
 920  
 925  
 930  
 935  
 940  
 945  
 950  
 955  
 960  
 965  
 970  
 975  
 980  
 985  
 990  
 995

## Ejemplo A n.º 83

Preparación de N-(24-bromo-23-oxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-22-azatetracosan-1-ilo)-L-valil-N-[2-(3-[[trans-4-(((3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil]amino)ciclohexil]oxi)-3-oxopropil]fenil]-L-alaninamida (n.º B255).

5



**Etapa 1.** Síntesis de (2E)-3-(2-nitrofenil)prop-2-enoato de trans-4-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]ciclohexilo (n.º B257). A una solución de ácido (2E)-3-(2-nitrofenil)prop-2-enoico (8,26 g, 55,8 mmol, 1 equiv.) en diclorometano (100 ml) se le añadió n.º B256 (12 g, 55,8 mmol, 1 equiv.) seguido de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (10,9 g, 55,8 mmol, 1 equiv.), 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (680 mg, 5,58 mmol, 0,1 equiv.) y trietilamina (23 ml, 167,7 mmol, 3 equiv.) y la reacción se agitó durante 17 h a ta. La reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo (4:1) para proporcionar n.º B257 (8,8 g, 40 %) en forma de un sólido de color blanco.

10

*Etapa 2.* Síntesis de (2E)-3-(2-aminofenil)prop-2-enoato de trans-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]ciclohexilo (n.º **B258**). A una solución de n.º **B257** (7,8 g, 20 mmol, 1 equiv.) en acetato de etilo (150 ml) se le añadió dihidrato de SnCl<sub>2</sub> (25 g, 0,11 mol, 5,5 equiv.) y la reacción se agitó durante 16 h. La solución pH se ajustó a pH = 8-9 con NaHCO<sub>3</sub> acuoso y se filtró. La torta de filtro se lavó con acetato de etilo/metanol tres veces y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con éter de petróleo/acetato de etilo (4:1) y acetato de etilo/metanol (20:1) para proporcionar n.º **B258** (850 mg, 12 %) en forma de un sólido de color amarillo.

*Etapa 3.* Síntesis de 3-(2-aminofenil)propanoato de trans-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]ciclohexilo (n.º **B259**). A una solución de n.º **B258** (800 mg, 2,2 mmol, 1 equiv.) en acetato de etilo (10 ml) a ta se le añadió Pd/C (1 g) y la mezcla se agitó en hidrógeno (241,32 kPa) durante 30 min. La reacción se filtró y se concentró al vacío para dar n.º **B259** en bruto (500 mg, 63 %) en forma de un sólido de color blanco que se usó sin purificación adicional.

*Etapa 4.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-[2-[3-((trans-4-[(terc-butoxicarbonil)amino]ciclohexil)oxi)-3-oxopropil]fenil]-L-alaninamida (n.º **B260**). A una solución de n.º **B259** (400 mg, 1,1 mmol, 1 equiv.) en N,N-dimetilformamida (20 ml) a ta se le añadieron N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-L-alanina (453 mg, 1,1 mmol, 1 equiv.), 4-N,N-dimetilaminopiridina (12 mg, 0,1 mmol, 0,1 equiv.) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (460 mg, 1,2 mmol, 1,1 equiv.) y la reacción se agitó durante 3 d. La mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con diclorometano/metanol (20:1 a 10:1) para proporcionar n.º **B260** (110 mg, 13 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,18 (s, 1 H), 7,77 (m, 3 H), 7,61 (d, 2 H), 7,40 (m, 4 H), 7,15 (m, 3 H), 6,77 (m, 1 H), 5,47 (d, 1 H), 4,73 (m, 2 H), 4,45 (m, 4 H), 4,24 (m, 1 H), 3,11 (c, 1 H), 2,85 (m, 2 H), 2,69 (m, 2 H), 2,17 (m, 2 H), 1,97 (m, 4 H), 1,65 (m, 1 H), 1,56 (m, 3 H), 1,43 (m, 11 H), 1,25 (m, 4 H), 0,98 (m, 6 H).

*Etapa 5.* Síntesis de sal trifluoroacetato de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-[2-[3-((trans-4-aminociclohexil)oxi)-3-oxopropil]fenil]-L-alaninamida (n.º **B261**). Al n.º **B260** (34,8 mg, 0,046 mmol, 1,0 equiv.) se le añadió ácido trifluoroacético (0,8 ml) previamente enfriado a 0 °C, y la reacción se dejó en agitación durante 10 min calentándose a ta. La reacción se concentró, se tomó en acetonitrilo y se reconcentró tres veces para dar n.º **B261** en forma de una goma que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional: Asumida la totalidad de la conversión. CLEM (Protocolo D): m/z 655,8 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,81 minutos.

*Etapa 6.* Síntesis de N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-[2-[3-((trans-4-(((3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)amino)ciclohexil)oxi]-3-oxopropil]fenil]-L-alaninamida (n.º **B262**). A una solución de n.º **B4** (14,1 mg, 0,029 mmol, 1 equiv.) en N,N-dimetilformamida (0,2 ml) a ta se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (30,6 µl, 0,17 mmol, 6 equiv.) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (13,6 mg, 0,035 mmol, 1,2 equiv.) y la reacción se agitó durante cinco minutos. Se añadió una solución de n.º **B261** (35,4 mg, 0,046 mmol, 1,6 equiv.) en N,N-dimetilformamida (0,6 ml) y la reacción se dejó en agitación durante 30 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B262** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 22,8 mg, 0,02 mmol, 70 %. CLEM (Protocolo D): m/z 1131,2 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,96 minutos.

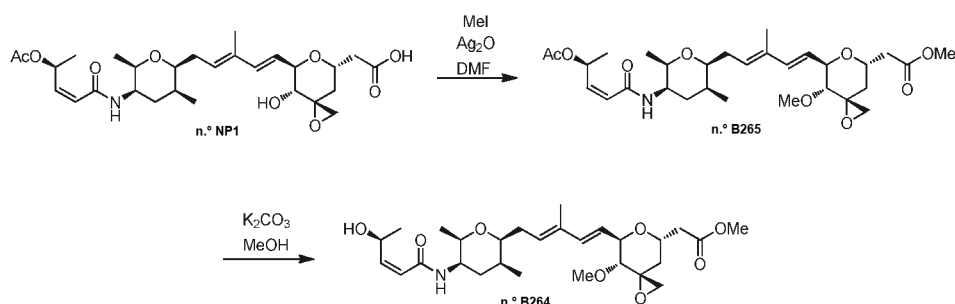
*Etapa 7.* Síntesis de L-valil-N-[2-[3-((trans-4-(((3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)amino)ciclohexil)oxi]-3-oxopropil]fenil]-L-alaninamida (n.º **B263**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 88 % a partir de 22,8 mg (0,02 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B262** y 34,1 mg (0,40 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B47**. CLEM (Protocolo D): m/z 908,54 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,64 minutos.

*Etapa 8.* Síntesis de N-(24-bromo-23-oxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-22-azatetracosan-1-oi)-L-valil-N-[2-[3-((trans-4-(((3R,5S,7R,8R)-8-hidroxi-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)acetil)amino)ciclohexil)oxi]-3-oxopropil]fenil]-L-alaninamida (n.º **B255**). A una solución de n.º **B263** (16,1 mg, 0,018 mmol, 1 equiv.) en N,N-dimetilformamida (0,2 ml) a ta se le añadió N,N-diisopropiletilamina (12,7 µl, 0,072 mmol, 4 equiv.) seguido de n.º **B252** (9,4 mg, 0,034 mmol, 1,9 equiv.) en N,N-dimetilformamida (0,5 ml) y la reacción se dejó en agitación a ta durante 15 min. Se añadió más n.º **B252** (8,8 mg, 0,014 mmol, 0,75 equiv.) en N,N-dimetilformamida (0,3 ml) y la reacción se agitó durante otros 15 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B255** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 14,4 mg, 0,011 mmol, 59 %. CLEM (Protocolo D): m/z 1365,75 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,78 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,40 (s, 1 H), 8,37-8,29 (m, 1 H), 8,15 (d, J = 7,1 Hz, 1 H), 7,87 (d, J = 8,8 Hz, 1 H), 7,82-7,74 (m, 2 H), 7,29-7,09 (m, 4 H), 6,28 (d, J = 15,9 Hz, 1 H), 5,98 (d, J = 10,5 Hz, 1 H), 5,87 (dd, J = 11,7 y 7,1 Hz, 1 H), 5,60 (dd, J = 15,9 y 5,6 Hz, 1 H), 5,54-5,46 (m, 1 H), 5,22-5,13 (m, 1 H), 5,11 (d, J = 4,7 Hz, 1 H), 5,02 (d, J = 5,1 Hz, 1 H), 4,61-4,52 (m, 1 H), 4,51-4,42 (m, 1 H), 4,30-4,17 (m, 3 H), 3,85 (s, 2 H), 3,69-3,37 (m, 25 H), 3,27-3,19 (m, 3 H), 2,88-2,72 (m, 3 H), 2,57 (d, J = 5,1 Hz, 1 H), 2,42-2,13 (m, 5 H), 2,01-1,91 (m, 2 H), 1,88-1,59 (m, 10 H), 1,53-1,43 (m, 1 H), 1,40-1,16 (m, 7 H), 1,11 (d, J = 6,4 Hz, 3 H), 1,06 (d, J = 6,4 Hz, 3 H), 0,96 (d, J = 7,3 Hz, 3 H), 0,86 (d, J =

6,9Hz, 3 H), 0,83 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A n.º 84

Preparación de [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-metoxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B265) y [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-metoxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B264).

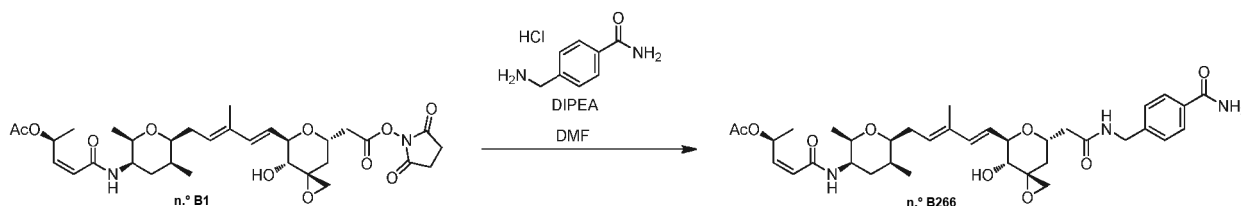


**Etapa 1.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-metoxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B265). A una solución de n.º NP1 (32,9 mg, 0,061 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,7 ml) a ta se le añadieron MeI (114  $\mu$ l, 1,83 mmol, 30 equiv.) y Ag<sub>2</sub>O (170 mg, 0,73 mmol, 12 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 72 h en la oscuridad. La reacción se filtró sobre celite lavándose con *N,N*-dimetilformamida (0,8 ml) y dividiéndose en dos partes. Una parte se llevó a la etapa dos mientras que la otra se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B265 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 4,66 mg, 0,008 mmol, 14 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  564,39 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,90 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7,79 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1 H), 6,41-6,31 (m, 2 H), 6,11 (dd,  $J = 11,7$  y 1,2 Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,7$  y 7,8 Hz, 1 H), 5,63-5,51 (m, 2 H), 4,58-4,51 (m, 1 H), 4,28-4,18 (m, 1 H), 3,70-3,57 (m, 5 H), 3,55-3,47 (m, 1 H), 3,33 (s, 3 H), 2,96-2,91 (m, 1 H), 2,71-2,63 (m, 2 H), 2,37-2,15 (m, 2 H), 2,07-1,94 (m, 4 H), 1,88-1,75 (m, 2 H), 1,73-1,60 (m, 4 H), 1,25 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,19-1,11 (m, 1 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,0$  Hz, 3 H).

**Etapa 2.** Síntesis de [(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-hidroxipent-2-enil]amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-metoxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetato de metilo (n.º B264). A una solución de n.º B265 (20 mg, 0,035 mmol, 1 equiv.) en metanol (0,6 ml) a ta se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (12,2 mg, 0,088 mmol, 2,5 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 45 min. La reacción se filtró lavándose con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º B264 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 4,2 mg, 0,008 mmol, 23 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  522,40 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,81 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7,76 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1 H), 6,36 (d,  $J = 14,4$  Hz, 1 H), 5,98 (d,  $J = 11,7$  Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J = 11,7$  y 7,0 Hz, 1 H), 5,63-5,50 (m, 2 H), 5,22-5,08 (m, 2 H), 4,58-4,52 (m, 1 H), 4,28-4,18 (m, 1 H), 3,70-3,57 (m, 5 H), 3,55-3,47 (m, 1 H), 3,32 (s, 3 H), 2,96-2,91 (m, 1 H), 2,71-2,63 (m, 2 H), 2,37-2,16 (m, 2 H), 2,06-1,96 (m, 1 H), 1,89-1,59 (m, 6 H), 1,20-1,02 (m, 7 H), 0,96 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

### Ejemplo A n.º 85

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(4-carbamoylbencil)amino]-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B266).

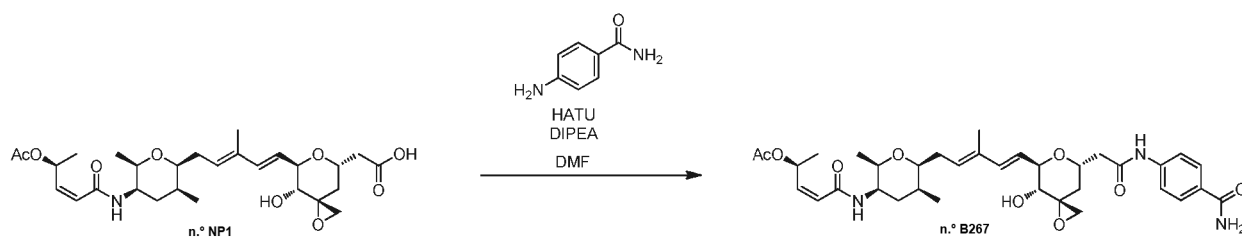


**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(4-carbamoylbencil)amino]-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B266). A una solución de n.º B1 (18,7 mg, 0,03 mmol,

1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (21,2  $\mu$ l, 0,12 mmol, 2 equiv.) y sal clorhidrato de 4-(aminometil)benzamida (11,2 mg, 0,06 mmol, 2 equiv.) y la reacción se agitó durante 1 h. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B266** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 15,4 mg, 0,023 mmol, 77 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  668,37 [M+Na]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,71 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,50-8,43 (m, 1 H), 7,88 (s, 1 H), 7,82-7,74 (m, 3 H), 7,33-7,25 (m, 3 H), 6,41-6,27 (m, 2 H), 6,10 (d,  $J$  = 11,6 Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J$  = 11,6 y 7,5 Hz, 1 H), 5,62 (dd,  $J$  = 15,8 y 5,5 Hz, 1 H), 5,50-5,43 (m, 1 H), 5,04 (d,  $J$  = 5,4 Hz, 1 H), 4,43-4,20 (m, 3 H), 3,68-3,59 (m, 2 H), 3,53-3,45 (m, 1 H), 3,29-3,23 (m, 1 H), 2,78 (d,  $J$  = 5,3 Hz, 1 H), 2,68-2,56 (m, 2 H), 2,35-2,13 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 1,90-1,72 (m, 4 H), 1,70 (s, 3 H), 1,66-1,58 (m, 1 H), 1,57-1,49 (m, 1 H), 1,25 (d,  $J$  = 6,5 Hz, 3 H), 1,04 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 3 H), 0,93 (d,  $J$  = 7,3 Hz, 3 H).

### Ejemplo A n.º 86

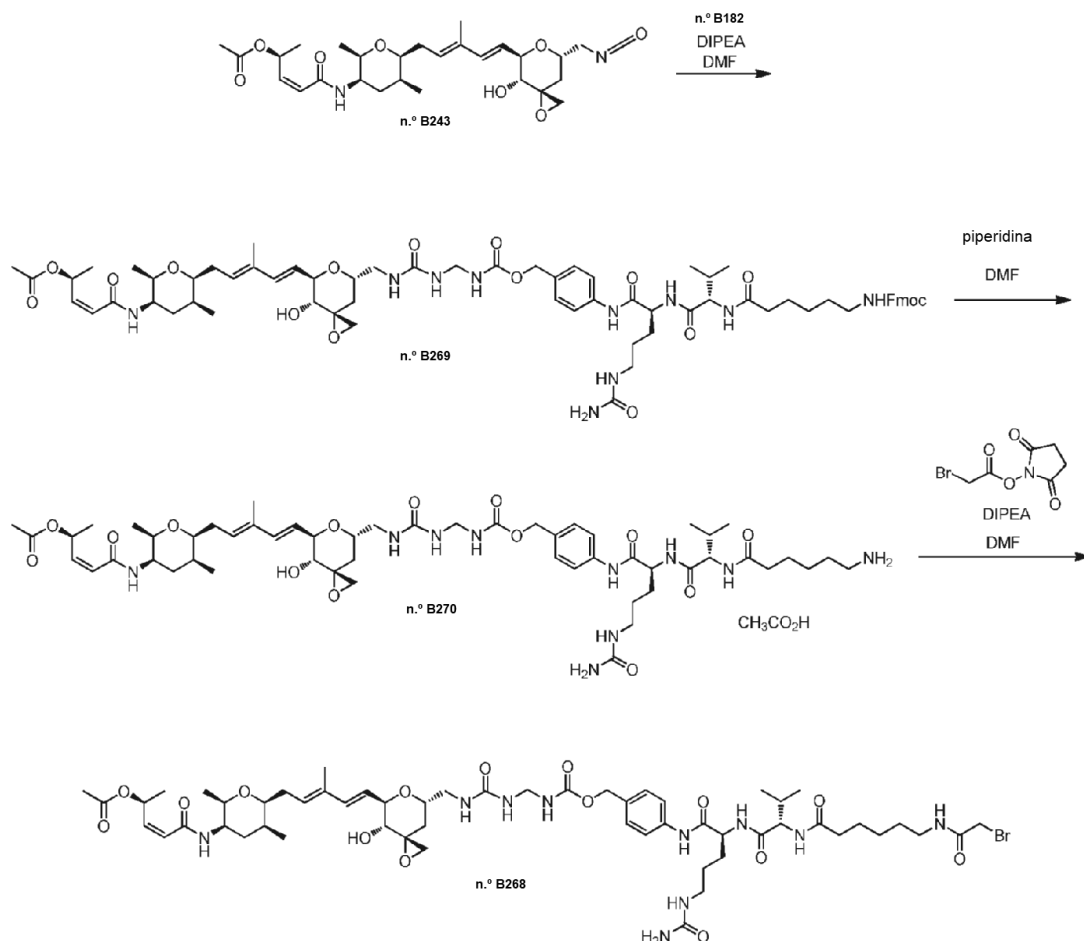
**Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(4-carbamoilfenil)amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B267).**



**Etapa 1. Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(4-carbamoilfenil)amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B267).** A una solución de **n.º NP1** (12,4 mg, 0,023 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetil-formamida (0,5 ml) a ta se le añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (20,2  $\mu$ l, 0,12 mmol, 5 equiv.) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (10,9 mg, 0,028 mmol, 1,2 equiv.) y la reacción se agitó durante cinco minutos. Se añadió 4-aminobenzamida (6,3 mg, 0,046 mmol, 2 equiv.) y la reacción se dejó en agitación durante 1 h. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar **n.º B267** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 4,5 mg, 0,007 mmol, 30 %. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  654,37 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,73 minutos. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10,21 (s, 1 H), 7,88-7,75 (m, 3 H), 7,70-7,62 (m, 2 H), 7,23 (s, 1 H), 6,41-6,32 (m, 1 H), 6,26 (d,  $J$  = 16,1 Hz, 1 H), 6,10 (d,  $J$  = 11,6 Hz, 1 H), 5,87 (dd,  $J$  = 11,6 y 7,6 Hz, 1 H), 5,58 (dd,  $J$  = 16,1 y 5,3 Hz, 1 H), 5,43-5,34 (m, 1 H), 5,08 (d,  $J$  = 5,4 Hz, 1 H), 4,42-4,29 (m, 2 H), 3,70-3,59 (m, 2 H), 3,48-3,40 (m, 1 H), 3,30-3,26 (m, 1 H), 2,81-2,73 (m, 2 H), 2,62 (d,  $J$  = 5 Hz, 1 H), 2,31-2,12 (m, 2 H), 1,98 (s, 3 H), 1,96-1,88 (m, 1 H), 1,87-1,74 (m, 2 H), 1,68 (s, 3H), 1,63-1,50 (m, 2 H), 1,25 (d,  $J$  = 6,5 Hz, 3 H), 1,06 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 3 H), 0,93 (d,  $J$  = 7,5 Hz, 3 H).

## Ejemplo A n.º 87

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-((6S,9S)-19-bromo-6-metil-2,5,8,11,18-pentaoxo-9-(propan-2-il)-3,4,7,10,17-pentaazonadec-1-il)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B268).



5

**Etapa 1.** Síntesis de N-(6-((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)hexanoil)-L-valil-N-(4-{9-[(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3,7-dioxo-2-oxa-4,6,8-triazanon-1-il}fenil)-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º **B269**). A una solución de n.º **B243** (19,7 mg, 0,037 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (1 ml) se le añadió *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) y el acetonitrilo se retiró al vacío. A esta solución se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (32,6 µl, 0,19 mmol, 5 equiv.) seguido de una solución de n.º **B182** (40,5 mg, 0,045 mmol, 1,22 equiv.) y la reacción se agitó durante 30 min. Se añadió más *N,N*-diisopropiletilamina (32,6 µl, 0,19 mmol, 5 equiv.) y la reacción se agitó durante otros 70 min. La reacción se purificó por cromatografía de fase inversa (Procedimiento A) para dar n.º **B269** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 12 mg, 0,009 mmol, 25 %. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1320,4 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,91 minutos.

**Etapa 2.** Síntesis de N-(6-aminohexanoil)-L-valil-N-(4-{9-[(3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3,7-dioxo-2-oxa-4,6,8-triazanon-1-il}fenil)-N<sup>6</sup>-carbamoil-L-ornitinamida, sal acetato (n.º **B270**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 69 % a partir de 19,8 mg (0,015 mmol, 1,0 equiv.) del n.º **B269** y 25,5 mg (0,3 mmol, 20,0 equiv.) de piperidina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto n.º **B47**. CLEM (Protocolo D): *m/z* 1097,78 [M+H]<sup>+</sup>, tiempo de retención = 0,64 minutos.

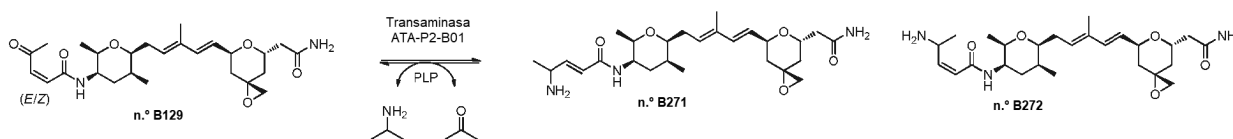
Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-((6S,9S)-19-bromo-6-metil-2,5,8,11,18-pentaoxo-9-(propan-2-il)-3,4,7,10,17-pentaazonadec-1-il)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il) amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B268**). El compuesto del título se preparó con un rendimiento del 64 % a partir de 12 mg (0,01 mmol, 1 equiv.) del n.º **B270**, 3,5 mg (0,015 mmol, 1,5 equiv.) de 1-[(bromoacetil)oxil]pirrolidin-2,5-diona y 5,2 mg (0,04 mmol, 4,0 equiv.) de *N,N*-

25

diisopropiletilamina usando el procedimiento descrito para la preparación del compuesto **n.º B150**. CLEM (Protocolo D):  $m/z$  1217,43  $[M+H]^+$ , tiempo de retención = 0,75 minutos. RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,98 (s, 1 H), 8,27-8,20 (m, 1 H), 8,08 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1 H), 7,84-7,73 (m, 2 H), 7,62-7,54 (m, 2 H), 7,30-7,23 (m, 2 H), 6,65-6,57 (m, 1 H), 6,41-6,32 (m, 1 H), 6,29 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1 H), 6,16-6,07 (m, 2 H), 6,01-5,93 (m, 1 H), 5,86 (dd,  $J = 11,5$  y 7,6 Hz, 1 H), 5,63 (dd,  $J = 15,9$  y 5,6 Hz, 1 H), 5,55-5,47 (m, 1 H), 5,41 (s, 2 H), 5,01 (d,  $J = 5,9$  Hz, 1 H), 4,94 (s, 1 H), 4,43-4,16 (m, 4 H), 3,81 (s, 2 H), 3,69-3,59 (m, 2 H), 3,54-3,45 (m, 1 H), 3,26-3,10 (m, 3 H), 3,08-2,88 (m, 4 H), 2,74 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1 H), 2,60 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1 H), 2,35-2,09 (m, 6 H), 2,01-1,92 (m, 4 H), 1,87-1,75 (m, 4 H), 1,74-1,30 (m, 14 H), 1,29-1,19 (m, 4 H), 1,06 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3 H), 0,86 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 0,83 (d,  $J = 6,9$  Hz, 3 H).

## 10 Ejemplo n.º A88

**Preparación de (2E)-4-amino-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]pent-2-enamida (n.º B271) y (2Z)-4-amino-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]pent-2-enamida (n.º B272)**



**Etapa 1.** Síntesis de (2E)-4-amino-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]pent-2-enamida (n.º B271) y (2Z)-4-amino-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]pent-2-enamida (n.º B272): A un tampón de fosfato sódico 100 mM a pH 7,4 (3,57 ml) se le añadieron **n.º B129** (7 mg, en 0,23 ml de DMSO, 1 equiv.), isopropilamina (1,475 ml de una solución 1 M hecha en tampón fosfato a pH 3, que dio una solución de pH ~7, 100 equiv.), fosfato de piridoxal (0,295 ml de una solución 50 mM en tampón fosfato a pH 7,4, 1 equiv.) y preparación de enzima ATA-P2-B01 (33 mg, en 0,33 ml de tampón fosfato a pH 7,4, Codexis, lot n.º D11134, R-selectiva para acetofenona). Después de la incubación a 30 °C, 200 rpm durante 19 horas, el pH se ajustó a ~12 con hidróxido sódico y la reacción se extrajo siete veces con igual volumen de acetato de etilo. El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se volvió a suspender en 0,25 ml de acetonitrilo/agua 1:1 se filtró y se purificó por cromatografía de fase inversa en un total de 10 veces (Procedimiento I). Las fracciones con tiempo de retención de 10 y 13 min se recogieron y se neutralizaron con hidróxido de amonio antes de secarse por congelación para proporcionar **n.º B271** y **n.º B272**, respectivamente, en forma de sólidos de color blanco.

**n.º B271;** (Rendimiento 1,6 mg). HPLC (Protocolo P): tiempo de retención = 6,5 minutos; HRESIMS  $m/z$  observado 476,3124  $[M+H]^+$  (predicho para  $C_{26}H_{42}N_3O_5$  es  $m/z$  476,3124); RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,55 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H), 7,32 (s a, 1 H), 6,77 (s a, 1 H), 6,54 (dd,  $J = 15,6$  y 6,2 Hz, 1 H), 6,27 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1 H), 6,21 (dd,  $J = 15,4$  y 1,2 Hz, 1 H), 5,59 (dd,  $J = 16,0$  y 5,5 Hz, 1 H), 5,51 (t a,  $J = 7,0$  Hz, 1 H), 4,54 (c a,  $J = 5,5$  Hz, 1 H), 4,30 (m, 1 H), 3,69 (m, 1H), 3,64 (m, 1 H), 3,50 (m, 1 H), 3,42 (m, 1 H), 2,62 (m, 2 H), 2,58-2,52 (m, 1H), 2,34-2,27 (m, 2 H), 2,24-2,17 (m, 2 H), 1,85-1,73 (m, 4 H), 1,70 (s, 3 H), 1,64 (m, 2 H), 1,37 (dd,  $J = 13,1$  y 6,2 Hz, 1 H), 1,07 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 1,05 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

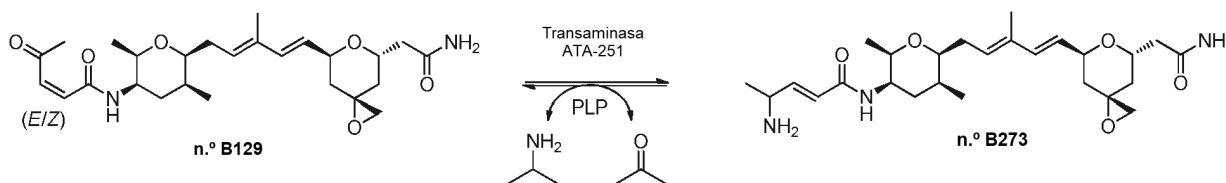
**n.º B272** (Rendimiento 1,1 mg) HPLC (Protocolo P): tiempo de retención = 6,85 minutos; HRESIMS  $m/z$  476,3131  $[M+H]^+$  (predicho para  $C_{26}H_{42}N_3O_5$  es  $m/z$  476,3124); RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,76 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1 H), 7,32 (s a, 1 H), 6,77 (s a, 1 H), 6,27 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1 H), 5,88 (d a,  $J = 11,7$ , 1 H), 5,73 (dd,  $J = 11,5$  y 8,4 Hz, 1 H), 5,59 (dd,  $J = 16,0$  y 5,5 Hz, 1 H), 5,51 (t a,  $J = 6,6$  Hz, 1 H), 4,54 (c a,  $J = 5,5$  Hz, 1 H), 4,47 (m,  $J = 7,0$  Hz, 1 H), 4,30 (m, 1 H), 3,65 (m, 2 H), 3,50 (m, 1 H), 2,62 (m, 2 H), 2,55 (m, 1H), 2,34-2,27 (m, 2 H), 2,24-2,18 (m, 2 H), 1,83-1,75 (m, 2 H), 1,70 (s, 3 H), 1,65 (m, 3 H), 1,38 (dd,  $J = 13,3$  y 6,2 Hz, 1 H), 1,24 (s a, 1 H), 1,07 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H), 1,02 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 0,95 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3 H).

45



## Ejemplo n.º A89

Preparación de (2E)-4-amino-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]pent-2-enamida (n.º B273)

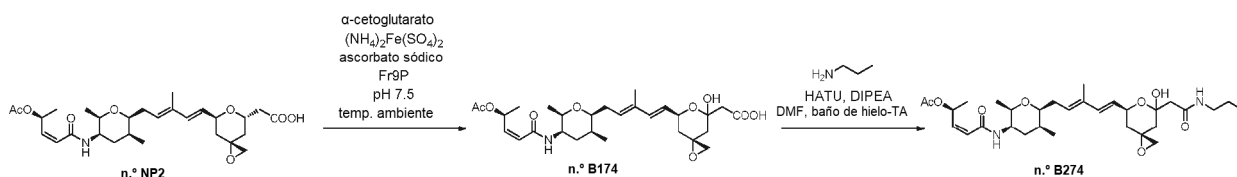


5

**Etapa 1. Síntesis** (2E)-4-amino-N-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-amino-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]pent-2-enamida (n.º B273). Al n.º B129 (2,9 mg, en 0,1 ml de DMSO, 1 equiv.) se le añadieron fosfato de piridoxal (0,125 ml de una solución 50 mM en tampón fosfato a pH 7,4, 1 equiv.) y una mezcla de isopropilamina (0,625 ml de una solución 1 M hecha en tampón fosfato a pH 3, que dio una solución de pH ~7, 100 equiv.), preparación de enzima ATA-251 (15 mg, en 0,15 ml de tampón fosfato a pH 7,4, Codexis, lot n.º D11140, S-selectiva para acetofenona) y tampón fosfato sódico 100 mM a pH 7,4 (1,6 ml) que se había preincubado a 45 °C, 200 rpm durante 1 hora. Después de la incubación a 37 °C, 200 rpm durante 22 horas, el pH se ajustó a ~12 con hidróxido sódico y la reacción se extrajo siete veces con igual volumen de acetato de etilo. El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se volvió a suspender en 0,25 ml de acetonitrilo/agua 1:1, se filtró y se purificó por cromatografía de fase inversa en un total de 4 veces (Procedimiento J). La fracción con tiempo de retención de 9 min se recogió y se neutralizó con hidróxido de amonio antes de secarse por congelación para proporcionar n.º B273 en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 0,7 mg. HPLC (Protocolo P): tiempo de retención = 6,6 minutos; HRESIMS  $m/z$  476,3126  $[M+H]^+$  (predicho para  $C_{26}H_{42}N_3O_5$  es  $m/z$  476,3124); RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,57 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1 H), 7,33 (s a, 1 H), 6,78 (s a, 1 H), 6,54 (dd,  $J = 15,4$  y 6,1 Hz, 1 H), 6,27 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1 H), 6,22 (d a,  $J = 15,4$  Hz, 1 H), 5,59 (dd,  $J = 15,9$  y 5,4 Hz, 1 H), 5,51 (t a,  $J = 7,1$  Hz, 1 H), 4,54 (c,  $J = 5,3$  Hz, 1 H), 4,30 (m, 1 H), 3,69 (m, 1H), 3,64 (dc,  $J = 6,8$  y 2,2 Hz, 1 H), 3,49 (dt,  $J = 7$  y 2,2 Hz, 1 H), 3,42 (m, 1 H), 2,62 (m, 2 H), 2,58-2,53 (m, 1H), 2,33-2,28 (m, 1 H), 2,23-2,18 (m, 2 H), 1,85-1,74 (m, 4 H), 1,70 (s, 3 H), 1,64 (m, 2 H), 1,37 (dd,  $J = 13,3$  y 6,2 Hz, 1 H), 1,07 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3 H), 1,05 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3 H), 0,96 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3 H).

## Ejemplo n.º A90

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,5S)-7-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B274)



**Etapa 1.** Síntesis de ácido [(3R,7S)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-5-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º B174). A una solución acuosa de n.º NP2 (4 mg, 0,4 mM, 1 equiv.) en tampón MOPS 50 mM a pH 7,5 se le añadieron  $\alpha$ -cetoglutarato (concentración final 0,8 mM, 2 equiv.), ascorbato sódico (0,08 mM, 0,2 equiv.),  $NH_4Fe(II)SO_4$  (0,04 mM, 0,1 equiv.) y Fr9P recombinante de la etapa 1 del ejemplo n.º A60 (1,6  $\mu$ M, 0,004 equiv.). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se acidificó a pH ~4-5 con ácido acético y se extrajo tres veces con igual volumen de acetato de etilo. El disolvente se evaporó a presión reducida, para proporcionar n.º B174 que se usó sin purificación adicional. CLEM  $m/z$  536  $[M+H]^+$ .

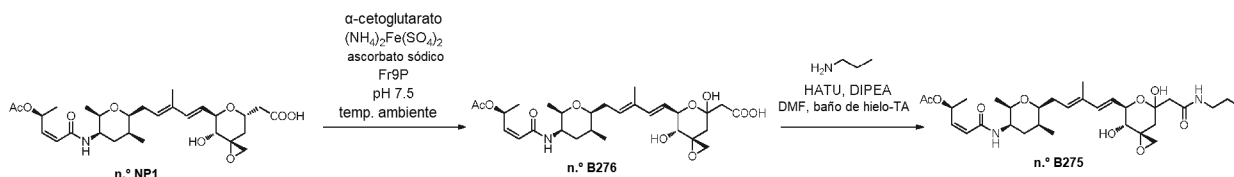
**Etapa 2.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,5S,7S)-7-hidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B274)

Al n.º B174 (4,0 mg; 0,0075 mmol) en DMF (0,05M) a 0 °C. A este se le añadió HATU (1,4 equiv.) y la mezcla se agitó durante 5 min. Se añadió DIPEA (1 equiv.), seguido de propilamina (1,5 equiv.) en DMF y la mezcla se agitó a TA durante 2 h. La reacción se diluyó con acetonitrilo y se purificó por HPLC de fase inversa (Protocolo K): tiempo de retención = 10,8 minutos.; La fracción que contenía el producto se congeló y se liofilizó inmediatamente para proporcionar n.º B274 en forma de un sólido de color blanco (2,4 mg; Rendimiento 60 %). CLEM  $m/z$  577  $[M+H]^+$  RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  7,99 (dd,  $J = 5,5$ , 5,5 Hz, 1H), 7,80 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 6,36 (m, 1H), 6,21 (d,  $J = 15,7$  Hz, 1H), 6,11 (dd,  $J = 11,7$ , 0,9 Hz, 1H), 5,86 (dd,  $J = 11,6$ , 7,6 Hz, 1H), 5,53 (dd, 15,7, 6,0 Hz, 1H),

5,47 (m, 1H), 4,65 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,05 (m, 1H), 3,01 (m, 1H), 2,47 (m, 2H), 2,40 (m, 2H), 2,29 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 2,11 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,80 (m, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,41 (m, 2H), 1,29 (m, 1H), 1,25 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H), 1,17 (m, 1H), 1,07 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H), 0,94 (d,  $J = 7,2$  Hz, 3H), 0,84 (dd,  $J = 7,6, 7,6$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170,0, 169,7, 164,4, 142,6, 133,9, 133,6, 128,4, 127,3, 122,6, 95,9, 79,7, 74,7, 66,8, 67,7, 54,2, 49,2, 46,0, 45,5, 39,8, 39,7, 37,8, 35,0, 31,4, 28,5, 22,0, 19,5, 17,4, 13,9, 12,6, 12,0, 10,9.

### Ejemplo n.º A91

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4,7-dihidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B275)



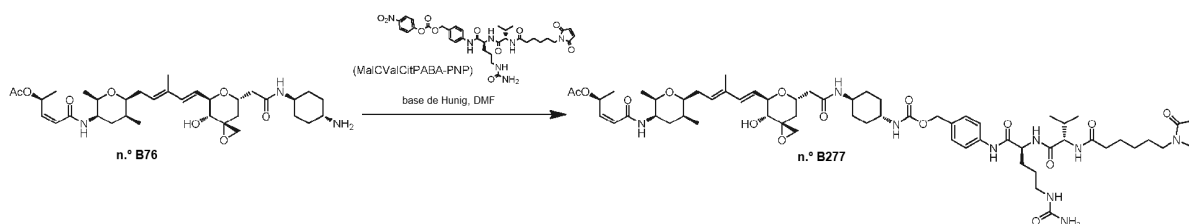
Etapa 1. Síntesis de ácido [(3R,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-5,8-dihidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acético (n.º B276): A una solución acuosa de n.º NP1 (4 mg, 0,4 mM, 1 equiv.) en tampón MOPS 50 mM a pH 7,5 se le añadieron  $\alpha$ -cetoglutarato (concentración final 0,8 mM, 2 equiv.), ascorbato sódico (0,08 mM, 0,2 equiv.),  $\text{NH}_4\text{Fe(II)SO}_4$  (0,04 mM, 0,1 equiv.) y Fr9P recombinante de la etapa 1 del ejemplo n.º A60 (1,2  $\mu\text{M}$ , 0,003 equiv.). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 min, la reacción se acidificó a pH ~4-5 con ácido acético y se extrajo tres veces con igual volumen de acetato de etilo. El disolvente se evaporó a presión reducida y el n.º B276 en bruto obtenido se usó sin purificación adicional. CLEM  $m/z$  552  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Etapa 2. Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4,7-dihidroxi-7-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B275)

Al n.º B276 (4,3 mg; 0,0080 mmol) en DMF (0,05M) y a 0 °C se le añadió HATU (1,4 equiv.) y se dejó agitar durante 5 min. Se añadió DIPEA (1 equiv.), seguido de propilamina (1,5 equiv.) en DMF y la reacción se dejó en agitación a TA 1 h. Se añadieron una cantidad adicional de HATU (0,7 equiv.), DIPEA (1 equiv.) y propilamina (1 equiv.) y la mezcla se agitó durante un adicional de 30 min. El producto en bruto se diluyó con acetonitrilo y se purificó por HPLC de fase inversa (Protocolo K): tiempo de retención = 8,60 minutos. La fracción que contenía el producto se congeló y se liofilizó inmediatamente para proporcionar n.º B275 en forma de un sólido de color blanco (2,3 mg; Rendimiento 49 %). CLEM  $m/z$  593  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , mult,  $J$  en Hz)  $\delta$  8,01 (dd,  $J = 5,6, 5,6$  Hz, 1H), 7,81 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 6,36 (m, 1H), 6,24 (d,  $J = 16,1$  Hz, 1H), 6,11 (dd,  $J = 12,1$  Hz, 1H), 5,88 (dd,  $J = 11,7, 7,7$  Hz, 1H), 5,67 (dd, 16,1, 4,4 Hz, 1H), 5,44 (m, 1H), 4,55 (d, 8,7 Hz, 1H), 4,33 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,33 (m, 1H), 3,07 (m, 1H), 3,00 (m, 1H), 2,73 (m, 1H), 2,39 (m, 2H), 2,31 (m, 1H), 2,29 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,49 (m, 1H), 1,41 (m, 2H), 1,25 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H), 1,07 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H), 0,95 (d,  $J = 7,2$  Hz, 3H), 0,84 (m, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170,4, 169,6, 164,7, 143,4, 135,5, 134,0, 128,9, 126,3, 123,4, 95,7, 80,6, 75,4, 71,4, 68,4 (x 2), 56,7, 46,7, 46,2, 45,9, 41,3, 40,6, 35,6, 32,1, 29,1, 22,8, 21,4, 20,2, 18,1, 14,6, 12,8, 11,8.

### Ejemplo n.º A92

Preparación de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-[4-(((trans-4-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil)amino)ciclohexil]carbamoil)oxi)metil]fenil]-N<sup>5</sup>-carbamoil-L-ornitinamida (n.º B277)

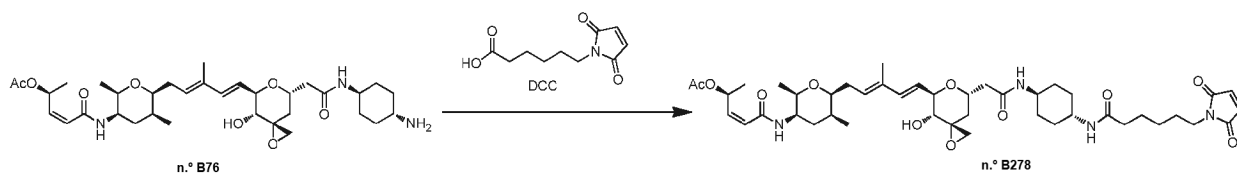


Etapa 1. Síntesis de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-valil-N-[4-(((trans-4-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil)amino)ciclohexil]carbamoil)oxi)metil]fenil]-N<sup>5</sup>-

carbamoil-*L*-ornitinamida (n.º **B277**) A una solución de *N*-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil]-*L*-valil-*N*<sup>5</sup>-carbamoil-*N*-[4-[[[(4nitrobencil)oxi]carbonil]oxi]metil]fenil]-*L*-ornitinamida (Mal-CValCitPABC-PNP, preparada como en Bioconjugate Chem. 2002,13, 855-869, 16,5 mg, 0,022 mmol, 1,1 equiv.) y **B76** (11,9 mg, pureza del 83 %, 0,019 mmol, 1,0 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (1,5 ml) se le añadió *N,N*-diisopropil-etilamina (30 µl). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º **B277** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 9,3 mg, 40 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,5 minutos (pureza del 94 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 1229,5 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Ejemplo n.º A93

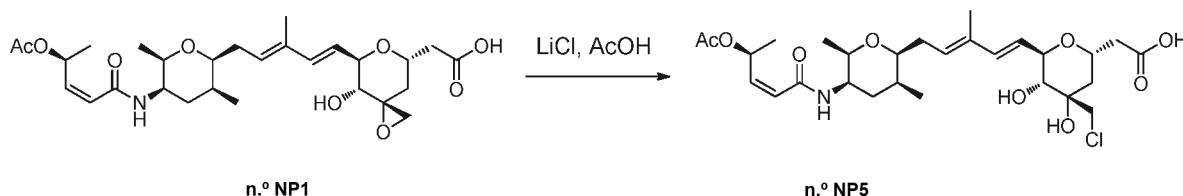
10 **Preparación de acetato de (2*S*,3*Z*)-5-[[[(2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-[(2*E*,4*E*)-5-[(3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-2-[(trans-4-[[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil]amino]ciclohexil)amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxoespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B278**)**



15 **Etapa 1. Síntesis de acetato de (2*S*,3*Z*)-5-[[[(2*R*,3*R*,5*S*,6*S*)-6-[(2*E*,4*E*)-5-[(3*R*,4*R*,5*R*,7*S*)-7-2-[(trans-4-[[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoil]amino]ciclohexil)amino]-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxoespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º **B278**)** Una solución de ácido 6-maleimidohexanoico (24,2 mg, 0,11 mmol, 5 equiv.) y diciclohexilearodiimida (DCC, 49,5 mg, 0,24 mmol, 11 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (1,0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió n.º **B76** (13,0 mg, pureza del 83 %, 0,021 mmol, 1,0 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º **B278** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 8,6 mg, 49 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 9,6 minutos (pureza del 96 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 824,4 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Ejemplo n.º A94

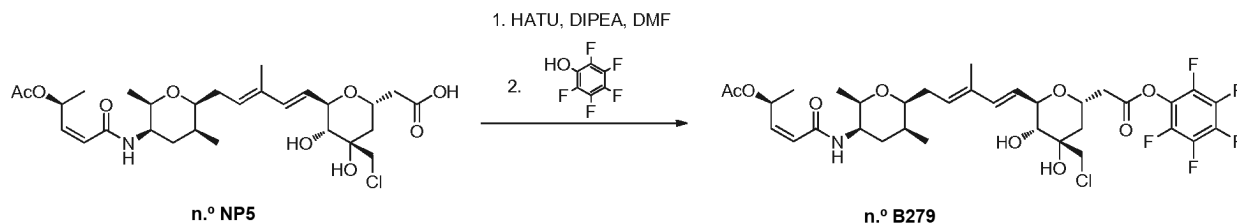
25 **Preparación de (1*S*,5*R*)-5-[(1*E*,3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-[(2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,5-anhidro-1-(carboximetil)-3-*C*-(clorometil)-2-deoxi-*D*-eritro-pentitol (n.º **NP5**) [PF-06739239]**



30 **Etapa 1. Síntesis de (1*S*,5*R*)-5-[(1*E*,3*E*)-5-[(2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-[(2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil] amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2*H*-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,5-anhidro-1-(carboximetil)-3-*C*-(clorometil)-2-deoxi-*D*-eritro-pentitol (n.º **NP5**)** Una solución de n.º **NP1** (101 mg, -70 % puro, ~0,19 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano anhidro (1,0 ml) se mezcló con una solución de cloruro de litio (61 mg, 1,4 mmol, 7 equiv.) en ácido acético anhidro (1,0 ml) a 0 °C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º **NP5** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 54,6 mg, -76 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,5 minutos (pureza del 96 %). CLEM (Protocolo M): *m/z* 572,5 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 12,00 (s a, D<sub>2</sub>O intercambiable), 7,80 (d, *J* = 8,2, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,36 (dc, *J* = 6,0, 6,0, 1H), 6,22 (d a, *J* = 15,6, 1H), 6,11 (d, *J* = 11,7, 1H), 5,87 (dd, *J* = 11,7, 7,4, 1H), 5,62 (dd, *J* = 15,6, 5,4, 1H), 5,47 (dd a, *J* = 7,0, 7,0, 1H), 5,02 (d, *J* = 7,0, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,78 (s a, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,27 (m, 1H), 4,09 (dd, 8,1, 6,3, 1H), 3,65 (m, 2H), 3,63 (d, *J* = 10,9, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,46 (d, *J* = 10,9, 1H), 3,22 (dd, *J* = 8,6, 7,4, 1H), 2,97 (dd, *J* = 15,6, 9,0, 1H), 2,60 (dd, *J* = 15,6, 5,5, 1H), 2,28 (m, 1H), 2,21 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,92 (dd, *J* = 14,7, 6,6, 1H), 1,80 (m, 3H), 1,70 (s, 3H), 1,65 (m, 2H), 1,25 (d, *J* = 6,6, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,5, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,0, 3H).

## Ejemplo n.º A95

Preparación de (1S,5R)-5-((1E,3E)-5-[(2S,3S,SR,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-3-C-(clorometil)-2-deoxi-1-[2-oxo-2-(pentafluorofenoxi)etil]-D-eritro-pentitol (n.º B279)



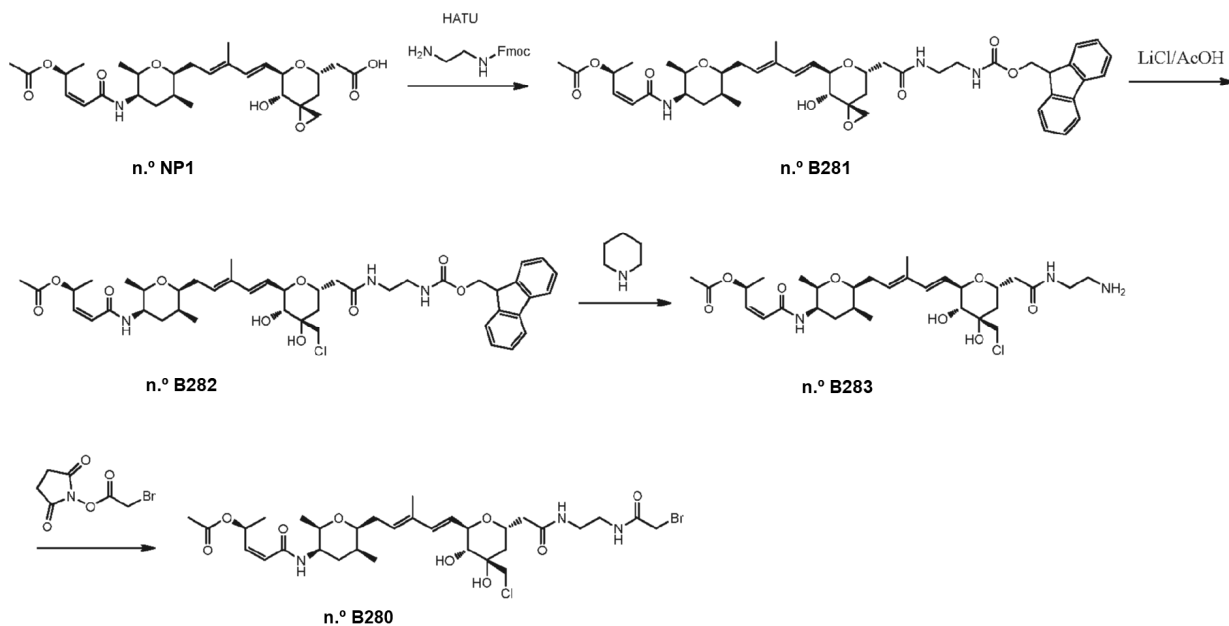
5

**Etapa 1.** Síntesis de (1S,5R)-5-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil] amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-3-C-(clorometil)-2-deoxi-1-[2-oxo-2-(pentafluorofenoxi)etil]-D-eritro-pentitol (n.º B279) A una solución de n.º NP5 (18,2 mg, 0,032 mmol, 1 equiv.) y HATU (16,8 mg) en *N,N*-dimetilformamida seca (200 ul) se le añadió con *N,N*-diisopropiletilamina (20 ul) y la solución se agitó durante 5 min a temperatura ambiente y después se mezcló con pentafluorofenol (25 mg, 0,13 mmol, 4 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (150 ul). La mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento B\*) para proporcionar n.º B279 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 15,1 mg, 74 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 14,8 minutos (pureza del 94 %). CLEM (Protocolo M):  $m/z$  738,3 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, mult, *J* en Hz) δ 7,80 (d, *J* = 7,8, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 6,36 (dc, *J* = 6,0, 6,0, 1H), 6,24 (d a, *J* = 15,6, 1H), 6,11 (d, *J* = 11,3, 1H), 5,87 (dd, *J* = 11,3, 7,4, 1H), 5,66 (dd, *J* = 15,9, 5,5, 1H), 5,44 (dd a, *J* = 6,6, 6,6, 1H), 5,16 (d, *J* = 7,0, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,97 (s a, 1H, D<sub>2</sub>O intercambiable), 4,46 (m, 1H), 4,16 (dd, 9,0, 5,8, 1H), 3,70-3,63 (m, 3H), 3,68 (d, *J* = 10,6, 1H), 3,51 (d, *J* = 10,9, 1H), 3,49 (m, 1H), 3,27 (dd, *J* = 9,0, 7,0, 1H), 3,10 (dd, *J* = 15,6, 4,3, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 2,01 (dd, *J* = 15,1, 7,0, 1H), 1,97 (s, 3H), 1,81 (m, 2H), 1,77 (d, *J* = 14,8, 1H), 1,70 (s, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,25 (d, *J* = 6,4, 3H), 1,07 (d, *J* = 6,5, 3H), 0,95 (d, *J* = 7,0, 3H).

20

## Ejemplo n.º A96

Preparación de (1 S,SR)-5-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-1-[2-((2-[(bromoacetil)amino]etil)amino)-2-oxoetil]-3-C-(clorometil)-2-deoxi-D-eritro-pentitol (n.º B280)



25

**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-{2-[(2-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino]etil)amino]-2-oxoetil}-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B281). A una solución de n.º NP1 (122,1 mg, pureza de ~67 %, 0,22 mmol, 1,2 equiv.) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N,N'*-tetrametiluronio (HATU, 151 mg, 0,30 mmol, 1,7 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (3 ml) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 60 ul) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10

30

min. Después se añadió bromhidrato de *N*-fluorenilmetil-oxicarbonil-1,2-diaminoetano (73 mg, 0,2 mmol, 1 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) y la solución resultante se agitó durante 10 min. La mezcla de reacción se filtró y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar **n.º B281** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 114,5 mg, rendimiento del 64 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 12,7 minutos (pureza del 99 %). IENEM (positivo) *m/z* 800,7 [M+H]<sup>+</sup>.

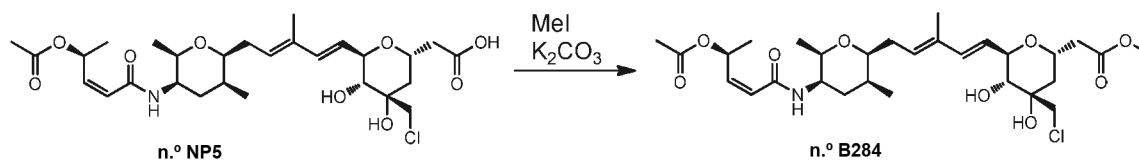
**Etapa 2.** Síntesis de (1*S*,5*R*)-5-((1*E*,3*E*)-5-((2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-(((2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-3-*C*-(clorometil)-2-deoxi-1-{2-[(2-((9*H*-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino)etil]amino]-2-oxoetil)-*D*-eritro-pentitol (**n.º B282**) Una solución de **n.º B281** (44,5 mg, 0,056 mmol) en tetrahydrofurano anhidro (0,4 ml) se mezcló con una solución de cloruro de litio (30,0 mg, 0,71 mmol) en ácido acético seco (0,2 ml). El reactivo se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar **n.º B282** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 48,0 mg, rendimiento del 100 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 16,0 minutos (pureza del 96 %). IENEM (positivo) *m/z* 836,7 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapa 3.** Síntesis de (1*S*,5*R*)-5-((1*E*,3*E*)-5-((2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-(((2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1-{2-[(2-aminoetil)amino]-2-oxoetil}-1,5-anhidro-3-*C*-(clorometil)-2-deoxi-*D*-eritro-pentitol (**n.º B283**) A una solución de **n.º B282** (48 mg, 0,057 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió piperidina (20 ul). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar **n.º B283** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 26,4 mg, rendimiento del 92 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 6,8 minutos (pureza del 91 %). IENEM (positivo) *m/z* 614,6 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapa 4.** Síntesis de (1*S*,5*R*)-5-((1*E*,3*E*)-5-((2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-(((2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-1-[2-({2-[(bromoacetil)amino]etil]amino)-2-oxoetil]-3-*C*-(clorometil)-2-deoxi-*D*-eritro-pentitol (**n.º B280**) A una solución de **n.º B283** (9,1 mg, 0,015 mmol) y 1-[(bromoacetil)oxi]pirrolidin-2,5-diona (6,2 mg, 0,024 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (base de Hunig, 5,0 ul). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar **n.º B280** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 5,8 mg, rendimiento del 53 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,0 minutos (pureza del 99 %). IENEM (positivo) *m/z* 736,6 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Ejemplo n.º A97

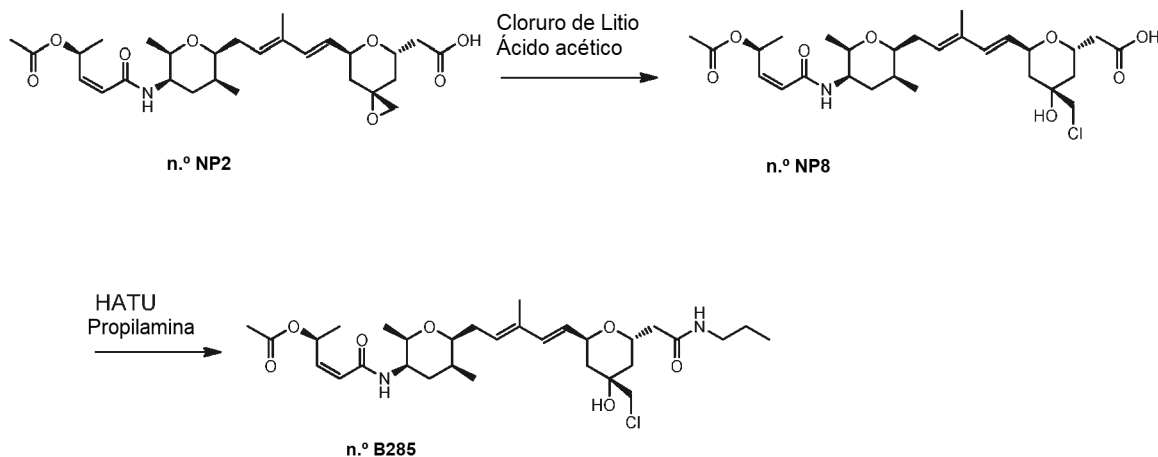
**Preparación de (1*S*,5*R*)-5-((1*E*,3*E*)-5-((2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-(((2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-3-*C*-(clorometil)-2-deoxi-1-(2-metoxi-2-oxoetil)-*D*-eritro-pentitol (**n.º B284**)**



**Etapa 1.** Síntesis de (1*S*,5*R*)-5-((1*E*,3*E*)-5-((2*S*,3*S*,5*R*,6*R*)-5-(((2*Z*,4*S*)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil) amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2*H*-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-3-*C*-(clorometil)-2-deoxi-1-(2-metoxi-2-oxoetil)-*D*-eritro-pentitol (**n.º B284**) A una suspensión de **n.º NP5** (6,2 mg, 0,011 mmol, 1 equiv.) y carbonato potásico (20,0 mg, 0,14 mmol, 12 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida (0,5 ml) se le añadió yoduro de metilo (20 ul, 0,32 mmol, 29 equiv.). La mezcla resultante se agitó a 0 grados durante 30 minutos. El sólido se retiró por filtración y el filtrado se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar **n.º B284** en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 5,6 mg, rendimiento del 90 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 12,7 minutos (pureza del 97 %). IENEM (positivo) *m/z* 586,4 [M+H]<sup>+</sup>.

## Ejemplo n.º A98

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((2S,4S,6S)-4-(clorometil)-4-hidroxi-6-[2-oxo-2-(propilamino)etil]tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B285)



5

*Etapa 1.* Síntesis de ácido [(2S,4S,6S)-6-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-4-(clorometil)-4-hidroxitetrahidro-2H-piran-2-il]acético (n.º NP8) Una solución de n.º NP2 (70,4 mg, pureza del 90 %, 0,19 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano anhidro (1,0 ml) se mezcló con una solución de cloruro de litio (50 mg, 1,2 mmol, 6 equiv.) en ácido acético seco (1,0 ml) a 0 °C. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y después a 40 grados durante 2 horas. El reactivo se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar n.º NP8 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 52,0 mg, rendimiento del 72 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 11,4 minutos (pureza del 98 %). IENEM (positivo)  $m/z$  556,2 [M+H]<sup>+</sup>.

10

*Etapa 2.* Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-((2S,4S,6S)-4-(clorometil)-4-hidroxi-6-[2-oxo-2-(propilamino)etil]tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il]-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo. (n.º B285) Una solución de n.º NP8 (5,0 mg, 0,009 mmol, 1 equiv.), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU, 5,2 mg, 0,014 mmol, 1,5 equiv.) y diisopropilietilamina (base de Hunig, 5,0 ul) en N,N-dimetilformamida anhidro (0,5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se añadió propilamina pura (5,0 ul, 0,08, 9 equiv.) y la solución se agitó durante 1 hora y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar n.º B285 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 4,2 mg, rendimiento del 90 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 11,8 minutos (pureza del 95 %). IENEM (positivo)  $m/z$  597,4 [M+H]<sup>+</sup>.

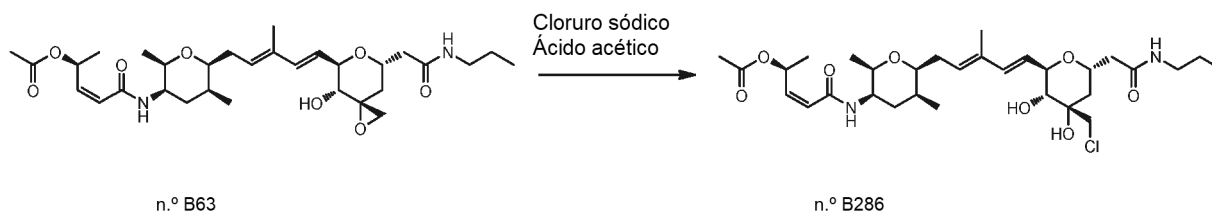
15

20

## Ejemplo n.º A99

Preparación de (1S,5R)-5-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-3-C-(clorometil)-2-deoxi-1-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-D-eritro-pentitol (n.º B286)

25



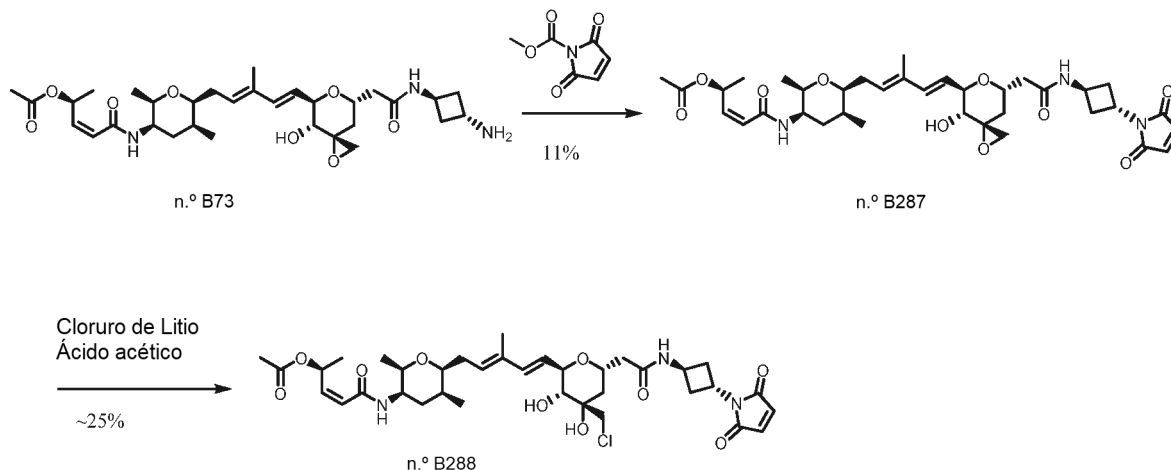
*Etapa 1.* Síntesis de (1S,5R)-5-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enil)amino)-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,5-anhidro-3-C-(clorometil)-2-deoxi-1-[2-oxo-2-(propilamino)etil]-D-eritro-pentitol (n.º B286) Una solución de n.º B63 (18,4 mg, 0,032 mmol, 1 equiv.) en tetrahidrofurano anhidro (1,0 ml) se mezcló con una suspensión de cloruro sódico (50,0 mg) en ácido acético seco (0,5 ml). Después, la solución se agitó a 50 °C durante 5 horas y se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar n.º B286 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 17,5 mg, rendimiento del 94 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,9 minutos (pureza del 97 %). IENEM (positivo)  $m/z$  613,6 [M+H]<sup>+</sup>.

30

35

## Ejemplo n.º A100

Preparación de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-[[trans-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)ciclobutil]amino}-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B287) y (1S,5R)-5-[(1E,3E)-5-[[[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,5-anhidro-3-C-(clorometil)-2-deoxi-1-(2-[[trans-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)ciclobutil]amino}-2-oxoetil)-D-eritro-pentitol (n.º B288)



**Etapa 1.** Síntesis de acetato de (2S,3Z)-5-[[[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-[[trans-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)ciclobutil]amino}-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino]-5-oxopent-3-en-2-ilo (n.º B287). A una solución de n.º B73 (32,5 mg, 0,05 mmol, 1 equiv.) en 1:2:3 dimetilsulfóxido/bicarbonato sódico saturado/agua (6 ml total) se le añadió *N*-metoxicarbonylmaleimida (45 mg, 0,29 mmol, 6 equiv.). Después la solución se agitó a 0 °C durante 1 hora. Los productos se extrajeron con acetato de etilo (10 ml). La capa orgánica se secó sobre cloruro de magnesio anhidro y después se evaporó a sequedad a presión reducida. El residuo se volvió a disolver en diclorometano (2 ml), y se añadió trietilamina (90 ul) y después se agitó a 40 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético y se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar n.º B287 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 4,3 mg, rendimiento del 11 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,1 minutos (pureza del 97 %). IENEM (positivo) *m/z* 684,4 [M+H]<sup>+</sup>.

**Etapa 2.** Síntesis de (1S,5R)-5-[(1E,3E)-5-[[[(2S,3S,5R,6R)-5-[(2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil] amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,5-anhidro-3-C-(clorometil)-2-deoxi-1-(2-[[trans-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)ciclobutil]amino}-2-oxoetil)-D-eritro-pentitol (n.º B288) Una solución de n.º B287 (2,7 mg,) en tetrahidrofurano anhidro (200 ul) se mezcló con una solución de cloruro de litio (13 mg) en ácido acético seco (200 ul) a 0 grados. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas y después se purificó usando cromatografía de fase inversa (Procedimiento F\*) para proporcionar n.º B288 en forma de un polvo de color blanco. Rendimiento: 0,8 mg, rendimiento del 26 %. HPLC (Protocolo N): tiempo de retención = 10,6 minutos (pureza del 92 %). IENEM (positivo) *m/z* 720,7 [M+H]<sup>+</sup>.

## Procedimientos de conjugación

**Procedimiento de conjugación general A:** El anticuerpo Herceptin disponible en el mercado (Genentech Inc) se dializa en una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). El anticuerpo dializado (5-10 mg/ml) se hizo reaccionar a continuación con *PL* (3-12) equivalentes de carga útil del enlazador (10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO)) que contiene el éster de *N*-hidroxisuccinimida reactivo a temperatura ambiente durante 2 h en tampón borato 50 mM a pH 8,7. En algunos casos, el tampón borato 50 mM a pH 8,7 está sustituido con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). En algunos casos, para mejorar la solubilidad/reactividad de la carga útil del enlazador, se añade dimetilacetamida (DMA) o DMSO para conseguir el 10-15 % (v/v) del componente disolvente orgánico total en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se intercambia después con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra a continuación y se intercambia el tampón en tampón de succinato sódico 10 mM. Trehalosa al 5,4 % a pH 5,1 usando columnas de intercambio de tampón Sephadex G-25 M de GE Healthcare según las instrucciones del fabricante. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIE NEM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

**Procedimiento de conjugación general A:** El anticuerpo Herceptin disponible en el mercado (Genentech Inc) o anticuerpos terapéuticos se dializan en tampón fosfato 50 mM a pH 6,8. El anticuerpo dializado (5-10 mg/ml) se hizo reaccionar con PL (4-12) equivalentes de carga útil del enlazador (5-30 mM en dimetilacetamida (DMA) o dimetilsulfóxido (DMSO)) que contiene el éster pentafluorofenilo reactivo a temperatura ambiente para 2-20 h en tampón fosfato 50 mM a pH 6,8. En algunos casos, para mejorar la solubilidad/reactividad de la carga útil del enlazador, se añade DMA o DMSO para conseguir el 10-15 % (v/v) del componente disolvente orgánico total en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se intercambia después con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra a continuación y se intercambia el tampón en tampón de succinato sódico 10 mM. Trehalosa al 5,4 % a pH 5,1 usando columnas de intercambio de tampón Sephadex G-25 M de GE Healthcare según las instrucciones del fabricante. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIEN EM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

**Procedimiento de conjugación general C:** El anticuerpo Herceptin disponible en el mercado (Genentech Inc) o anticuerpos terapéuticos se dializan en una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). El anticuerpo dializado se reduce con la adición de y (1-7) equivalentes de hidrócloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 5 mM en agua destilada) y se diluye a una concentración final de anticuerpo de 15 mg/ml usando DPBS, ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diildinitrilo)tetraacético 5 mM (EDTA), pH 7,0 (Tampón A). La reacción se incuba a 37 °C durante 2 h y después se enfría a temperatura ambiente. La conjugación se realizó mediante la adición de PL (2 a 15) equivalentes de la carga útil del enlazador (5-10 mM en dimetilacetamida (DMA) o dimetilsulfóxido (DMSO)). En algunos casos, para mejorar la solubilidad/reactividad de la carga útil del enlazador, se añade DMA o DMSO para conseguir un 10-15 % (v/v) de disolvente orgánico total en la mezcla de reacción final, y se añade el Tampón A para conseguir una concentración de anticuerpo final de 10 mg/ml. Después, la reacción se incuba durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra después si es necesario. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIEN EM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

**Procedimiento de conjugación general D:** El anticuerpo terapéutico se dializa en una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). El anticuerpo dializado se reduce con la adición de y (1-7) equivalentes de hidrócloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 5 mM en agua destilada) y se diluye a una concentración final de anticuerpo de 15 mg/ml usando DPBS, ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diildinitrilo)tetraacético 5 mM (EDTA), pH 7,0 (Tampón A). La reacción se incuba a 37 °C durante 2 h y después se enfría a temperatura ambiente. La conjugación se realizó mediante la adición de PL (2 a 15) equivalentes de la carga útil del enlazador (5-10 mM en dimetilacetamida (DMA)). En algunos casos, para mejorar la solubilidad/reactividad de la carga útil del enlazador, se añade DMA o DMSO para conseguir un 10-15 % (v/v) de disolvente orgánico total en la mezcla de reacción final, y 20X de tampón borato y DPBS se añade para conseguir una concentración de anticuerpo final de 10 mg/ml en tampón borato 50 mM a pH 8,7. La reacción se incuba durante 3 h a 37 °C o durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra después si es necesario. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIEN EM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

**Procedimiento de conjugación general E:** El anticuerpo terapéutico que lleva residuos de cisteína adicionales en relación con el anticuerpo nativo se dializa en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). El anticuerpo dializado se reduce con la adición de 100 equivalentes de hidrócloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 5 mM en agua destilada) y se diluye a una concentración final de anticuerpo de 15 mg/ml usando DPBS, ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diildinitrilo)tetraacético 5 mM (EDTA), pH 7,0 (Tampón A). Después, la reacción se incuba a temperatura ambiente durante 2 h y después se enfría a temperatura ambiente. Después de la reducción, se retira TCEP de la mezcla de reacción usando un dispositivo de ultrafiltración Millipore Amicon Ultra de 4 ml 50KD MWCO. La mezcla de reacción se concentra a 1/10 del volumen original cuatro veces y se vuelve a diluir al volumen original cada vez usando el Tampón A. En algunos casos, mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en Tampón A usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. Los procedimientos alternativos como la Filtración de flujo tangencial (TFF) o la diálisis también son



útiles en circunstancias particulares. Después de la reducción, los disulfuros de bisagra/internos del anticuerpo se vuelven a oxidar usando dehidroascorbato 1-1,5 mM (DHA) a temperatura ambiente durante una noche en Tampón A. Después de la oxidación, se retira DHA de la mezcla de reacción usando un dispositivo de ultrafiltración Millipore Amicon Ultra de 4 ml 50KD MWCO. La mezcla de reacción se concentra a 1/10 del volumen original cuatro veces y se vuelve a diluir al volumen original cada vez usando tampón borato 50 mM a pH 8,7. En algunos casos, la mezcla de reacción se intercambia posteriormente en tampón borato 50 mM a pH 8,7 usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. Los procedimientos alternativos, tal como la TFF o la diálisis también son útiles en circunstancias particulares. La conjugación se realiza mediante la adición de PL (3 a 12) equivalentes de la carga útil del enlazador (10 mM en dimetilacetamida (DMA)). En algunos casos, para mejorar la solubilidad/reactividad de la carga útil del enlazador, se añade DMA o DMSO para conseguir un 10-15 % (v/v) de disolvente orgánico total en la mezcla de reacción final, y 20X de tampón borato y DPBS se añade para conseguir una concentración de anticuerpo final de 5-10 mg/ml en tampón borato 50 mM a pH 8,7. La reacción se incuba durante 3 h a 37 °C o 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra después si es necesario. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIEN EM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

**Procedimiento de conjugación general F:** El anticuerpo terapéutico que lleva residuos de cisteína adicionales en relación con el anticuerpo nativo se dializa en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). El anticuerpo dializado se reduce con la adición de 100 equivalentes de hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 5 mM en agua destilada) y se diluye a una concentración final de anticuerpo de 15 mg/ml usando DPBS, ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diildinitrilo)tetraacético 5 mM (EDTA), pH 7,0 (Tampón A). Después, la reacción se incuba a temperatura ambiente durante 2 h y después se enfría a temperatura ambiente. Después de la reducción, se retira TCEP de la mezcla de reacción usando un dispositivo de ultrafiltración Millipore Amicon Ultra de 4 ml 50KD MWCO. La mezcla de reacción se concentra a 1/10 del volumen original cuatro veces y se vuelve a diluir al volumen original cada vez usando el Tampón A. En algunos casos, mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en Tampón A usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. Los procedimientos alternativos como la Filtración de flujo tangencial (TFF) o la diálisis también son útiles en circunstancias particulares. Después de la reducción, los disulfuros de bisagra/internos del anticuerpo se vuelven a oxidar usando dehidroascorbato 1-1,5 mM (DHA) a temperatura ambiente durante una noche en Tampón A. Después de la oxidación, se retira DHA de la mezcla de reacción usando un dispositivo de ultrafiltración Millipore Amicon Ultra de 4 ml 50KD MWCO. La mezcla de reacción se concentra a 1/10 del volumen original cuatro veces y se vuelve a diluir al volumen original cada vez usando el Tampón A. En algunos casos, mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en Tampón A usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. Los procedimientos alternativos como la Filtración de flujo tangencial (TFF) o la diálisis también son útiles en circunstancias particulares. La conjugación se realiza mediante la adición de PL (2 a 15) equivalentes de la carga útil del enlazador (5-10 mM en dimetilacetamida (DMA) o dimetilsulfóxido (DMSO)). En algunos casos, para mejorar la solubilidad/reactividad de la carga útil del enlazador, se añade DMA o DMSO para conseguir un 10-15 % (v/v) de disolvente orgánico total en la mezcla de reacción final, y se añade el Tampón A para conseguir una concentración de anticuerpo final de 5-10 mg/ml. La reacción se incuba durante 1-2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra después si es necesario. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIEN EM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

**Procedimiento de conjugación general G:** Las reacciones de conjugación se realizan en la parte superior de un dispositivo de ultrafiltración centrífuga, como los filtros Amicon Ultra 50k Ultracel (n.º de parte UFC805096, GE). Se prepara una solución madre 132 mM de L-cisteína en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza), ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diildinitrilo)tetraacético 5 mM (EDTA), pH 7,0 (Tampón A). Esta solución (50 µl) se añade a una mezcla del anticuerpo mutante respectivo que lleva residuos de cisteína adicionales (5 mg) en 950 µl de Tampón A. La concentración final de cisteína en la mezcla de reacción es 6,6 mM. Después de dejar que la reacción permanezca a temperatura ambiente durante 1,5 horas, el tubo de reacción se centrifuga para concentrar el material a aproximadamente 100 µl. La mezcla se diluye a 1 ml con Tampón A. Este procedimiento se repite 4 veces para retirar todo el reductor de cisteína. El material resultante se diluye a 1 ml en tampón A y se trata con 16 µl de una solución 5 mM de la carga útil del enlazador de maleimida (en dimetilacetamida (DMA) (aproximadamente 5 equivalentes)). Después de dejar reposar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, el tubo de reacción se centrifuga para concentrar el material a aproximadamente 100 µl. La mezcla se diluye a 1 ml con DPBS. La mezcla

de reacción se intercambia posteriormente con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra después si es necesario. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIEN EM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

**Procedimiento de conjugación general H:** El anticuerpo terapéutico que lleva residuos de glutamina reactivos con la enzima transglutamina se dializa en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). La conjugación mediada por transglutaminasa se lleva a cabo mezclando 0,5-5,0 mg/ml de anticuerpo que contiene glutamina transglutaminasa reactiva en tampón Tris 25 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, glutatión reducido 0,31 mM con un exceso molar de 5,0-20,0 veces de enlazador de aminoalquilo portador de carga útil (5-10 mM en dimetilacetamida (DMA) o dimetilsulfóxido (DMSO) y 2 % p/v de transglutaminasa (Ajinomot Activa TI). Después, la reacción se incuba de 4-16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra después si es necesario. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIEN EM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

**Procedimiento de conjugación general I:** El mutante de anticuerpo terapéutico que lleva residuos de cisteína adicionales en relación con el anticuerpo nativo se dializa en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Lonza). El anticuerpo dializado se reduce con la adición de  $x$  (25-100) equivalentes de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 5 mM en agua destilada) y se diluye a una concentración final de anticuerpo de 15 mg/ml usando DPBS, ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diildinitrilo)tetraacético 5 mM (EDTA), pH 6,5-7,4 (Tampón A). Después, la reacción se incuba a temperatura ambiente durante 1-2 h y después se enfría a temperatura ambiente. Después de la reducción, se retira TCEP de la mezcla de reacción usando un dispositivo de ultrafiltración Millipore Amicon Ultra de 4 ml 50KD MWCO. La mezcla de reacción se concentra a 1/10 del volumen original cuatro veces y se vuelve a diluir al volumen original cada vez usando el Tampón A. En algunos casos, mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en Tampón A usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. Después de la reducción, los disulfuros de bisagra/internos del anticuerpo se vuelven a oxidar usando dehidroascorbato 1 mM (DHA) a temperatura ambiente durante una noche en Tampón A. Después de la oxidación, se retira DHA de la mezcla de reacción usando un dispositivo de ultrafiltración Millipore Amicon Ultra de 4 ml 50KD MWCO. La mezcla de reacción se concentra a 1/10 del volumen original cuatro veces y se volvió a diluir al volumen original cada vez usando Tampón A. La conjugación se realiza mediante la adición de PL (2 a 10) equivalentes de la carga útil (5-10 mM en dimetilacetamida (DMA) o dimetilsulfóxido (DMSO)). En algunos casos, para mejorar la solubilidad/reactividad de la carga útil del enlazador, se añade DMA o DMSO para conseguir un 10-15 % (v/v) de disolvente orgánico total en la mezcla de reacción final, y se añade el Tampón A para conseguir una concentración de anticuerpo final de 5-10 mg/ml. La reacción se incuba durante 1-4 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se intercambia posteriormente con tampón en DPBS (pH 7,4) usando columnas de intercambio de tampón GE Healthcare Sephadex G-25 M según las instrucciones del fabricante. El material en bruto se purifica por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un sistema GE AKTA Explorer con una columna GE Superdex 200 y eluyente DPBS (pH 7,4). La fracción monomérica agrupada de AKTA se concentra después si es necesario. El ADC se caracteriza adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para espectrometría de masas en tándem por ionización por electronebulización de cromatografía de pureza y cromatografía líquida (CLIEN EM) para calcular la relación fármaco-anticuerpo (carga). La concentración de proteína se determina mediante espectrofotómetro UV.

#### Condiciones de SEC y HPLC-IEN EM usadas para el análisis de conjugados:

##### Protocolo 1:

**Protocolo 1 (SEC):** Columna: Columna: TSK-gel G3000SWxl, 300 x 7,8 mm, 10  $\mu$ m; Fase móvil: solución salina tamponada con fosfato (PBS, 1X), pH 7,4 con acetonitrilo al 2 %; Isocrático; Caudal: 1 ml/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Volumen de inyección: 5  $\mu$ l; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

**Protocolo 1b:** Columna: Superdex 200 5/150 GL, 5 x 150 mm, 13  $\mu$ m; Fase móvil: solución salina tamponada con fosfato (PBS, 1X), pH 7,4 con acetonitrilo al 2 %; Isocrático; Caudal: 1 ml/minuto. Temperatura: temperatura ambiente; Volumen de inyección: 5  $\mu$ l; Instrumento: Agilent 1100 HPLC.

**Protocolo 2:** **Protocolo 2 (HPLC):** Columna: Columna: Agilent Poroshell 300SB-C8, 75 x 2,1 mm, 2,6  $\mu$ m; Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en agua (v/v); Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (v/v); Gradiente: B al 20 % a B al 45 % durante 4 minutos; Caudal: 1,0 ml/minuto. Temperatura: 60 °C; Detección: 220

nm; EM (+) intervalo 400-2000Da; Volumen de inyección: 10 µl; Instrumento: Agilent 1100 LC, Waters MicromassZQ MS. la deconvolución se realizó usando MaxEnt1. Las muestras se trataron con 100 veces el exceso de clorhidrato de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) o ditiotreitól (DTT) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente antes de la inyección.

- 5 **Protocolo 3:** Columna: Aquity UPLC BEH 200 SEC 1,7µm; Fase móvil: NaCl 450 mM; Caudal: 0,5 ml/minuto. Temperatura: 35 °C; Volumen de inyección: 10 µl.

#### Estudios *in vitro* e *in vivo* con trastuzumab

Se observa que para los siguientes estudios, el trastuzumab en ausencia de agentes citotóxicos conjugados no muestra potencia *in vitro* significativa o eficacia *in vivo* a concentraciones equivalentes de anticuerpos.

#### 10 Procedimiento de ensayo de células *in vitro*

Las células que expresan (BT474 (cáncer de mama), N87 (cáncer gástrico), HCC1954 (cáncer de mama), MDA-MB-361-DYT2 (cáncer de mama) o no expresadoras (MDA-MB-468) se sembraron en placas de 96 pocillos de cultivo celular durante 24 horas antes del tratamiento. Las células se trataron con conjugados de anticuerpo-fármaco 3 veces diluidos en serie o compuestos libres (es decir, sin anticuerpo conjugado con el fármaco) por duplicado a 10 concentraciones. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation MTS (Promega, Madison WI) 96 horas después del tratamiento. La viabilidad celular relativa se determinó como porcentaje de control no tratado. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon usando un modelo logístico de cuatro parámetros n.º 203 con XLfit v4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, UK). Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 9. La potencia varió hacia arriba desde 0,0002 nM. La prueba en otras líneas celulares se indica en la Tabla 9A. Se emplearon procedimientos y técnicas similares.

#### Modelo de xenoinjerto de tumor N87 *in vivo* (Fig. 3 y 4)

Se realizaron estudios de eficacia *in vivo* de conjugados de anticuerpo-fármaco con modelos de xenoinjerto que expresan el objetivo usando las líneas celulares N87. Para el estudio de eficacia, se implantan 7,5 millones de células tumorales en Matrigel al 50 % por vía subcutánea en ratones desnudos de 6-8 semanas de edad hasta que los tamaños del tumor alcancen entre 250 y 350 mm<sup>3</sup>. La dosificación se realiza a través de una inyección en bolo en la vena de la cola. Dependiendo de la respuesta del tumor al tratamiento, a los animales se les inyectan 1-10 mg/kg de conjugados de fármaco de anticuerpo tratados cuatro veces cada cuatro días. Todos los animales experimentales son monitoreados por cambios de peso corporal semanalmente. El volumen del tumor se mide dos veces por semana durante los primeros 50 días y una vez por semana con un dispositivo Caliper y se calcula con la siguiente fórmula: Volumen del tumor = (longitud x anchura<sup>2</sup>)/2. Los animales son sacrificados por humanos antes de que sus volúmenes tumorales alcancen los 2500 mm<sup>3</sup>. Se observa que el tamaño del tumor disminuye después de la primera semana de tratamiento. Los animales pueden ser monitoreados continuamente para el recrecimiento tumoral después del tratamiento.

Los resultados de la prueba de los ADC 3, 4 y 5 y los ADC 14 y 15 en el modelo de selección *in vivo* de xenoinjerto de ratón N87 se muestran en las Figuras 3 y 4.

La Tabla 1 proporciona los detalles de preparación para los Ejemplos n.º B82 - n.º B108.

La Tabla 2 proporciona los datos de caracterización para los Ejemplos n.º B82 - n.º B108.

La Tabla 3 proporciona la preparación de enlazadores de carga útil n.º B109 - n.º B 117.

La Tabla 4 muestra datos de citotoxicidad *in vitro* para productos naturales y análogos sintéticos.

40 La Tabla 5 proporciona los datos de caracterización para los enlazadores de carga útil n.º B109 - n.º B117.

La Tabla 6 proporciona la estructura de los ADC y los enlazadores de carga útil usados para prepararlos.

La Tabla 7 proporciona procedimientos generales de preparación de ADC ejemplificados.

La Tabla 8 proporciona datos analíticos para los ADC ejemplificados.

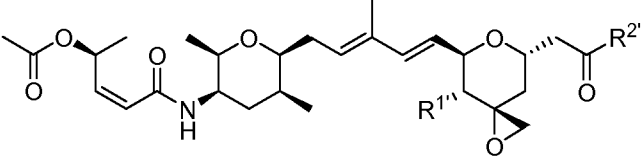
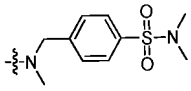
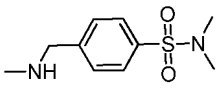
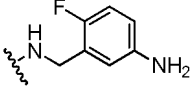
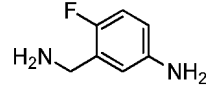
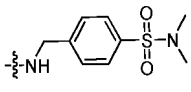
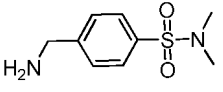
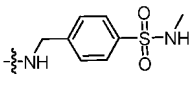
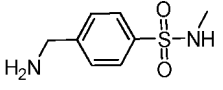
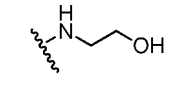
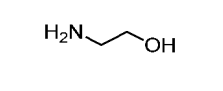
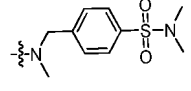
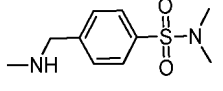
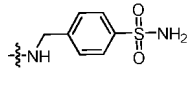
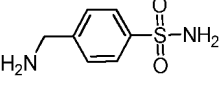
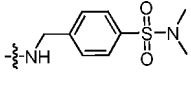
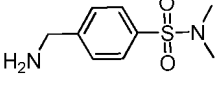
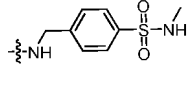
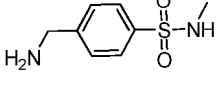
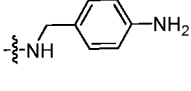
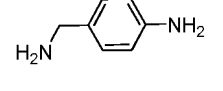
La Tabla 9 muestra la Tabla 9: Datos de citotoxicidad *in vitro* para ADC.

45

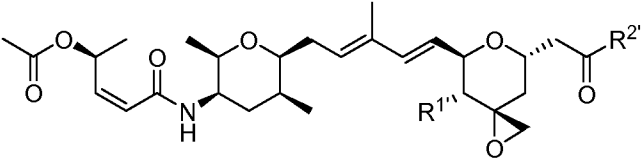
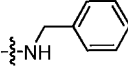
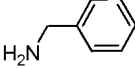
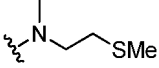
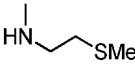
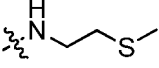
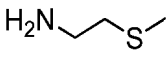
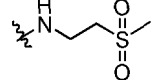
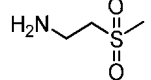
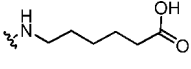
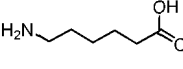
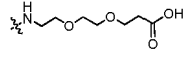
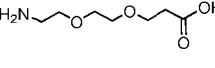
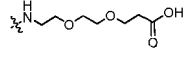
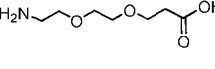
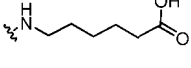
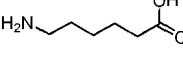
## Tablas

Tabla 1: Detalles de preparación para los Ejemplos n.º B82 - n.º B108					
EJ. n.º	R <sup>1'</sup>	R <sup>2'</sup>	Amina de partida	Procedimiento de preparación; Materiales de partida no disponibles comercialmente	Procedimiento de purificación; Cantidad fabricada; Rendimiento
n.º B82	OH			Procedimiento general F; (n.º B1)	Procedimiento D*; 1,5 mg; 67 %
n.º B83	OH			Procedimiento general F; (n.º B1)	Procedimiento D*; 8,4 mg; 40 %
n.º B84	OH			Procedimiento general F; (n.º B1)	Procedimiento D*; 9 mg; 40 %
n.º B85	OH			Procedimiento general F; (n.º B1)	Procedimiento D*; 14,6 mg; 69 %
n.º B86	OH			Procedimiento general B <sup>1</sup> ; (n.º B1)	Procedimiento E; 5,9 mg; 22 %
n.º B87	H			Procedimiento general B <sup>1</sup> ; (n.º B2)	Procedimiento A; 14 mg; 56 %
n.º B88	OH			Procedimiento general F; (n.º B1)	Procedimiento D*; 17,7 mg; 77 %
n.º B89	OH			Procedimiento general F; (n.º B1)	Procedimiento D*; 9,6 mg; 48 %
n.º B90	H			Procedimiento general B <sup>2</sup> ; (n.º B2)	Procedimiento A; 17 mg; 29 %

(continuación)

Tabla 1: Detalles de preparación para los Ejemplos n.º B82 - n.º B108					
					
EJ. n.º	R <sup>1'</sup>	R <sup>2'</sup>	Amina de partida	Procedimiento de preparación; Materiales de partida disponibles comercialmente	Procedimiento de purificación; Cantidad fabricada; Rendimiento
n.º B91	OH			Procedimiento general D; (n.º B1)	Procedimiento D*; 19 mg; 63 %
n.º B92	OH			Procedimiento general D; (n.º B1)	Procedimiento D*; 11,2 mg; 53 %
n.º B93	OH			Procedimiento general D; (n.º B1)	Procedimiento D*; 9,6 mg; 33 %
n.º B94	OH			Procedimiento general D; (n.º B1)	Procedimiento D*; 9,7 mg; 33 %
n.º B95	H			Procedimiento general E; (n.º NP2)	Procedimiento D*; 1,6 mg; 3,7 %
n.º B96	H			Procedimiento general D; (n.º B2)	Procedimiento D*; 18,3 mg; 60 %
n.º B97	H			Procedimiento general D; (n.º B2)	Procedimiento D*; 15,3 mg; 53 %
n.º B98	H			Procedimiento general D; (n.º B2)	Procedimiento D*; 14,7 mg; 49 %
n.º B99	H			Procedimiento general D; (n.º B2)	Procedimiento D*; 16,4 mg; 55 %
n.º B100	H			Procedimiento general D; (n.º B2)	Procedimiento D*; 2,0 mg; 8 %

(continuación)

Tabla 1: Detalles de preparación para los Ejemplos n.º B82 - n.º B108					
					
EJ. n.º	R <sup>1'</sup>	R <sup>2'</sup>	Amina de partida	Procedimiento de preparación; Materiales de partida disponibles comercialmente	Procedimiento de purificación; Cantidad fabricada; Rendimiento
n.º B10 1	H			Procedimiento general D; (n.º B2)	Procedimiento D <sup>1</sup> ; 5,7 mg; 22 %
n.º B10 2	H			Procedimiento general E; (n.º NP2)	Procedimiento D <sup>1</sup> ; 20 mg; 42 %
n.º B10 3	H			Procedimiento general E; (n.º NP2)	Procedimiento A 26 mg; 68 %
n.º B10 4	H			Procedimiento general B; (n.º B2)	Procedimiento A 11,3 mg; 58 %
n.º B10 5	OH			Procedimiento general A; (n.º B1)	Procedimiento A; 14 mg; 65 %
n.º B10 6	OH			Procedimiento general B; (n.º B1)	Procedimiento A <sup>3</sup> 15,3 mg; 63 %
n.º B10 7	H			Procedimiento general B; (n.º B2)	Procedimiento A; 32 mg; 66 %
n.º B10 8	H			Procedimiento general B; (n.º B2)	Procedimiento A; 17 mg; 73 %

<sup>1</sup>Se disolvió amina en metanol y se basó en un exceso de *N,N*-diisopropiletilamina. Se añadió la mezcla entera a la reacción.

<sup>2</sup>La amina de partida se preparó como se describe en Eur. Pat. Appl. (1996), EP 694536 A1 19960131

<sup>3</sup>Las fracciones de HPLC se neutralizaron con hidróxido de amonio y después se liofilizaron

Tabla 2: Datos de caracterización para los Ejemplos n.º B82 - n.º B108		
Ej. n.º	Espectro de masas: CL-EM o HPLC m/z observado y tiempo de retención en minutos	Nombre IUPAC
n.º B82	HPLC (Protocolo G); m/z 623,6 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,56 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-(2-(metil[2-(metilsulfanil)etil]amino)-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B83	HPLC (Protocolo B); m/z 654,6 [M+H] <sup>+</sup> ; (1,91 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-(2-((3-(metilamino)encil]amino)-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-pira n-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B84	HPLC (Protocolo B); m/z 658,6 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,29 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-2-((4-amino-2-fluorobencil]amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B85	HPLC (Protocolo B); m/z 658,34 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,35 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-2-((4-amino-3-fluorobencil]amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B86	HPLC (Protocolo G); m/z 660,65 [M+H] <sup>+</sup> ; (1,96 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-2-([trans-4-(dimetilamino)ciclohexil]amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro [2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B87	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (7,036 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 644,9 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,65 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-2-([trans-4-(dimetilamino)ciclohexil]amino)-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B88	HPLC (Protocolo B); m/z 708,66 [M+H] <sup>+</sup> ; (3,41 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-(2c-[[4-amino-3-(trifluorometil)encil]amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5] oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B89	HPLC (Protocolo B); m/z 640,62 [M+H] <sup>+</sup> ; (1,89 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-2-((3-aminobencil]amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B90	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (6,892 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 644,2 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,68 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-2-([cis-4-(dimetilamino)ciclohexil]amino)-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B91	HPLC (Protocolo B); m/z 746,5 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,79 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-2-([4-(dimetilsulfamoil)encil](metil)amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B92	HPLC (Protocolo B); m/z 658,62 [M+H] <sup>+</sup> ; (1,98 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-2-((5-amino-2-fluorobencil]amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B93	HPLC (Protocolo B); m/z 732,4 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,65 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-2-([4-(dimetilsulfamoil)encil]amino)-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B94	HPLC (Protocolo B); m/z 718,4 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,48 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-(((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-4-hidroxi-7-(2-([4-(metilsulfamoil)encil]amino)-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo

(continuación)

<b>Tabla 2: Datos de caracterización para los Ejemplos n.º B82 - n.º B108</b>		
<b>EJ. n.º</b>	<b>Espectro de masas: CL-EM o HPLC m/z observado y tiempo de retención en minutos</b>	<b>Nombre IUPAC</b>
n.º B95	HPLC (Protocolo K); (5,27 minutos); <i>m/z</i> 563,4 [M+H] <sup>+</sup>	acetato de ((2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-{2-[(2-hidroxi)etil]amino}-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B96	HPLC (Protocolo B); <i>m/z</i> 730,5 [M+H] <sup>+</sup> ; (3,17 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-[[4-(dimetilsulfamoil)encil](metil)amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B97	HPLC (Protocolo B); <i>m/z</i> 688,5 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,67 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-[(3S,5S,7S)-7-{2-oxo-2-[(4-sulfamoil)encil]amino]etil}-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B98	HPLC (Protocolo B); <i>m/z</i> 716,5 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,97 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-[[4-(dimetilsulfamoil)encil]amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B99	HPLC (Protocolo B); <i>m/z</i> 702,4 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,79 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-[[2-(metilsulfonil)etil]amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B100	HPLC (Protocolo B); <i>m/z</i> 624,4 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,10 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-2-[(4-aminobencil)amino]-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B101	HPLC (Protocolo B); <i>m/z</i> 609,4 [M+H] <sup>+</sup> ; (3,1 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-6-[(2E,4E)-5-[(3S,5S,7S)-7-2-(bencilamino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B102	HPLC (Protocolo K); (6,6 minutos); <i>m/z</i> 607,5 [M+H] <sup>+</sup>	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-{metil[2-(metilsulfonil)etil]amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B103	CLEM (Protocolo D); <i>m/z</i> 593,1 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,88 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-[[2-(metilsulfonil)etil]amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B104	CLEM (Protocolo D) <i>m/z</i> 625,5 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,80 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-[(2R,3R,5S,6S)-2,5-dimetil-6-[(2E,4E)-3-metil-5-[(3S,5S,7S)-7-(2-[[2-(metilsulfonil)etil]amino]-2-oxoetil)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]penta-2,4-dien-1-il]tetrahidro-2H-piran-3-il]amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B105	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (5,75 minutos); CLEM (Protocolo I); <i>m/z</i> 649,6 [M+H] <sup>+</sup> ; (2,52 minutos)	ácido 6-(((3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil)amino)hexanoico
n.º B106	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (7,514 minutos); CLEM (Protocolo D); <i>m/z</i> 695,2 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,74 minutos)	ácido 3-[2-[2-(((3R,5S,7R,8R)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-8-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]octil]acetil)amino)etoxi]etoxi]propanoico
n.º B107	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (8,084 minutos); CLEM (Protocolo D); <i>m/z</i> 679,2 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,79 minutos)	ácido 3-[2-[2-(((3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil)amino)etoxi]etoxi]propanoico
n.º B108	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (7,603 minutos); CLEM (Protocolo D); <i>m/z</i> 633,1 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,81 minutos)	ácido 6-(((3S,5S,7S)-7-[(1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metilpenta-1,3-dien-1-il]-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]acetil)amino)hexanoico



Tabla 3: Preparación de enlazadores de carga útil n.º B109 - n.º B117					
Ej. n.º	R1'	R2'	Material de partida	Procedimiento de preparación;	de Procedimiento de purificación; Cantidad fabricada; Rendimiento
n.º B109	H		NP2	Procedimiento general C	Procedimiento A; 47 mg; 89 %
n.º B110	OH		n.º B105	Procedimiento general C	Procedimiento A; 8,9 mg; 48 %
n.º B111	OH		n.º B105	Procedimiento general A	Procedimiento A; 9,0 mg; 70 %
n.º B112	OH		n.º B106	Procedimiento general C <sup>1</sup>	Procedimiento A; 9,9 mg; 52 %
n.º B113	H		n.º B108	Procedimiento general C	Procedimiento C*; 11 mg; 44 %
n.º B114	H		n.º B108	Procedimiento general A	Procedimiento A; 4,5 mg; 16 %
n.º B115	OH		n.º B106	Procedimiento general A	Procedimiento A; 16 mg; 60 %
n.º B116	H		n.º B107	Procedimiento general A	Procedimiento A; 10,6 mg; 62 %
n.º B117	H		n.º B107	Procedimiento general C	Procedimiento C*; 12 mg; 42 %

<sup>1</sup>La reacción se neutralizó con TEA antes de la purificación por HPLC.

<b>Tabla 4: Datos de citotoxicidad in vitro para productos naturales y análogos sintéticos</b>				
EJ. n.º	N87 Cl <sub>50</sub> (nM)	BT474 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-361-DYT2 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-468 Cl <sub>50</sub> (nM)
n.º NP1	61,646	144,997	160,284	141,671
n.º NP2	2,51	5,12	8,496	3,388
n.º NP5	>100	>100		>100
n.º NP6	>100	>100		>100
n.º NP7	>100	>100		>100
n.º NP8	0,643	1,941		1,351
n.º NP9	74,291	65,78		59,246
n.º NP11	3,665	3,719	4,156	1,555
n.º NP12	13,85	5,02	4,91	
n.º B4	>100	>100	>100	>100
n.º B6	5,66	16,5	25,4	7,97
n.º B7	0,344	1,12	1,88	
n.º B8	10,7	14,1	25,5	
n.º B9	1,34	3,26	5,26	
n.º B10	12,1	43,5	77,5	
n.º B11	1,61	3,42	6,71	
n.º B12	54,57	55,52	87,84	
n.º B13	0,99	0,68	1,93	
n.º B15	0,203	0,522	0,537	0,363
n.º B16	16,8	76,1	>100	36,8
n.º B22	4,23	1,76	7,46	
n.º B39	4,65	3,4	7,67	
n.º B40	6,76	1,86	5,84	
n.º B55	0,822	0,879	1,256	
n.º B63	1,103	0,651	0,293	0,348
n.º B64	24,82	5,26		1,38
n.º B66	1,578	0,18		0,27
n.º B71	0,451	1,076	1,362	
n.º B72	0,481	0,607	1,156	
n.º B73	173,983	296,342	442,575	275,769
n.º B76	330,871	340,877	884,901	271,599
n.º B79	0,423	0,723	1,313	
n.º B81	70,686	>100	>100	>100
n.º B82	0,12	0,288	0,251	

(continuación)

<b>Tabla 4: Datos de citotoxicidad in vitro para productos naturales y análogos sintéticos</b>				
EJ. n.º	N87 Cl <sub>50</sub> (nM)	BT474 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-361-DYT2 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-468 Cl <sub>50</sub> (nM)
n.º B83	1,05	1,45	2,59	
n.º B84	2,54	2,53	8,27	
n.º B85	1,56	1,47	5,5	
n.º B86	14	20,1	73,3	
n.º B87	0,744	1,21	3,47	
n.º B88	0,73	1,8	2,96	
n.º B89	1,91	3,56	7,99	
n.º B90	0,87	1,26	3,9	
n.º B91	0,783	3,02	3,78	
n.º B92	1,5	2,28	6,18	
n.º B93	0,647	2,27	3,96	
n.º B94	4,9	18,6	37,4	
n.º B95	1,06	1,28	11,1	
n.º B96	12,3	22,9	31,5	
n.º B97	5,09	8,83	41,6	
n.º B98	2,55	5,75	8,7	
n.º B99	3,28	7,87	21,5	
n.º B100	5,05	10,6	16,9	
n.º B101	10,4	25,6	34,8	
n.º B102	7,79	10,7	32,9	
n.º B103	1,6	4,03	4,25	
n.º B104	1,41	4,02	9,13	
n.º B129	>100,000	>100,000	>100,000	
n.º B130	2,984	1,5	4,503	
n.º B134	1,799	1,181	2,023	
n.º B136	90,149	25,451	>100,000	
n.º B137	5,589	1,796	10,266	
n.º B139	6,511	5,491	13,366	
n.º B140	1,012	0,517	0,632	
n.º B141	10,981	10,864	12,75	
n.º B142	11,228		55,54	
n.º B143	2,428		9,508	
n.º B144	0,982		6,1	
n.º B145	0,408		2,026	

(continuación)

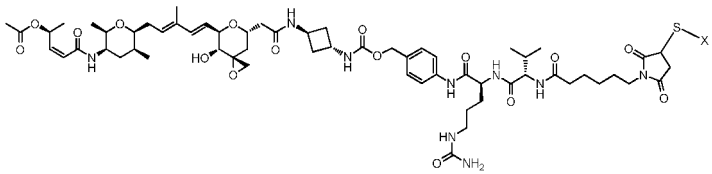
<b>Tabla 4: Datos de citotoxicidad in vitro para productos naturales y análogos sintéticos</b>				
EJ. n.º	N87 Cl <sub>50</sub> (nM)	BT474 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-361-DYT2 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-468 Cl <sub>50</sub> (nM)
n.º B147	9,918	6,812	17,166	
n.º B148	47,42	40,779	>100,000	64,434
n.º B149	>100,000		>100,000	
n.º B173	6,377	3,642	29,134	7,851
n.º B177	1,609		5,646	
n.º B179	0,299		1,286	
n.º B209	60,555		>100,000	
n.º B229	3,597		9,143	
n.º B235	16,421		36,822	
n.º B240	9,794		5,054	
n.º B241	21,341		43,617	
n.º B242	0,570		3,761	
n.º B264	>100,000		>100,000	
n.º B265	10,200		8,669	
n.º B266	28,389		>100,000	
n.º B267	3,438		23,780	
n.º B271	>100,000		>100,000	
n.º B272	>100,000		>100,000	
n.º B273	600,376		>1000,000	
n.º B275	5,335		22,231	
n.º B284	1,301		2,032	
n.º B285	7,608		11,666	
n.º B286	0,387		1,109	

<b>Tabla 5: Datos de caracterización para los Ejemplos n.º B109 - n.º B117</b>		
Ej. n.º	Espectro de masas: CL-EM o HPLC m/z observado y tiempo de retención en minutos	Nombre IUPAC
n.º B109	HPLC (Protocolo E); (8,993 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 686,2 [M+H] <sup>+</sup> ; (1,11 minutos)	[(3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-[(2S,3S,5R,6R)-5-[[2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil]amino]-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-yl]-3-metilpenta-1,3-dien-1-yl)-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-yl]acetato de pentafluorofenilo

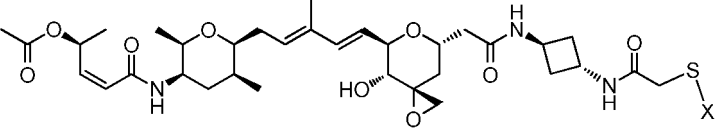
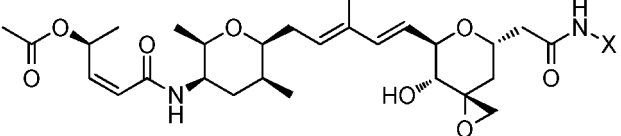
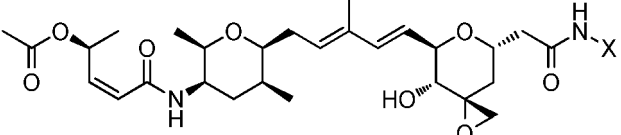
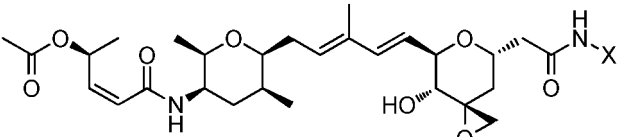
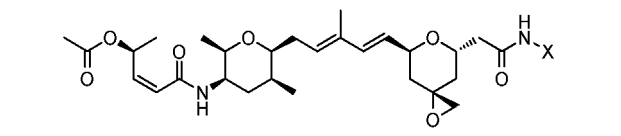
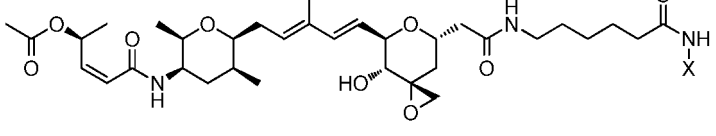
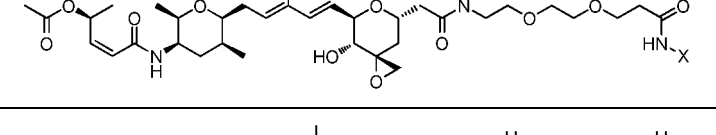
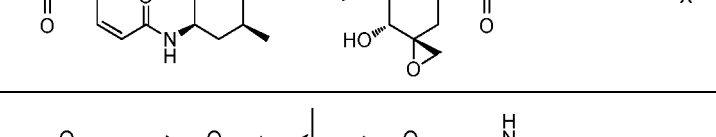
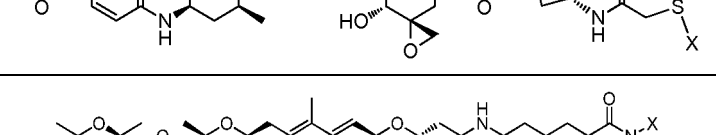
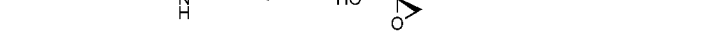
(continuación)

Tabla 5: Datos de caracterización para los Ejemplos n.º B109 - n.º B117		
Ej. n.º	Espectro de masas: CL-EM o HPLC m/z observado y tiempo de retención en minutos	Nombre IUPAC
n.º B110	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (9,930 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 815,2 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,99 minutos)	6-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((25,3S,5R,6R)-5-(((2Z, 4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il) acetil)amino)hexanoato de pentafluorofenilo
n.º B111	HPLC (Protocolo A <sup>B</sup> ); (11,19 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 746,2 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,80 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-[2-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)amino)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B112	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (9,564 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 883,1[M+Na] <sup>+</sup> ; (0,94 minutos)	3-{2-[2-(((3R,5S,7R,8R)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-8-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]octil)acetil)amino)etoxi]etoxi}propanoato de pentafluorofenilo
n.º B113	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (10,652 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 799,1[M+H] <sup>+</sup> ; (1,03 minutos)	6-(((3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-((25,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)acetil)amino)hexanoato de pentafluorofenilo
n.º B114	CLEM (Protocolo D); m/z 730,3 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,88 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-[2-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)amino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaespiro[2.5] oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B115	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (8,082 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 792,1 [M+H] <sup>+</sup> ; (0,81 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3R,4R,5R,7S)-7-(2-[2-(2-{3-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-3-oxopropoxi]etoxi)etil)amino)-2-oxoetil]-4-hidroxi-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B116	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (8,580 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 776,1[M+H] <sup>+</sup> (0,83 minutos)	acetato de (2S,3Z)-5-((2R,3R,5S,6S)-6-((2E,4E)-5-((3S,5S,7S)-7-(2-[2-(2-{3-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-3-oxopropoxi]etoxi)etil)amino)-2-oxoetil]-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)-3-metilpenta-2,4-dien-1-il)-2,5-dimetiltetrahydro-2H-piran-3-il)amino)-5-oxopent-3-en-2-ilo
n.º B117	HPLC (Protocolo A <sup>A</sup> ); (10,282 minutos); CLEM (Protocolo D); m/z 845,9 [M+H] <sup>+</sup> ; (1,0 minutos)	3-{2-[2-(((3S,5S,7S)-7-((1E,3E)-5-((2S,3S,5R,6R)-5-(((2Z,4S)-4-(acetiloxi)pent-2-enoil)amino)-3,6-dimetiltetrahydro-2H-piran-2-il)-3-metilpenta-1,3-dien-1-il)-1,6-dioxaespiro[2.5]oct-5-il)acetil)amino)etoxi]etoxi}propanoato de pentafluorofenilo

Tabla 6: Estructura de ADC y enlazadores de carga útil usados para prepararlos

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC1		n.º B75

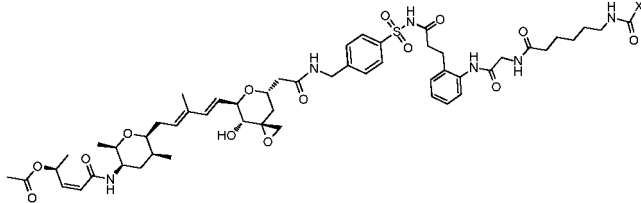
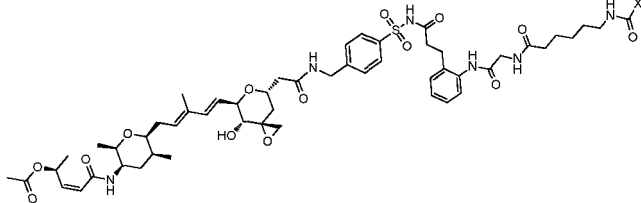
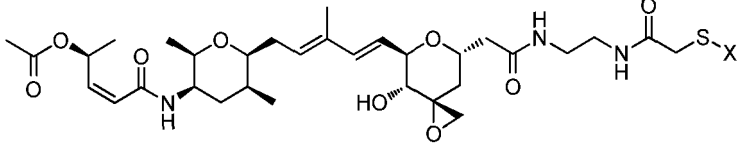
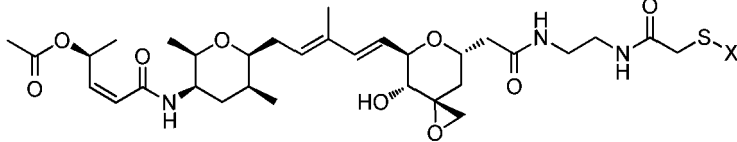
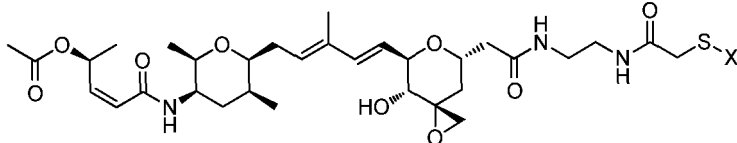
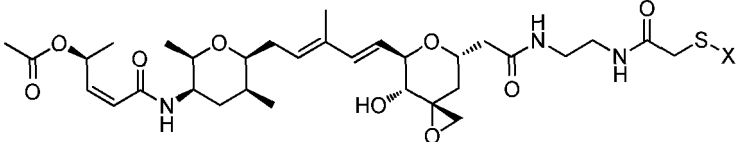
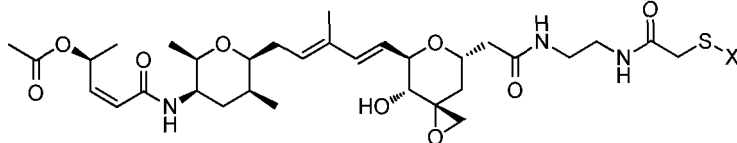
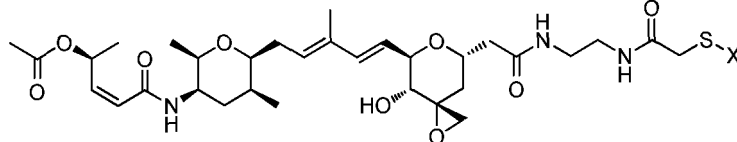
(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC2		n.º B74
ADC3		n.º B1
ADC4		n.º B1
ADC5		n.º B1
ADC6		n.º B2
ADC7		n.º B111
ADC8		n.º B115
ADC9		n.º B77
ADC10		n.º B74
ADC11		n.º B110

(continuación)

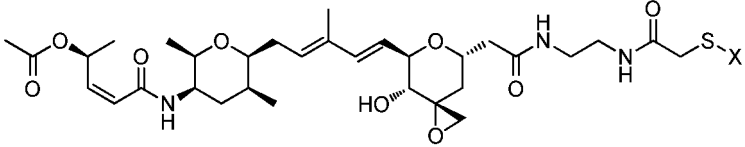
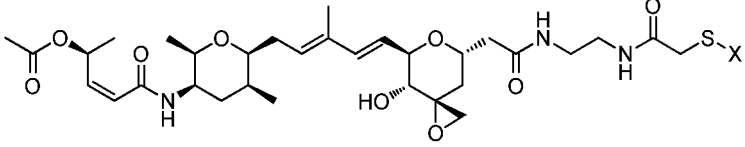
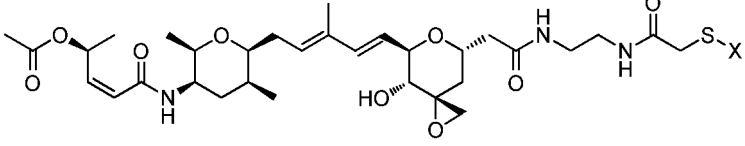
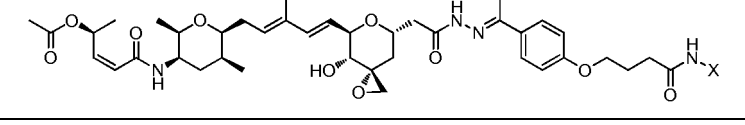
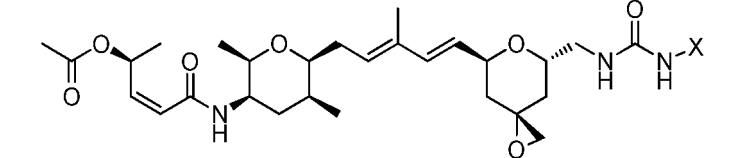
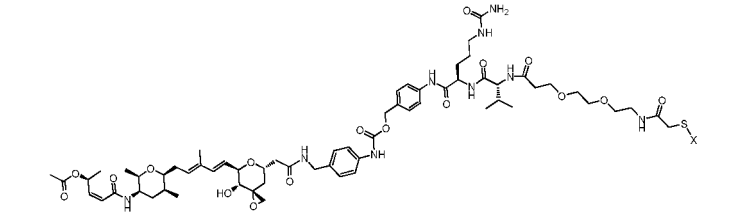
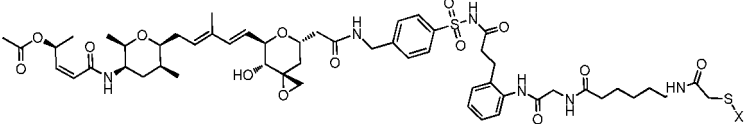
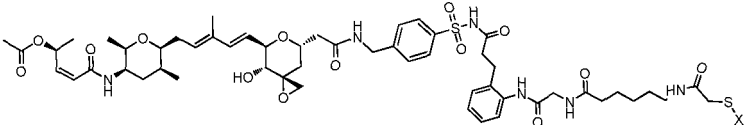
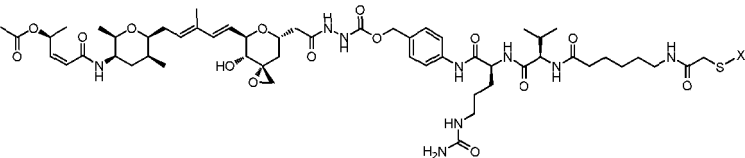
ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC12		n.º B3
ADC13		n.º B74
ADC14		n.º B74
ADC15		n.º B74
ADC16		n.º B47
ADC17		n.º B19
ADC18		n.º B52
ADC19		n.º B67
ADC20		n.º B54
ADC21		n.º B62

(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC22		n.º B36
ADC23		n.º B36
ADC24		n.º B52
ADC25		n.º B52
ADC26		n.º B52
ADC27		n.º B52
ADC28		n.º B52
ADC29		n.º B52



(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC30		n.º B52
ADC31		n.º B52
ADC32		n.º B52
ADC33		n.º B21
ADC34		n.º B138
ADC35		n.º B27
ADC36		n.º B37
ADC37		n.º B37
ADC38		n.º B146

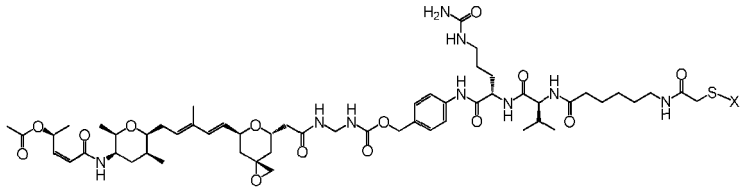
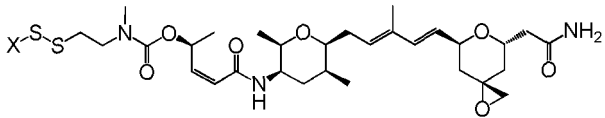
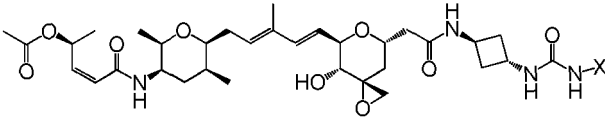
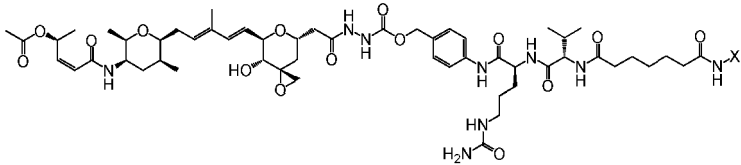
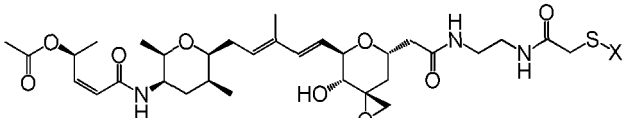
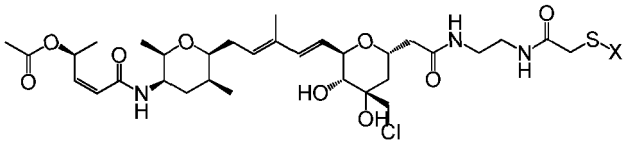
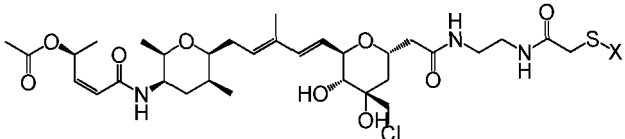
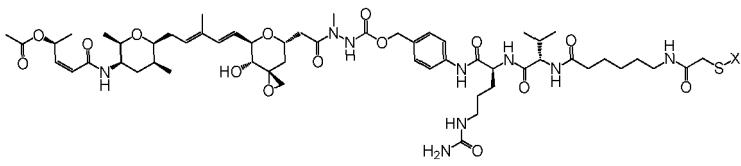
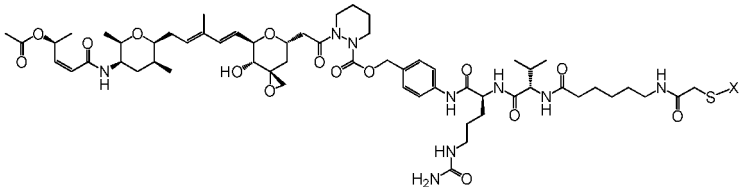
(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC39		n.º B146
ADC40		n.º B170
ADC41		n.º B170
ADC42		n.º B170
ADC43		n.º B151
ADC44		n.º B151
ADC45		n.º B165
ADC46		n.º B165
ADC47		n.º B123

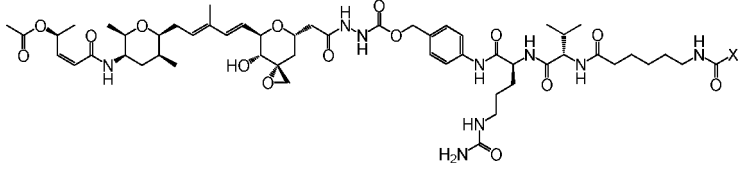
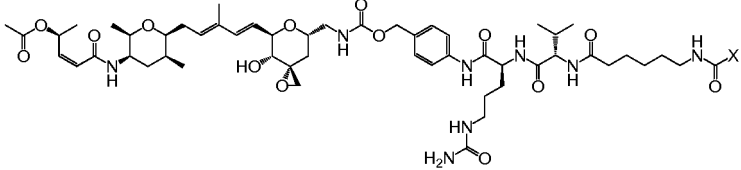
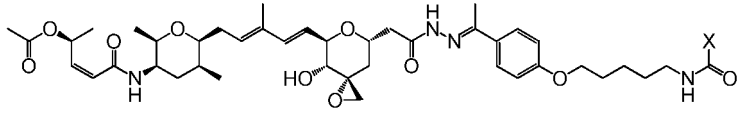
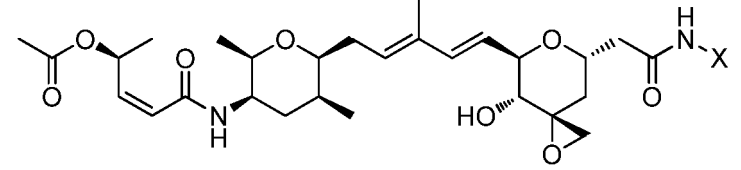
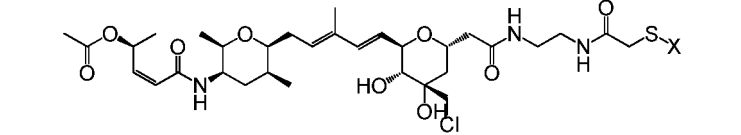
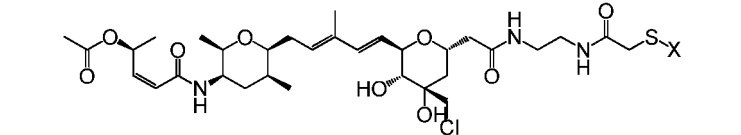
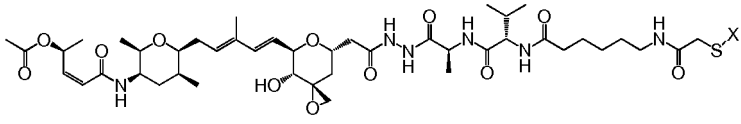
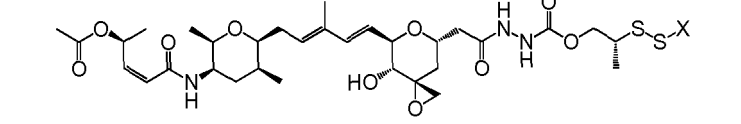
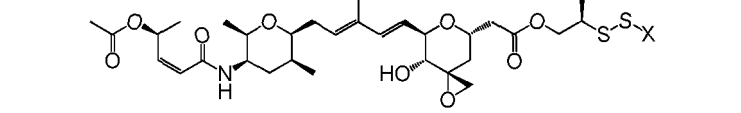
(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC48		n.º B123
ADC49		n.º B123
ADC50		n.º B154
ADC51		n.º B154
ADC52		n.º B157
ADC53		n.º B150
ADC54		n.º B128
ADC55		n.º B161
ADC56		n.º B126

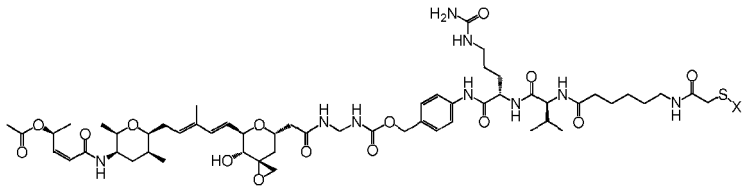
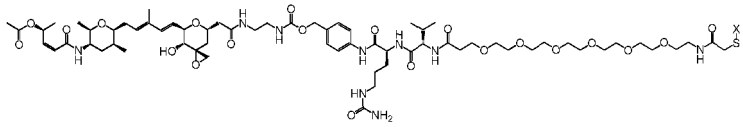
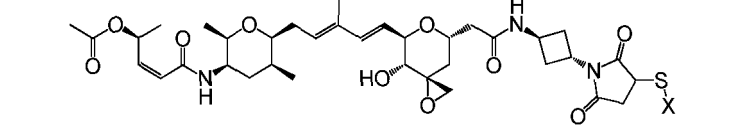
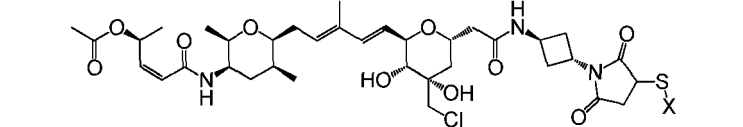
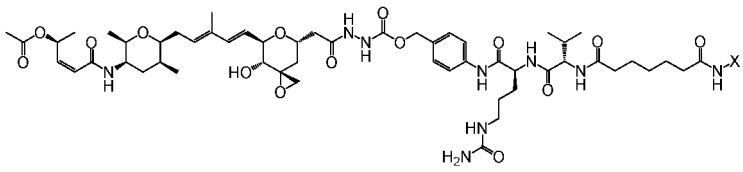
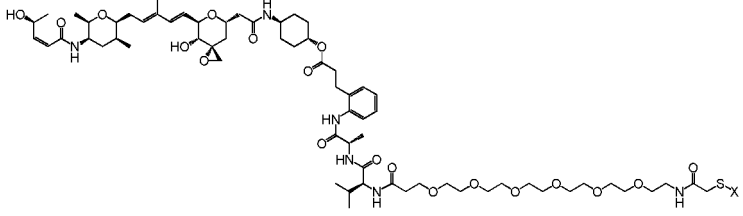
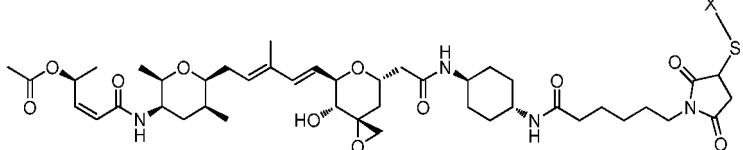
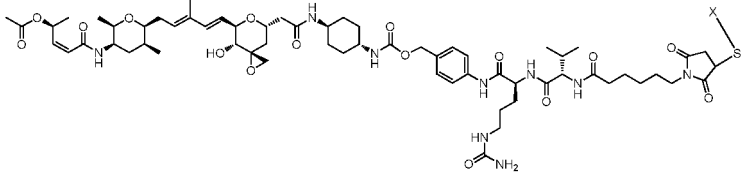
(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC57		n.º B180
ADC58		n.º B175
ADC59		n.º B178
ADC60		n.º B190
ADC61		n.º B52
ADC62		n.º B280
ADC63		n.º B280
ADC64		n.º B185
ADC65		n.º B205

(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC66		n.º B47
ADC67		n.º B156
ADC68		n.º B160
ADC69		n.º B1
ADC70		n.º B280
ADC71		n.º B280
ADC72		n.º B210
ADC73		n.º B217
ADC74		n.º B236

(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC75		n.º B237
ADC76		n.º B245
ADC77		n.º B287
ADC78		n.º B288
ADC79		n.º B190
ADC80		n.º B255
ADC81		n.º B278
ADC82		n.º B277

(continuación)

ADC n.º	Estructura	LP usado para la síntesis de ADC
ADC83		n.º B1
ADC84		n.º B1

Tabla 7: Procedimiento general de preparación de ADC

ADC n.º	Procedimiento general para preparación	Anticuerpo usado/Aminoácido conjugado	Concentración de anticuerpo (o) Cantidad de ácido 2,2',2''-fosfanotriiltripropánico (TCEP)= $\gamma^a$	Cantidad de enlazador de carga útil (PL) usado	Incremento de PM teórico)
ADC1	F	H-A114C/C114	7	7	1201
ADC2	E	H-A114C/C114	7	7	643
ADC3	A	H/K	10	4	518
ADC4	A	H/K	10	5,5	518
ADC5	A	H/K	10	7	518
ADC6	A	H/K	10	7	501
ADC7	A	H/K	5	4,5	631
ADC8	A	H/K	5	5	678
ADC9	H <sup>1</sup>	H/TG1-(Q)_1	4,8	20	1051
ADC10	D	H-A114C/C114	5 <sup>a</sup>	12	643
ADC11	B	H/kK188	10 <sup>3</sup>	5,5	631
ADC12	B	H/kK188	10 <sup>3</sup>	6,5	518
ADC13	D	H/C	4 <sup>a</sup>	10	643
ADC14	D	H-L398C+L443C/C	6 <sup>a</sup>	14	643
ADC15	D	H-K392C+L443C/C	6 <sup>a</sup>	14	643
ADC16	H <sup>2</sup>	H/TG1-(Q)	0,5	50	602
ADC17	A	H/K	10	8	721
ADC18	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	10	12	617
ADC19	A	H/K	10	8	586
ADC20	E	H-K392C+L443C/ 392+C443)	(C) 10	12	575
ADC21	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	10	12	686
ADC22	H	H/TG1-(Q)	7,2	31	1003
ADC23	H				
ADC24	E	H-A114C/C114	8,25	5	617

ES 2 656 298 T3

(continuación)

ADC n.º	Procedimiento general para preparación	Anticuerpo usado/Aminoácido conjugado	Concentración de anticuerpo (o) Cantidad de ácido 2,2',2"-fosfanotriiltriopropanoico (TCEP)= y <sup>a</sup>	Cantidad de equivalente de enlazador de carga útil (PL) usado	Incremento de PM teórico)
ADC25	D	H/C	10	11	617
ADC26	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	8	12	617
ADC27	E	H-E388C+N421C/ (C388+C421)	10	12	617
ADC28	E	H-Q347C+K392C/ (C347+C392)	10	12	617
ADC29	E	H-L443C+kK183C/ (C443+kC183)	10	12	617
ADC30	E	H-Q347C+L443C/ (C347+C443)	10	12	617
ADC31	E	H-kK183C/kC183	10	5	617
ADC32	E	H-N421C/C421	10	5	617
ADC33	A	H/K	10	8	736
ADC34	A	H/K	10	8	517
ADC35	E	H-A114C/C114	8,5	7	1245
ADC36	E	H-A114C/C114	8,5	7	1062
ADC37	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	8	16	1062
ADC38	E	H-A114C/C114	8,5	7	1109
ADC39	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	8	16	1109
ADC40	E	H-A114C/C114	9,1	7	1163
ADC41	D	H/C	2,5 <sup>a</sup>	8,4	1163
ADC42	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	8	16	1163
ADC43	E	H-A114C/C114	9,1	7	1050
ADC44	D	H/C	2,5 <sup>a</sup>	8,4	1050
ADC45	E	H-A114C/C114	9,1	7	1148
ADC46	D	H/C	2,5 <sup>a</sup>	8,4	1148
ADC47	E	H-A114C/C114	9,1	7	849
ADC48	D	H/C	2,5 <sup>a</sup>	8,4	849
ADC49	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	8	16	849
ADC50	E	H-A114C/C114	9	5	1066
ADC51	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	8	16	1066
ADC52	E	H-A114C/C114	9	5	793
ADC53	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	5,9	12	548
ADC54	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	5,9	12	645
ADC55	E	H-K392C+L443C/ (C392+C443)	6,9	12	619
ADC56	E	H-A114C/C114	12,4	9	616
ADC57	E	H-C114	9,25	5,5	1107
ADC58	E	H-C114	9,25	5,5	593
ADC59	A	H/K	10	6	631



(continuación)

ADC n.º	Procedimiento general para preparación	Anticuerpo usado/Aminoácido conjugado	Concentración de anticuerpo (o) Cantidad de ácido 2,2',2"-fosfanetriiltriopropanoico (TCEP)= y <sup>a</sup>	Cantidad de enlazador de carga útil (PL) usado	Incremento de PM teórico)
ADC60	A	H/K	10	6	1080
ADC61	E	H-C392+C443+kC183	5	12	617
ADC62	E	H-C114	9,2	7,5	653
ADC63	E*	H-C392+C443	8	14	653
ADC64	E	H-C392+C443	8	10	1123
ADC65	E	H-C392+C443	8	10	1163
ADC66	H	H/TG1-(Q)Q	10	15	1051
ADC67	H	H/TG1-(Q)Q	10	15	1009
ADC68	H	H/TG1-(Q)	10	15	737
ADC69	A**	Anticuerpo Y/K	1,86	7,5	518
ADC70	D*	H/C	4 <sup>a</sup>	15	653
ADC71	E*	H-C443	10	8	653
ADC72	E	H-C392+C443	8	12,9	874
ADC73	E	H-C114	9	5	665
ADC74	E	H-C114	9	5	609
ADC75	E	H-C114	9	5	1123
ADC76	E	H-C114	9	5	1360
ADC77	F	H-C392+C443	8,3	10	683
ADC78	F	H-C392+C443	8,3	10	720
ADC79	A	H/K	10	10	1080
ADC80	E	H-C114	9,1	5,9	1285
ADC81	G	5T4-A1-C443	2,5	21	825
ADC82	G	5T4-A1-C443	2,5	21	1230
ADC83	A**	M1/70/K	3,23	6,5	518
ADC84	A**	Anticuerpo X/K	2,9	7,5	518

<sup>1</sup> Tiempo de reacción = 16 horas, <sup>2</sup> Tiempo de reacción = 4 horas <sup>3</sup> Tiempo de reacción = 20 horas  
<sup>a</sup> Cantidad de ácido 2,2',2"-fosfanetriiltriopropanoico (TCEP)= y usado  
\* *El tampón de reacción usado es DPBS, EDTA 5 Mm a pH 7,0 en lugar de tampón borato 50 mM.*  
\*\* *El tampón de reacción usado es HEPES 180 mM a pH 8,8 en lugar de tampón borato 50 mM.*

Tabla 8: Datos analíticos de ADC

ADC n.º	Espectros de masas: Tiempo de retención de HPLC-SEC y Δ masa de HPLC para la porción de cadena pesada (HC) (hasta 6 Da de diferencia con Δ de la masa teórica)	Carga o fármaco por relación de anticuerpos (DAR)
ADC1	SEC (Protocolo 1): 7,694 min; HPLC (Protocolo 2): Δ de masa de HC = 1203	1,6
ADC2	SEC (Protocolo 1): 7,556 min; HPLC (Protocolo 2): Δ de masa de HC = 646	1,3
ADC3	SEC (Protocolo 1): 7,598 min; HPLC (Protocolo 2): Δ de masa de HC = 517	2,2
ADC4	SEC (Protocolo 1): 7,603 min; HPLC (Protocolo 2): Δ de masa de HC = 518	3,2
ADC5	SEC (Protocolo 1): 7,605 min; HPLC (Protocolo 2): Δ de masa de HC = 520	4,2

ES 2 656 298 T3

(continuación)

ADC n.º	<b>Espectros de masas: Tiempo de retención de HPLC-SEC y <math>\Delta</math> masa de HPLC para la porción de cadena pesada (HC) (hasta 6 Da de diferencia con <math>\Delta</math> de la masa teórica)</b>	Carga o fármaco por relación de anticuerpos (DAR)
ADC6	SEC (Protocolo 1): 7,723 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 500	3,6
ADC7	SEC (Protocolo 1): 7,151 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 631	1,9
ADC8	SEC (Protocolo 1): 7,290 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 678	2,1
ADC9	SEC (Protocolo 1): 7,093 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1049	1,8
ADC10	SEC (Protocolo 1): 7,399 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 644	3,1
ADC11	SEC (Protocolo 1): 7,38 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 629	2,5
ADC12	SEC (Protocolo 1): 7,37 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 517	1,8
ADC13	SEC (Protocolo 1): 7,566 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 644	7,3
ADC14	SEC (Protocolo 1): 7,598 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 640	6,6
ADC15	SEC (Protocolo 1): 7,547 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 644	6,7
ADC16	SEC (Protocolo 1): 7,425 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 603	1,8
ADC17	SEC (Protocolo 1): 7,297 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 721	2,3
ADC18	SEC (Protocolo 1): 7,549 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 620	4
ADC19	SEC (Protocolo 1): 8,161 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 590	2,9
ADC20	SEC (Protocolo 1): 7,806 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 577	4
ADC21	SEC (Protocolo 1): 8,679_11,628 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 688	4
ADC22	SEC (Protocolo 1b): 5,95 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1001	2
ADC23		
ADC24	SEC (Protocolo 1b): 7,136 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 618	1,9
ADC25	SEC (Protocolo 1b): 7,119 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 618	6,3
ADC26	SEC (Protocolo 1b): 7,948 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 618	3,9
ADC27	SEC (Protocolo 1b): 8,358 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 622	3,6
ADC28	SEC (Protocolo 1b): 7,921 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 619	3,8
ADC29	SEC (Protocolo 1b): 8,046 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 618	4
ADC30	SEC (Protocolo 1b): 7,933 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 618	4
ADC31	SEC (Protocolo 1b): 7,982 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 618	2
ADC32	SEC (Protocolo 1b): 7,765 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 618	2
ADC33	SEC (Protocolo 1b): 5,821 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 736	3
ADC34	SEC (Protocolo 1b): 5,766 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 517	1,4

ES 2 656 298 T3

(continuación)

ADC n.º	<b>Espectros de masas: Tiempo de retención de HPLC-SEC y <math>\Delta</math> masa de HPLC para la porción de cadena pesada (HC) (hasta 6 Da de diferencia con <math>\Delta</math> de la masa teórica)</b>	Carga o fármaco por relación de anticuerpos (DAR)
ADC35	SEC (Protocolo 1b): 8,414 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1243	1,8
ADC36	SEC (Protocolo 1b): 8,074 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1062	2,2
ADC37	SEC (Protocolo 1b): 5,964 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1060	2,9
ADC38	SEC (Protocolo 1b): 8,314 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1109	2
ADC39	SEC (Protocolo 1b): 6,031 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1106	3,2
ADC40	SEC (Protocolo 1b): 6,031 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1164	2
ADC41	SEC (Protocolo 1b): 5,925 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1163	5,7
ADC42	SEC (Protocolo 1b): 6,009 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1160	4,1
ADC43	SEC (Protocolo 1b): 6,079 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1051	2
ADC44	SEC (Protocolo 1b): 5,953 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1050	4,3
ADC45	SEC (Protocolo 1b): 6,059 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1149	2
ADC46	SEC (Protocolo 1b): 5,963 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1147	3,8
ADC47	SEC (Protocolo 1b): 6,026 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 852	2,3
ADC48	SEC (Protocolo 1b): 5,943 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 850	5,8
ADC49	SEC (Protocolo 1b): 6,008 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 852	4,3
ADC50	SEC (Protocolo 1b): 6,031 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1068	2
ADC51	SEC (Protocolo 1b): 6,05 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1066	3,1
ADC52	SEC (Protocolo 1b): 6,036 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 796	1,8
ADC53	SEC (Protocolo 1b): 6,432 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 544	4
ADC54	SEC (Protocolo 1b): 6,425 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 643	4
ADC55	SEC (Protocolo 1b): 6,443 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 617	3,6
ADC56	SEC (Protocolo 1b): 6,463 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 616	1,6
ADC57	SEC (Protocolo 1b): 6,475 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1107	1,8
ADC58	SEC (Protocolo 1b): 6,474 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 589	1,9
ADC59	SEC (Protocolo 1b): 6,409 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 630	2,4
ADC60	SEC (Protocolo 1b): 6,454 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1078	1,8
ADC61	SEC (Protocolo 1b): 6,437 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 618	5,1
ADC62	SEC (Protocolo 1b): 6,48 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 653	1,7
ADC63	SEC (Protocolo 1b): 6,452 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 651	1,8

(continuación)

ADC n.º	<b>Espectros de masas: Tiempo de retención de HPLC-SEC y <math>\Delta</math> masa de HPLC para la porción de cadena pesada (HC) (hasta 6 Da de diferencia con <math>\Delta</math> de la masa teórica)</b>	Carga o fármaco por relación de anticuerpos (DAR)
ADC64	SEC (Protocolo 1b): 6,502 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1126	4,2
ADC65	SEC (Protocolo 1b): 6,495 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1162	4,2
ADC66	SEC (Protocolo 1b): 6,362 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1052	3,3
ADC67	SEC (Protocolo 1b): 6,414 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1006	2,9
ADC68	SEC (Protocolo 1b): 6,377 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 736	2,1
ADC69	SEC (Protocolo 3): 2,396 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 518	4,2
ADC70	SEC (Protocolo 1b): 6,285 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 653	7,8
ADC71	SEC (Protocolo 1b): 6,376 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 656	1,4
ADC72	SEC (Protocolo 1b): 6,332 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 873	3,1
ADC73	SEC (Protocolo 1b): 6,38 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 665	1,9
ADC74	SEC (Protocolo 1b): 6,379 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 608	1,8
ADC75	SEC (Protocolo 1b): 6,378 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1123	2
ADC76	SEC (Protocolo 1b): 6,355 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1359	1,9
ADC77	SEC (Protocolo 1b): 6,332 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 689	4
ADC78	SEC (Protocolo 1b): 6,369 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 721	3,2
ADC79	SEC (Protocolo 1b): 6,454 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1078	3
ADC80	SEC (Protocolo 1b): 6,372 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1283	2,0
ADC81	SEC (Protocolo 1): 9,183 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 825	1,9
ADC82	SEC (Protocolo 1): 9,367 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 1231	1,9
ADC83	SEC (Protocolo 3): 2,26 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 518	3,4
ADC84	SEC (Protocolo 3): 2,306 min; HPLC (Protocolo 2): $\Delta$ de masa de HC = 518	4,4

**Tabla 9: Datos de citotoxicidad in vitro para ADC**

ADC n.º	N87 Cl <sub>50</sub> (nM)	BT474 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-361-DYT2 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-468 Cl <sub>50</sub> (nM)
ADC1	0,48	1,1	>1000	>1000
ADC2	1,26	2,02	>1000	>1000
ADC3	0,62	0,75	506,44	>1000
ADC4	0,73	0,83	9	>1000
ADC5	0,85	0,93	0,77	>1000
ADC6	0,52	1,03	123,00	580,3
ADC7	0,37	1,32	>1000	>1000

## ES 2 656 298 T3

(continuación)

ADC n.º	N87 Cl <sub>50</sub> (nM)	BT474 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-361-DYT2 Cl <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-468 Cl <sub>50</sub> (nM)
ADC8	0,38	1,69	>850	>1000
ADC9	0,57	38,7	734	626
ADC10	0,44	1,13	645	>1000
ADC11	0,64	3,26	>1000	>1000
ADC12	0,21	0,65	796	>1000
ADC13	500,49	501,26	367,92	>1000
ADC14	0,564	1,18	0,92	>1000
ADC15	0,56	1,04	1,13	749
ADC16	0,36	0,85	836	646
ADC17	1,15	2,48	16,1	6,27
ADC18	0,76	0,99	1,22	>1000
ADC19	1,01	1,05	0,78	>1000
ADC20	1,41	1,68	14,72	>1000
ADC21	1,1	1,35	1,15	>1000
ADC22	<0,082	0,543	>1000,000	>1000,000
ADC23	0,388	0,712	>1000,000	>1000,000
ADC24	0,43	1,13	>1000,000	>1000,000
ADC25	1,166	3,524	>1000,000	>1000,000
ADC26	0,326	0,939	0,905	>1000,000
ADC27	5,535	7,295	>1000,000	>1000,000
ADC28	0,792	1,337	>517,927	>1000,000
ADC29	0,936	1,394	220,984	>1000,000
ADC30	1,216	1,882	>1000,000	>1000,000
ADC31	1,295	1,652	>1000,000	>1000,000
ADC32	4,229	3,104	>1000,000	>1000,000
ADC33	1,089	0,968	25,123	55,117
ADC34	2,956	1,333	29,445	13,28
ADC35	>1000,000	7,52	>1000,000	>1000,000
ADC36	5,057	1,487	>1000,000	>1000,000
ADC37	0,438	0,727	>1000,000	>1000,000
ADC38	0,92	0,684	>971,382	678,881
ADC39	0,253	0,814	539,318	>652,881
ADC40	292,352	1,374	>1000,000	>1000,000
ADC41	1,124	1,289	>1000,000	>1000,000
ADC42	0,387	3,55	>1000,000	>1000,000
ADC43	>517,760	162,752	>1000,000	>1000,000
ADC44	311,476	>1000,000	>1000,000	>1000,000
ADC45	>507,594	>502,150	>1000,000	>1000,000
ADC46	27,266	33,941	>1000,000	>1000,000
ADC47	>500,464	2,644	>1000,000	>1000,000
ADC48	0,948	1,387	>1000,000	>1000,000
ADC49	0,666	1,713	>1000,000	>1000,000

(continuación)

ADC n.º	N87 CI <sub>50</sub> (nM)	BT474 CI <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-361-DYT2 CI <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-468 CI <sub>50</sub> (nM)
ADC50	7,011	2,956	>1000,000	>1000,000
ADC51	3,613	3,282	>1000,000	>1000,000
ADC52	0,732	0,441	297,62	78,288
ADC53	0,46	0,733	1,761	>1000,000
ADC54	0,387	0,682	38,177	>1000,000
ADC55	0,775	1,181	2,827	>1000,000
ADC56	1,583	2,697	253,894	166,107
ADC57	525,654	17,021	>1000,000	>1000,000
ADC58	40,988	8,516	>1000,000	>1000,000
ADC59	1,180	1,903	704,928	>1000,000
ADC60	0,387	0,803	467,403	977,305
ADC61	1,458	1,433	17,826	>1000,000
ADC62	1,321	1,042	>1000,000	>1000,000
ADC63	0,752	0,785	650,252	909,588
ADC64	0,860	1,582	329,206	180,131
ADC65	1,198	2,364	86,588	44,689
ADC66	1,097	1,103	>1000,000	>1000,000
ADC67	95,434	10,354	>1000,000	>1000,000
ADC68	17,622	14,213	697,158	369,898
ADC70	1,909	3,325	19,619	>1000,000
ADC71	0,595	1,032	>1000,000	>1000,000
ADC72	0,640	1,274	>1000,000	>1000,000
ADC73	0,906	0,940	>1000,000	323,986
ADC74	68,249	13,402	>1000,000	>1000,000
ADC75	1,066	1,088	>1000,000	>1000,000
ADC76	1,164	1,355	>1000,000	>1000,000
ADC77	1,071	2,292	180,278	>1000,000
ADC78	0,760	1,215	247,494	>1000,000
ADC79	0,158	0,534	0,380	762,235
ADC80	7,878	13,050	>1000	>1000

Tabla 9A: Datos de citotoxicidad in vitro para ADC

ADC n.º	(MDA-MB-435) CI <sub>50</sub> (nM)	MDA-MB-468 CI <sub>50</sub> (nM)	Macrófago peritoneal CI <sub>50</sub> (nM)	Célula 3 CI <sub>50</sub> (nM)	Célula 4 CI <sub>50</sub> (nM)	Célula 5 CI <sub>50</sub> (nM)	Célula 6 CI <sub>50</sub> (nM)	Célula 7 CI <sub>50</sub> (nM)
ADC69					<b>17,182</b>	<b>1,851</b>	<b>2,177</b>	<b>0,971</b>
ADC81	<b>162,737</b>	<b>35,578</b>						
ADC82	<b>370,545</b>	<b>9,978</b>						
ADC83			Datos obtenidos de Chad					
ADC84				1,522				

## ES 2 656 298 T3

LISTADO DE SECUENCIAS	
SEQ ID NO: 1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
SEQ ID NO: 2	GGTTACCTTGTTACGACTT
SEQ ID NO: 3	CTACGGGAGGCAGCAGTGGG
SEQ ID NO: 4	CCCACTGCTGCCTCCCGTAG
SEQ ID NO: 5	CAGCAGCCGCGGTAATAC
SEQ ID NO: 6	GTATTACCGCGGCTGCTG
SEQ ID NO: 7	CATGGCTGTCGTCAGCTCGT
SEQ ID NO: 8	ACGAGCTGACGACAGCCATG

(continuación)

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 9 AGAGTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAATGCCTTACACATGCAAGT  
 CGAACGCAGACACGGGTGCTTGACACCTGGTGGCGAGTGGCGAAGCGGGTGAAGTAAAT  
 ACATCGGAAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGGAAAGCCGGATTAATACC  
 GCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGATCTTCGGACCTCGCCCTATAGGGTTG  
 GCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCCTACCAAGGGCAGCATCAG  
 TAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC  
 CTACGGGAGGACAGTGGGAAATTTGGACAATGGGGAAACCCCTGATCCAGCA  
 ATGCCGGTGTGTAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGGAAGA  
 AATCCTTTGGCTAATACCCCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAAATAGCACCCG  
 CTAACACTAGTCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGGTCCGAGCCGTTAATCCGGAAT  
 TACTGGCCGTAAGAAGCGTGGCAGCGGTTTGTTAAGACAGATGTGAATCCCCGG  
 GCTTAACCTGGGAAC TGCA TTGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG  
 TAGAATCCACGTGACAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGCC  
 GAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA  
 ACAGGATAGATAACCTGGTAGTCCAGCCCTAAACGATGCACTAGTTGTG  
 GGATTCATTTCCCTTAGTAACGTAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCTGGGAGTA  
 CGGTCCGAAGATTAAAACTCAAAGGAAATGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAT  
 GATGGATTAAATCGATGCAACGCGAAACCTTACCTACCCCTTGACATGGTCG  
 GAATCCGAAGAGATTCGGGAGTCTCGAAAGAAACCGATACACAGGTGCTGCA  
 TGGCTGCTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
 ACCCTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTAAGGAGACTCCCGGTGACAAA  
 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGTAGGGCTTC  
 ACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCCGAGGGGAGCTAAT  
 CCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTTGCAACTCGAGTGCATGAAAGCT  
 GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGTCTT  
 GTACACACCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAAGTGGCTAGTCTA  
 ACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC  
 AAGGTAACC

SEQ ID NO: 10 TGG CGA ACA GAT CGA GTT TG

SEQ ID NO: 11 CTT GCG GAG AAC TGT GAA TGC GCA ATA GAA GCG CTG TCA TGG  
 AAT G

SEQ ID NO: 12 CCG AAA AGT GCC ACC TGA CGT CTA AGA TAA CTC GTG GAT ATT  
 CGG CAA G

SEQ ID NO: 13 AGA ATC CCG CGA TCC CAA C



(continuación)

LISTADO DE SECUENCIAS	
SEQ ID NO: 14	TTG CGC ATT CAC AGT TCT C
SEQ ID NO: 15	TCT TAG ACG TCA GGT GGC AC
SEQ ID NO: 16	GGA CGA ATC GAA CTC AGG AAC TTG
SEQ ID NO: 17	CGA AGA GCG ATT GAG GAA AAG G
SEQ ID NO: 18	GTT GGT TTG CGC ATT CAC AGT TCT CCG CAA GAA TTG ATT GCA AGG GCT GCT AAA GGA AG
SEQ ID NO: 19	TCT TCC GCT TCC TCG CTC ACT GAC TCG CTG CGC TCG GTC ACG GAA ATG TTG AAT ACT CAT ACT C
SEQ ID NO: 20	GCT CTA GAC ATC GAT TTA TTA TGA CAA CTT GAC
SEQ ID NO: 21	CCC AAA AAA ACG GGT ATG G
SEQ ID NO: 22	CTA CTG TTT CTC CAT ACC CGT TTT TTT GGG GGG TTG TTG GTT TTT GAA ATT GC
SEQ ID NO: 23	ATG GTG AAG CTT AAG TCG ACA ACC GGC ATT CC
SEQ ID NO: 24	GCA TTC ACA GTT CTC CGC AAG
SEQ ID NO: 25	CTC GCT CAC TGA CTC GCT G
SEQ ID NO: 26	GCA ATT AAC CCT CAC TAA AGG
SEQ ID NO: 27	CTA TAG GGC GAA TTG GGT AC
SEQ ID NO: 28	GCA TCC AAT CAC TTG AAC AGG
SEQ ID NO: 29	CTT GCG GAG AAC TGT GAA TGC GCA AGC CAT CAT TCT CGA CAT TTC C
SEQ ID NO: 30	CCG AAA AGT GCC ACC TGA CGT CTA AGA AGA TTG TGA CGG TAC TGA AGC
SEQ ID NO: 31	AGA GAA CGA TCG CTC CAC AG
SEQ ID NO: 32	TTG CGC ATT CAC AGT TCT C
SEQ ID NO: 33	TCT TAG ACG TCA GGT GGC AC

(continuación)

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 34 GGA CGA ATC GAA CTC AGG AAC TTG

SEQ ID NO: 35 CGA AGA GCG ATT GAG GAA AAG G

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> PFIZER INC.  
 Subramanyam, Chakrapani  
 Koehn, Frank  
 DiRico, Kenneth  
 Green, Michael E  
 He, Haiyin  
 He, Min  
 10 O'Donnell, Christopher J  
 Puthenveetil, Sujiet J  
 Ratnayake, Anokha J  
 Teske, Jesse  
 Yang, Winnie H  
 Eustaquio, Alessandra S  
 15 <120> Análogos de ayuostostatina y procedimientos para su preparación  
 <130> PC71885A  
 <150> 61/722,769  
 <151> 05/11/2012  
 20 <150> 61/723.645  
 <151> 07/11/2012  
 <150> 61/829.409  
 <151> 31/05/2013  
 <160> 35  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 25 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 1  
 agagtttgat cctggctcag 20  
 35 <210> 2  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 40 <400> 2  
 ggttaccttg ttacgact 19  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 3  
 ctacgggagg cagcagtggg 20  
 50 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 4  
 5 cccactgctg cctcccgtag 20  
 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 5  
 cagcagccgc ggtaatac 18  
 <210> 6  
 15 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20 <400> 6  
 gtattaccgc ggctgctg 18  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 7  
 catggctgtc gtcagctcgt 20  
 30 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Construcción sintética  
 <400> 8  
 acgagctgac gacagccatg 20  
 <210> 9  
 <211> 1494  
 40 <212> ADN  
 <213> Burkholderia sp. FERM BP-3421  
 <400> 9

ES 2 656 298 T3

agagtttgat cctggctcag attgaacgct ggcggcatgc cttacacatg caagtcgaac 60  
ggcagcacgg gtgcttgac ctggtggcga gtggcgaacg ggtgagtaat acatcggaac 120  
atgtcctgta gtgggggata gcccggcgaa agccggatta ataccgcata cgatctacgg 180  
atgaaagcgg gggatcttcg gacctcgcgc tatagggttg gccgatggct gattagctag 240  
ttggtggggt aaaggcctac caaggcgacg atcagtagct ggtctgagag gacgatcagc 300  
cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatthttgga 360  
caatggggga aaccctgatc cagcaatgcc gcgtgtgtga agaaggcctt cgggthttaa 420  
agcactthttg tccggaaaga aatcctthttg gctaataccc cgggggggatg acggtaccgg 480  
aagaataagc accggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gtgcgagcgt 540  
taatcggaat tactgggctg aaagcgtgcg caggcggtht gttaagacag atgtgaaatc 600  
cccgggctta acctgggaac tgcattthttg actggcaagc tagagtatgg cagagggggg 660  
tagaattcca cgtgtagcag tgaaatgcgt agagatgtgg aggaataaccg atggcgaagg 720  
cagccccctg ggccaatact gacgctcatg cacgaaagcg tggggagcaa acaggattag 780  
ataccctggt agtccacgcc ctaaaccgatg tcaactagtt gthggggatt catttcctta 840  
gtaacgtagc taacgcgtga agthgaccgc ctggggagta cggtcgcaag attaaaactc 900  
aaaggaattg acggggaccc gcacaagcgg tggatgatgt ggattaattc gatgcaacgc 960  
gaaaaacctt acctaccctt gacatggtcg gaatcctgaa gagattcggg agtgctcgaa 1020  
agagaaccga tacacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgthgggt 1080  
taagtcccgc aacgagcgca accctthttc ttagthgcta cgcaagagca ctctaaggag 1140  
actgccggtg acaaaccgga ggaaggthgg gatgacgtca agtcctcatg gcccttatgg 1200  
gtagggcttc acacgtcata caatggtcgg aacagagggt tgccaacccg cgagggggag 1260  
ctaatcccag aaaaccgatc gtagtccgga thgactctg caactcgagt gcatgaagct 1320  
ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgc cgcggtgaa acgthcccgg gthctgtaca 1380  
caccgcccgt cacaccatgg gagthggtht taccagaagt ggctagtcta accgcaagga 1440  
ggacggtcac cacgtagga thcatgactg ggtgaaagtc gtaacaagggt aacc 1494

<210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

<400> 10  
tggcgaacag atcgagthttg 20

10 <210> 11  
<211> 46  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 11  
 5 cttgCGGAGA actgtgaatg cgcaatagaa gcgctgcat ggaatg 46  
 <210> 12  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 12  
 10 ccgaaaagtG ccacctgacg tctaagataa ctcgtggata ttcggcaag 49  
 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 13  
 20 agaatcccgC gatccaac 19  
 <210> 14  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 14  
 tgcgcattC acagttctc 19  
 30 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Construcción sintética  
 <400> 15  
 tcttagacgt caggtggcac 20  
 <210> 16  
 <211> 24  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 16  
 45 ggacgaatcg aactcaggaa cttg 24  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <220>

<223> Construcción sintética  
 <400> 17  
 cgaagagcga ttgaggaaaa gg 22  
 5  
 <210> 18  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 10  
 <400> 18  
 gttggttgc gcattcacag ttctccgcaa gaattgattg caagggctgc taaaggaag 59  
 <210> 19  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 15  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 19  
 tcttccgctt cctcgcctcac tgactcgcctg cgctcgggtca cggaaatggt gaatactcat 60  
 actc 64  
 20  
 <210> 20  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 20  
 gctctagaca tcgatttatt atgacaact gac 33  
 <210> 21  
 <211> 19  
 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 21  
 35  
 cccaaaaaaa cgggtatgg 19  
 <210> 22  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 22  
 ctactgttc tccatacccg ttttttggg ggggtgttg ttttgaaat tgc 53  
 <210> 23  
 45  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 23  
 atggtgaagc ttaagtcgac aaccggcatt cc 32

5  
 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

10  
 <400> 24  
 gcattcacag ttctccgaa g 21

<210> 25  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 25  
 ctgctcact gactcgctg 19

20  
 <210> 26  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

25  
 <400> 26  
 gcaattaacc ctactaaag g 21

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 27  
 ctatagggcg aattgggtac 20

35  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

40  
 <400> 28  
 gcatccaatc actgaacag g 21

<210> 29  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

50  
 <400> 29  
 ctgctggaga actgtgaatg cgcaagccat cattctcgac atttcc 46



<210> 30  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 30  
 ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaga ttgtgacggt actgaagc 48

10

<210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15

<400> 31  
 agagaacgat cgctccacag 20

<210> 32  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 32  
 ttgcgattc acagtttc 19

25

<210> 33  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

30

<400> 33  
 tcttagacgt caggtggcac 20

<210> 34  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 34  
 ggacgaatcg aactcaggaa ctg 24

<210> 35  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

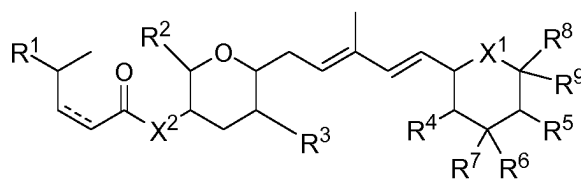
45

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 35  
 cgaagagcga ttgaggaaaa gg 22

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que:

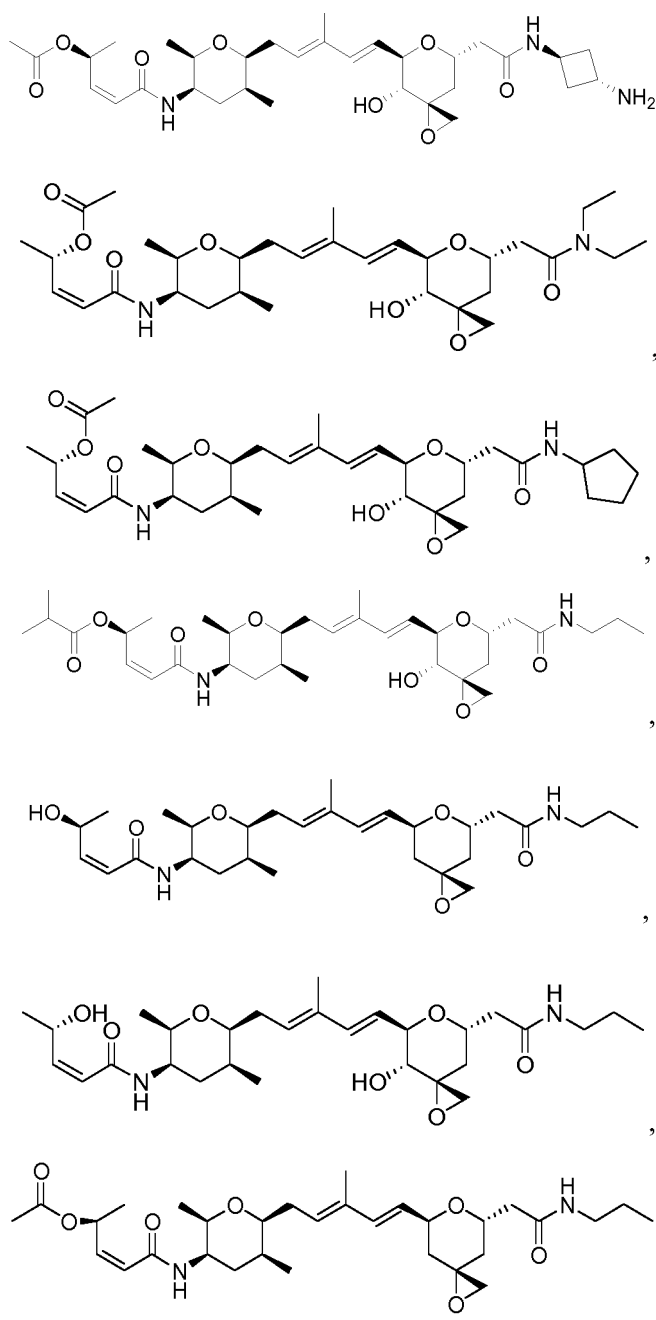
- 5 una línea discontinua representa un enlace opcional;  
 cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;  
 cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;  
 R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O  
 (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;
- 10 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;  
 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;  
 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y  
 alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y  
 halógeno,
- 15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido  
 con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,  
 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o  
 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros  
 que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno,  
 20 nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede estar sustituido opcionalmente con uno a tres  
 sustituyentes seleccionados independientemente entre R;  
 R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;  
 R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR y -  
 (C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;
- 25 R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil  
 C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;  
 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -  
 NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -  
 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -  
 30 heteroarilo C<sub>5-14</sub>;  
 o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>,  
 en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup>  
 en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o  
 heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -  
 SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub>  
 35 opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -  
 C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;  
 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y  
 cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3;
- 40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El compuesto o sal de la reivindicación 1, en la que R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> forman un anillo epoxi; o R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -  
 (C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>.

3. El compuesto o sal de la reivindicación 1, en la que: X<sup>1</sup> es -O-; X<sup>2</sup> es -NR-; R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que  
 45 consiste en: -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>; R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>; R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>; R<sup>4</sup> es hidrógeno o -OR;  
 R<sup>5</sup> es hidrógeno o -OR; R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> cada uno de se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:  
 hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre  
 halógeno, o R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5  
 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en  
 oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede estar sustituido opcionalmente con uno a  
 50 tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R; R<sup>8</sup> es hidrógeno o -OR; R<sup>9</sup> se selecciona  
 independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>; R<sup>13</sup> se  
 selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>; o, cada uno de R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona

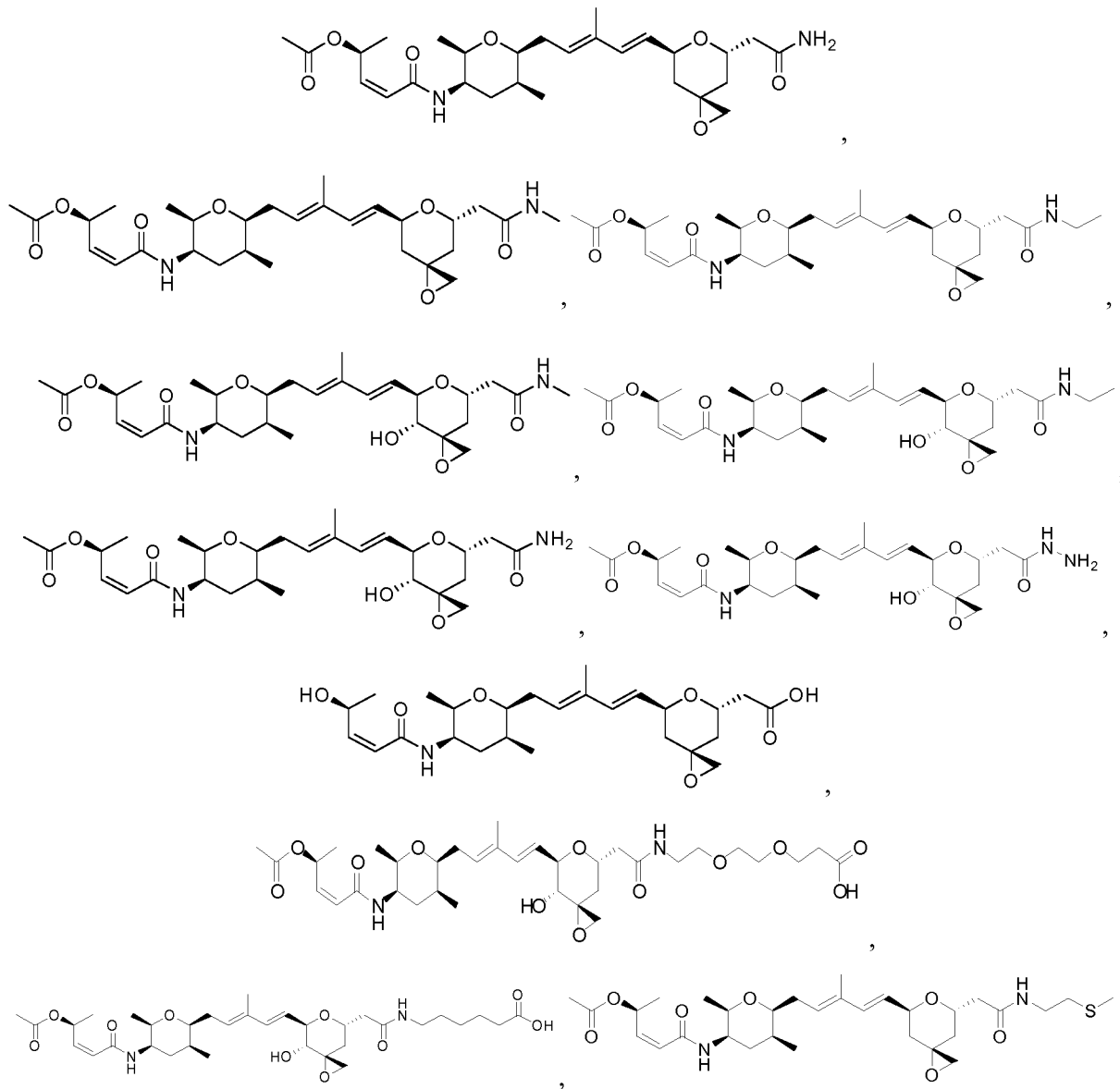
independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>; o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>; en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR.

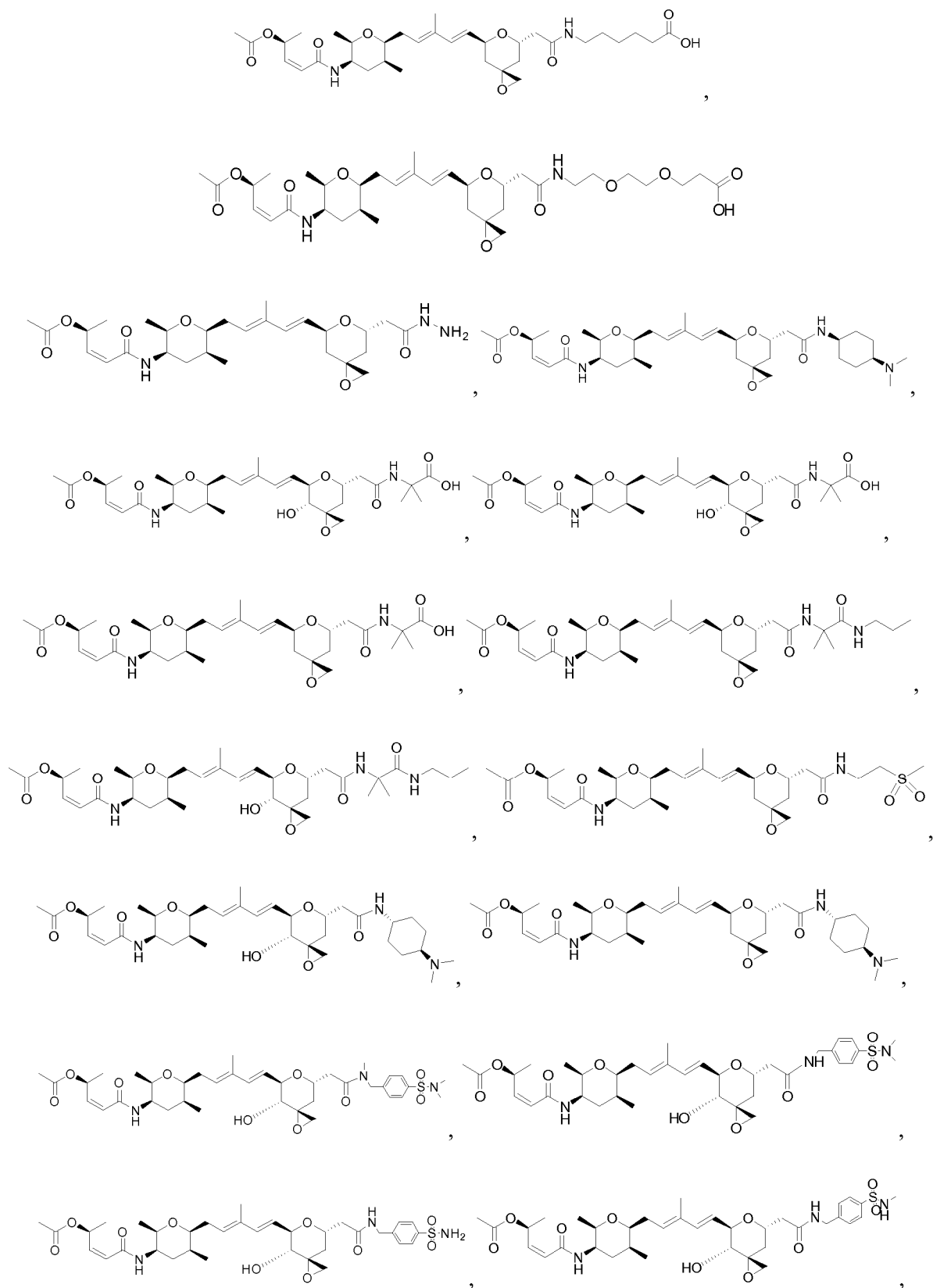
4. El compuesto o sal de la reivindicación 1, en la que: X<sup>2</sup> es -NH-, X<sup>1</sup> es -O-, R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup>, OH o -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos forman epóxido, R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>, R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> y R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>.

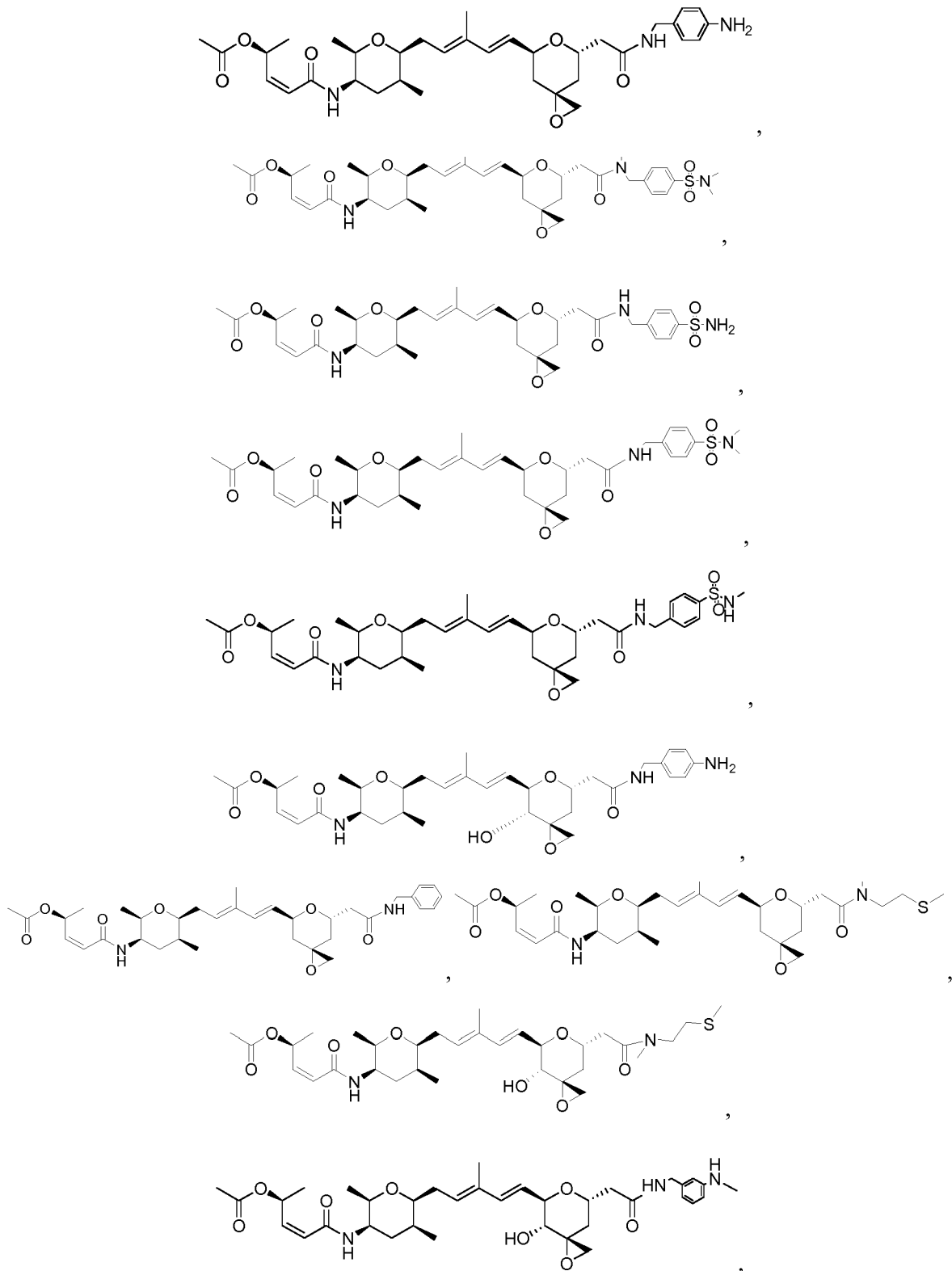
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo que consiste en:





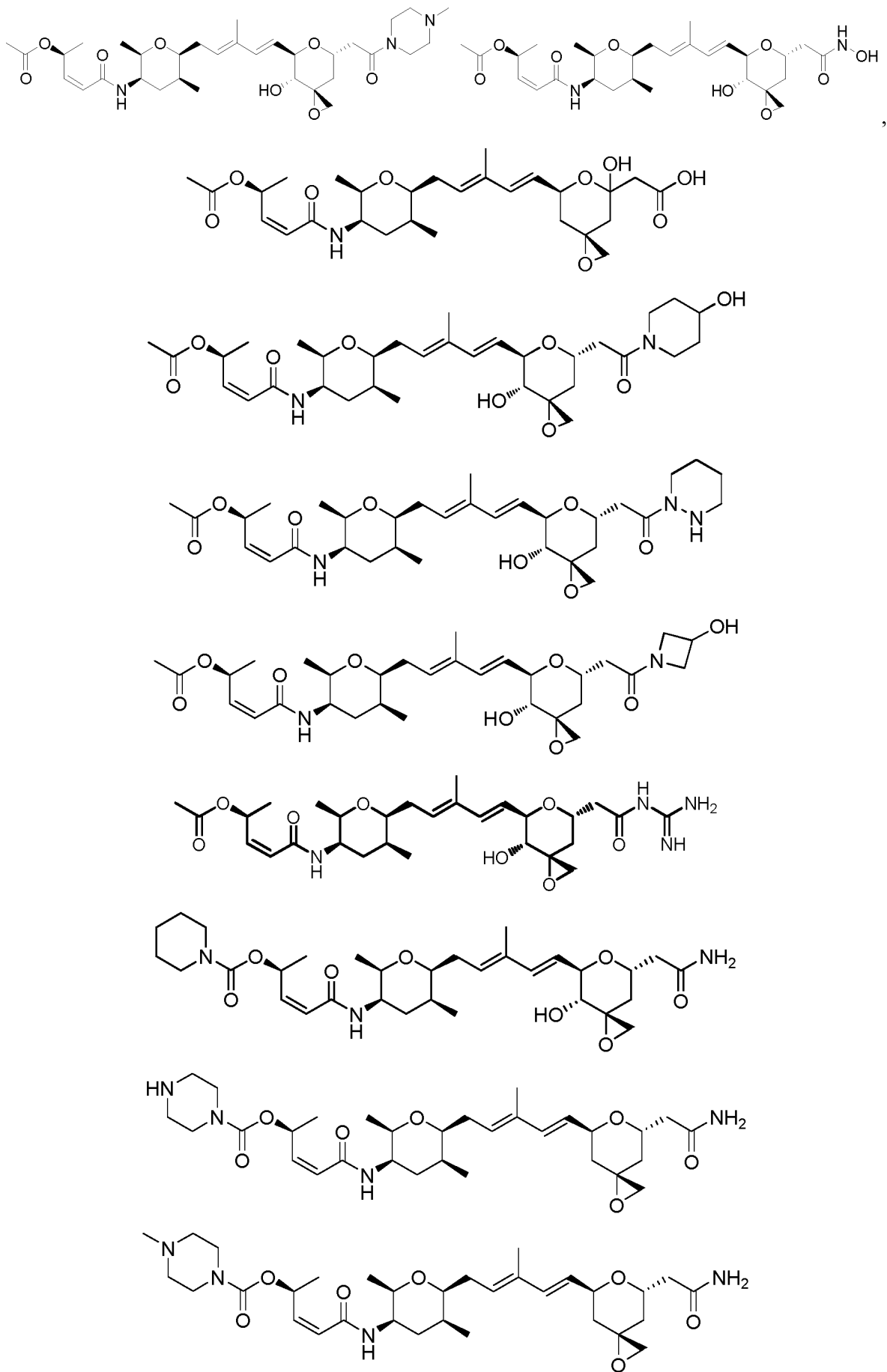


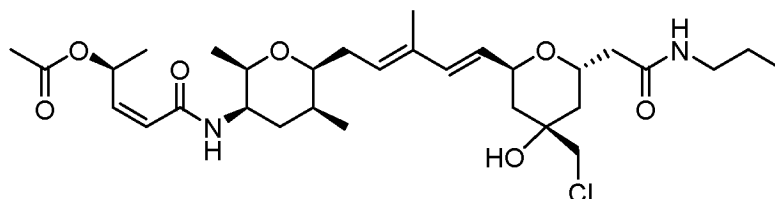
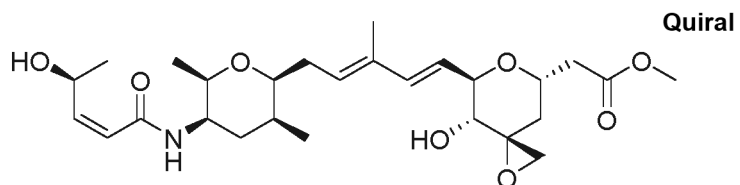
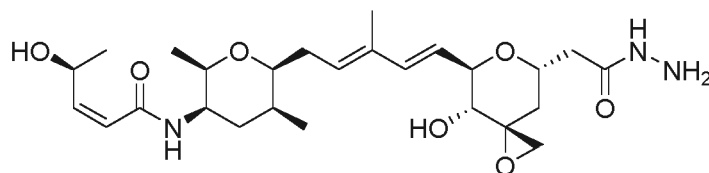
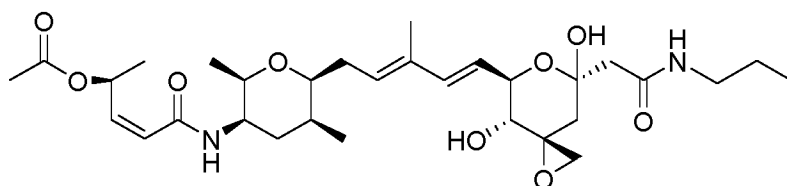
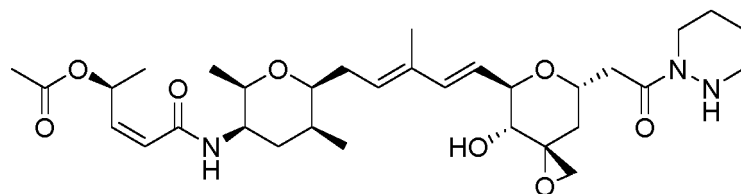
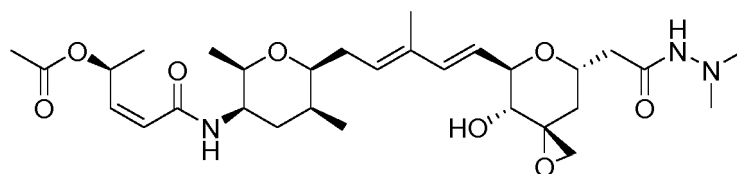
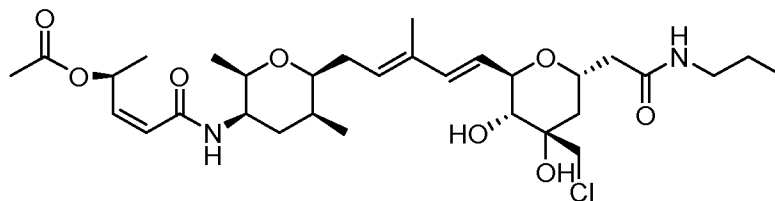
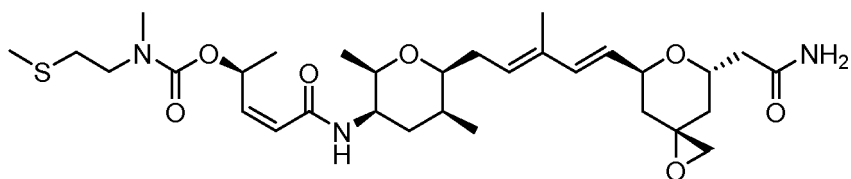




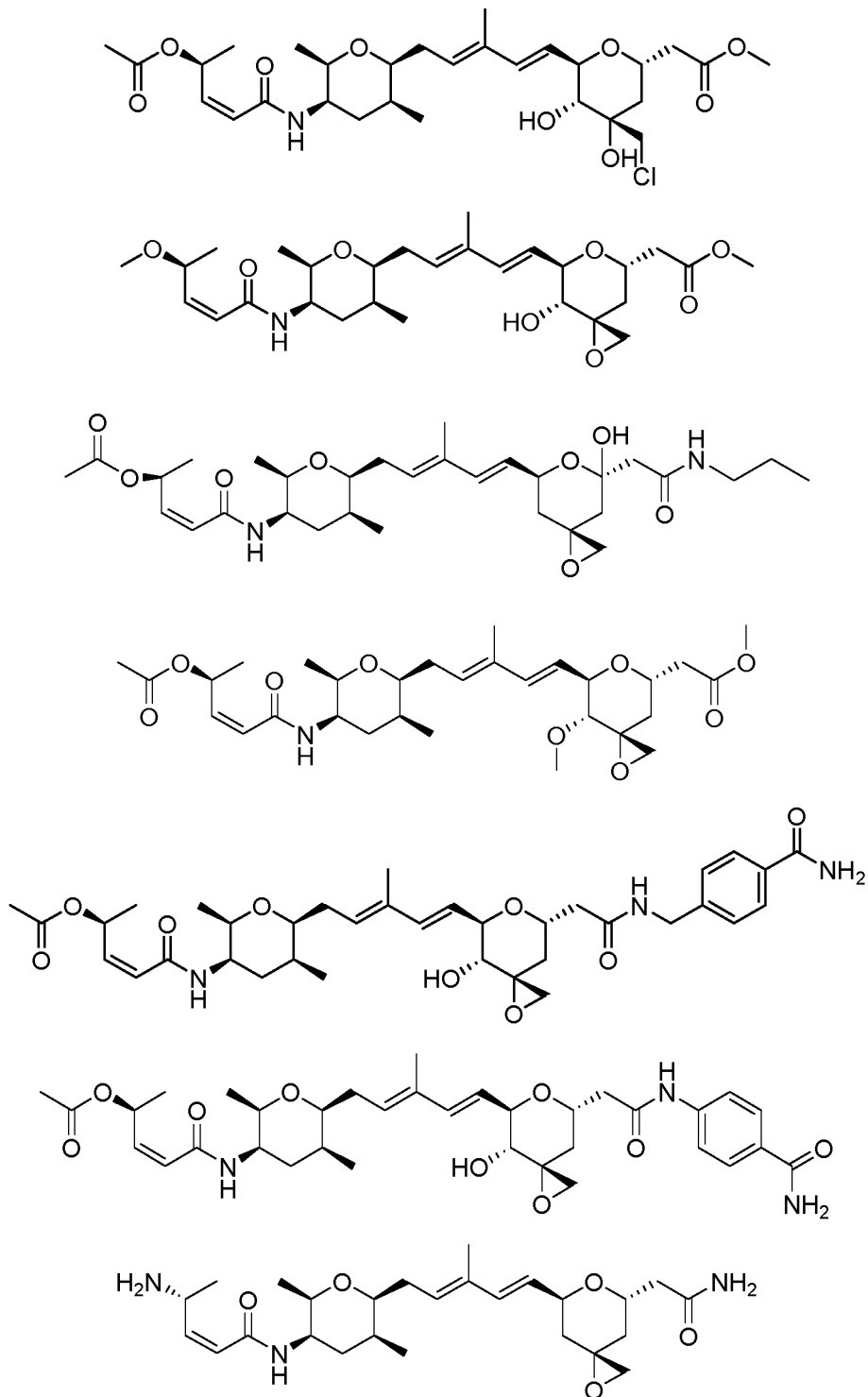








Quiral



5

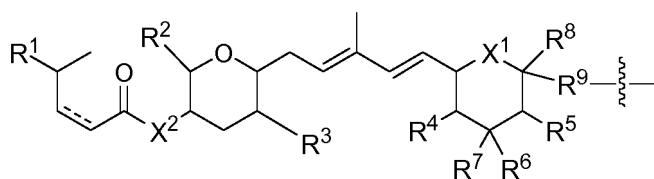
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto de fórmula (II):

L-P (II)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

10 L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P;  
 P es un radical de fórmula (I):



(I)

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

5 cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X' es CR o N;

cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

10 cada uno de X''' es - (C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;

15 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

20 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

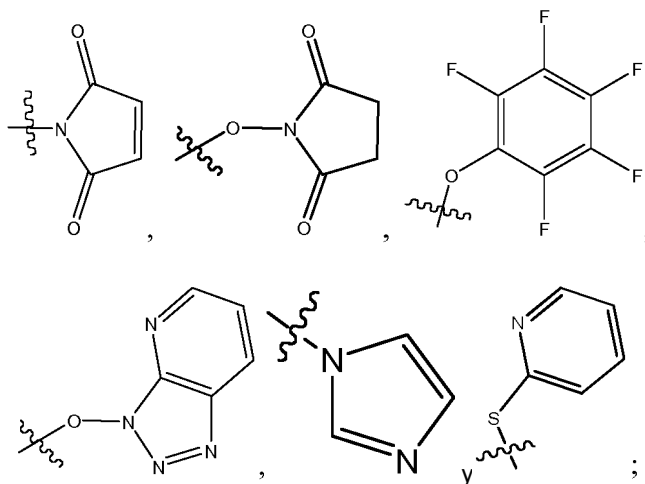
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede estar sustituido opcionalmente

25 con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: -halógeno, -NR<sub>2</sub>,



30

L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

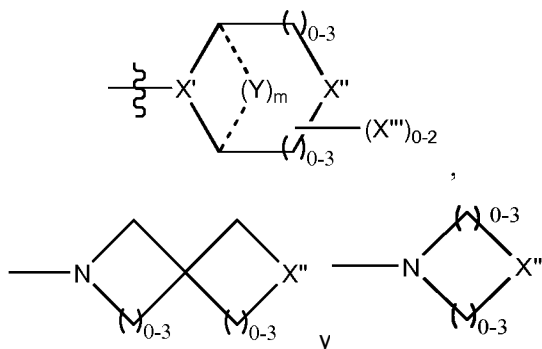
L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

35 -O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-

, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

- 5 L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se unen para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-C(O)-,



- 10 o L<sup>3</sup> está ausente;  
R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbocicliilo C<sub>3-8</sub>, heterocicliilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

- 15 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbocicliilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbocicliilo C<sub>3-10</sub>, -heterocicliilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterocicliilo C<sub>3-10</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

- 20 o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterocicliilo C<sub>3-10</sub>. En el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup>, en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

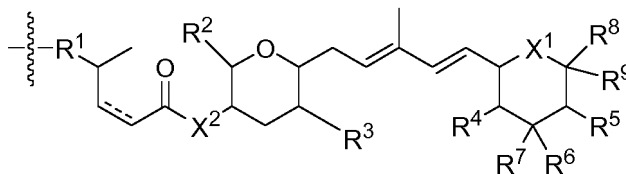
- 25 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

7. Un compuesto de fórmula (I'):



- 30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P';  
P' es un radical de fórmula (I'):



(I')

en la que:

- 35 una línea discontinua representa un enlace opcional;  
cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;  
cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;  
cada X' es CR o N;

cada X" es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-; CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X" se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X'" es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X'" se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

5 Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;

R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -OR", -OCOR<sup>13</sup>, -OC(O)NRR<sup>14'</sup>, -OCON(R)N(R)- y -NR-

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

10 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

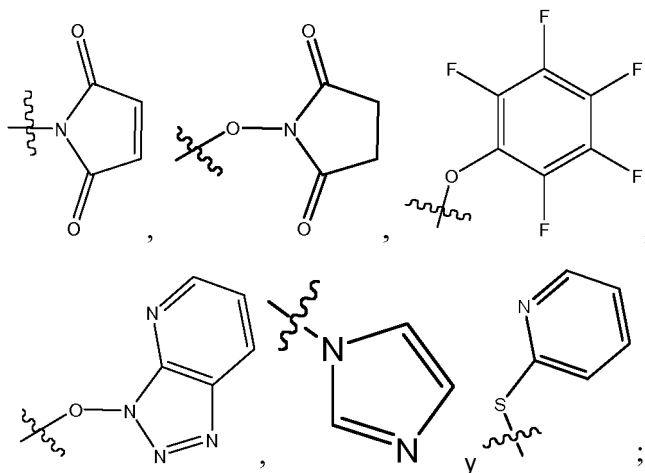
15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede estar sustituido opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

20 R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: -halógeno, -NR<sub>2</sub>,



25

L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

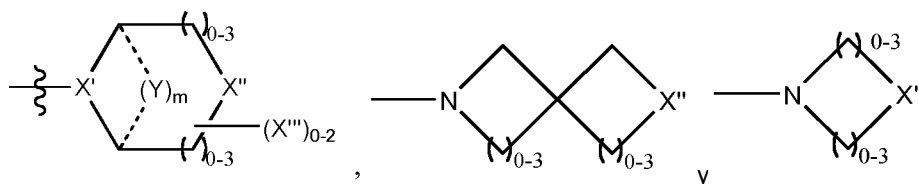
L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

30 -O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub>, o L<sup>2A</sup> está ausente;

35 L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

40 L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbocicliil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se unen para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace, -alquilen C<sub>1-6</sub>-, -carbocicilil C<sub>3-8</sub>-, -heterocicilil C<sub>3-8</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-aril C<sub>6-14</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-heteroaril C<sub>5-14</sub>-;

5 cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbocicililo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbocicililo C<sub>3-10</sub>-, -heterocicililo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterocicililo C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>-, arilo C<sub>6-14</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

10 o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterocicililo C<sub>3-10</sub>, en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup>, en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

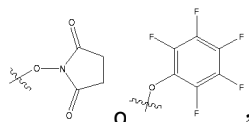
15 cada R<sup>14'</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace, -NR-, -carbocicilil C<sub>3-10</sub>-, -heterocicilil C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR', -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR- y -alquilen C<sub>1-6</sub>-, en el que R<sup>14'</sup> está opcionalmente sustituido con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

20 cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>;

25 cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1-8</sub>, heteroalquilo C<sub>1-8</sub> y arilo;

cada R'' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace y -alquilen C<sub>1-6</sub>-; y cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

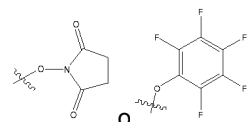
8. El compuesto o sal de la reivindicación 6 o 7, en la que: L<sup>1</sup> es



30 y L<sup>2A</sup>, L<sup>2B</sup>, L<sup>2C</sup> y L<sup>3</sup> están todos ausentes.

9. El compuesto o sal de la reivindicación 6 o 7, en la que: R<sup>6</sup> es -OH y R<sup>7</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre un halógeno.

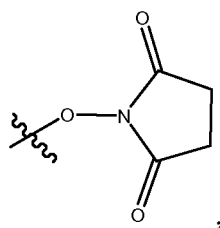
35 10. El compuesto o sal de la reivindicación 6 en la que: X<sup>2</sup> es -NH-, X<sup>1</sup> es -O-, R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup>, -OH o -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos forman epóxido, R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterocicililo C<sub>3-10</sub>, L<sup>1</sup> es



y L<sup>2A</sup>, L<sup>2B</sup>, L<sup>2C</sup> y L<sup>3</sup> están todos ausentes.

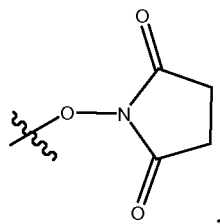
40 11. El compuesto o sal de la reivindicación 6, en la que: X<sup>2</sup> es -NH-, X<sup>1</sup> es -O-, R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup>, -OH o -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos forman epóxido, R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterocicililo C<sub>3-10</sub>, L<sup>1</sup> es un halógeno, L<sup>3</sup> es -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR, L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>- y L<sup>2B</sup> y L<sup>2C</sup> están ausentes.

12. El compuesto o sal de la reivindicación 6, en la que: R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup> o -OR, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> forman un epóxido, L<sup>3</sup> es -NR-NR- en el que cada R es hidrógeno o metilo o en el que los dos sustituyentes R forman juntos un anillo de 6 miembros, L<sup>1</sup> es un halógeno, -NR<sup>2</sup> o



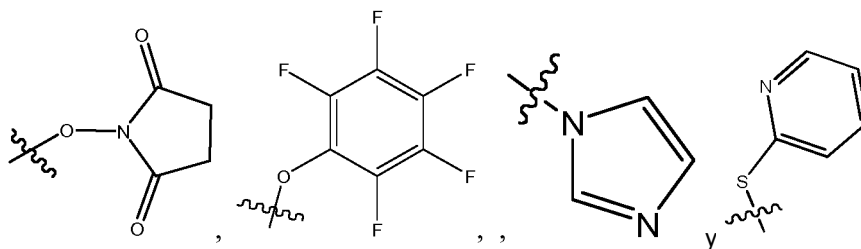
L<sup>2C</sup> es PABC, L<sup>2B</sup> es -Cit-Val-, y L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-.

13. El compuesto o sal de la reivindicación 6, en la que: R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup> o -OR, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> forman un epóxido, L<sup>3</sup> es -NR-NR- en el que cada R es hidrógeno o metilo o los dos sustituyentes R forman juntos un anillo de 6 miembros, L<sup>1</sup> es un halógeno, -NR<sup>2</sup> o

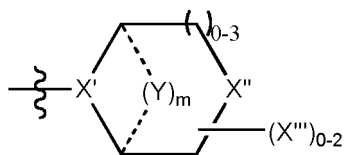


L<sup>2C</sup> está ausente; L<sup>2B</sup> es -Ala-Val- y L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>- o -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-.

14. El compuesto o sal de la reivindicación 6 o 7, en la que L<sup>1</sup> se selecciona entre: -halógeno, -NR<sub>2</sub>,



15. El compuesto o sal de la reivindicación 7, en la que: R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13'</sup>, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> es hidrógeno, R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, R<sup>13'</sup> es un enlace, L<sup>3</sup> es

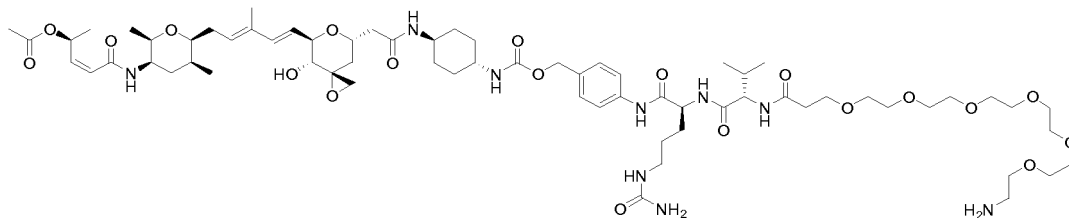
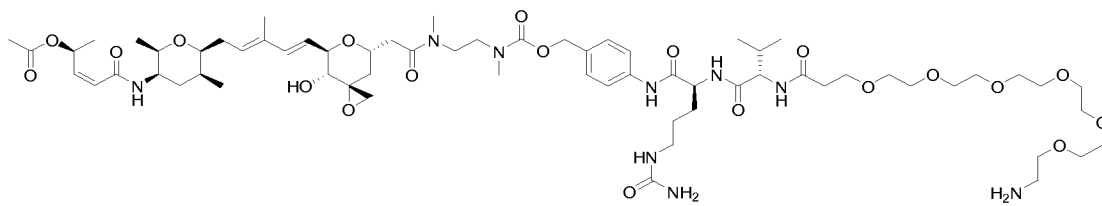
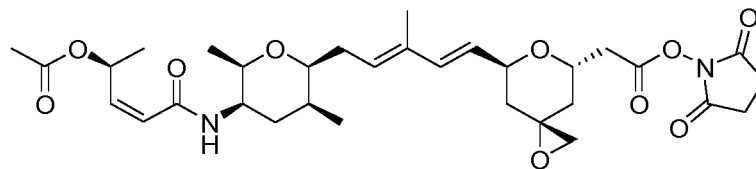
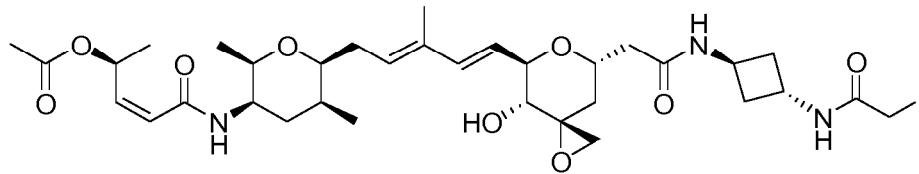
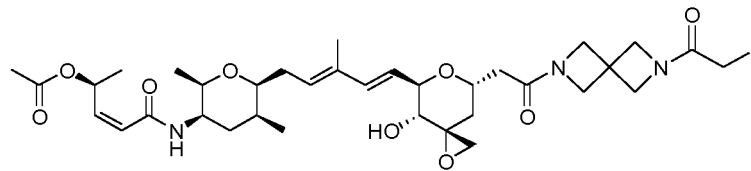
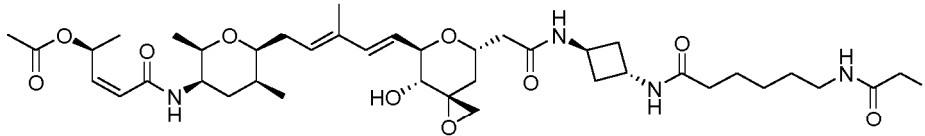
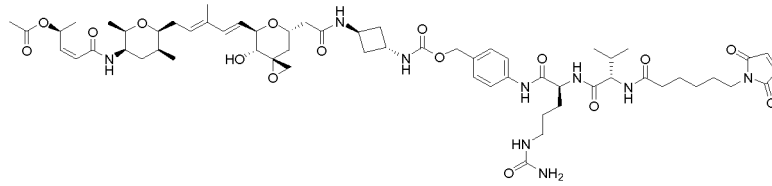


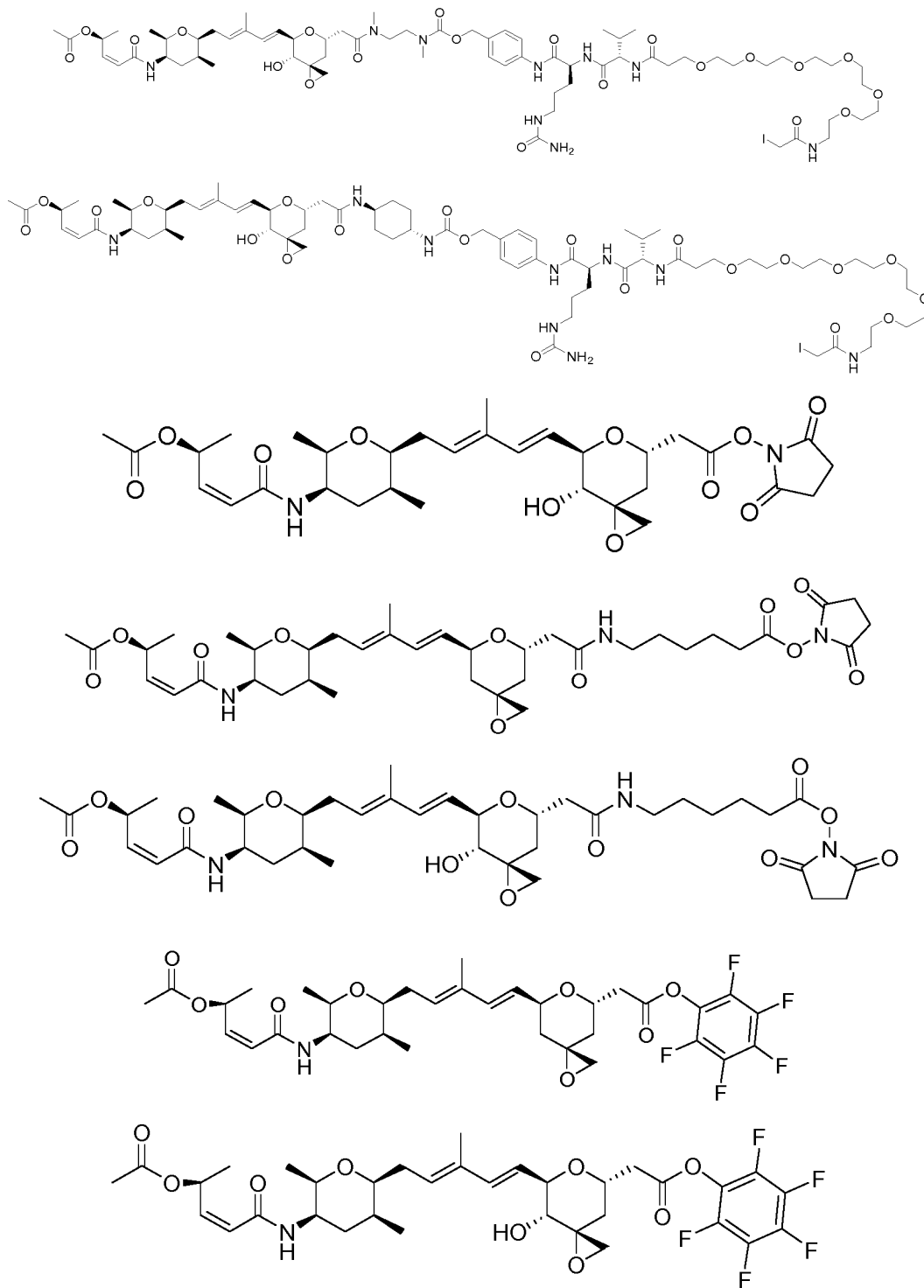
en la que m es 0, X' es N, X'' es -N- y X''' está ausente, L<sup>1</sup> es un halógeno, L<sup>2C</sup> es PABC, L<sup>2B</sup> es -Cit-Val- y L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-.

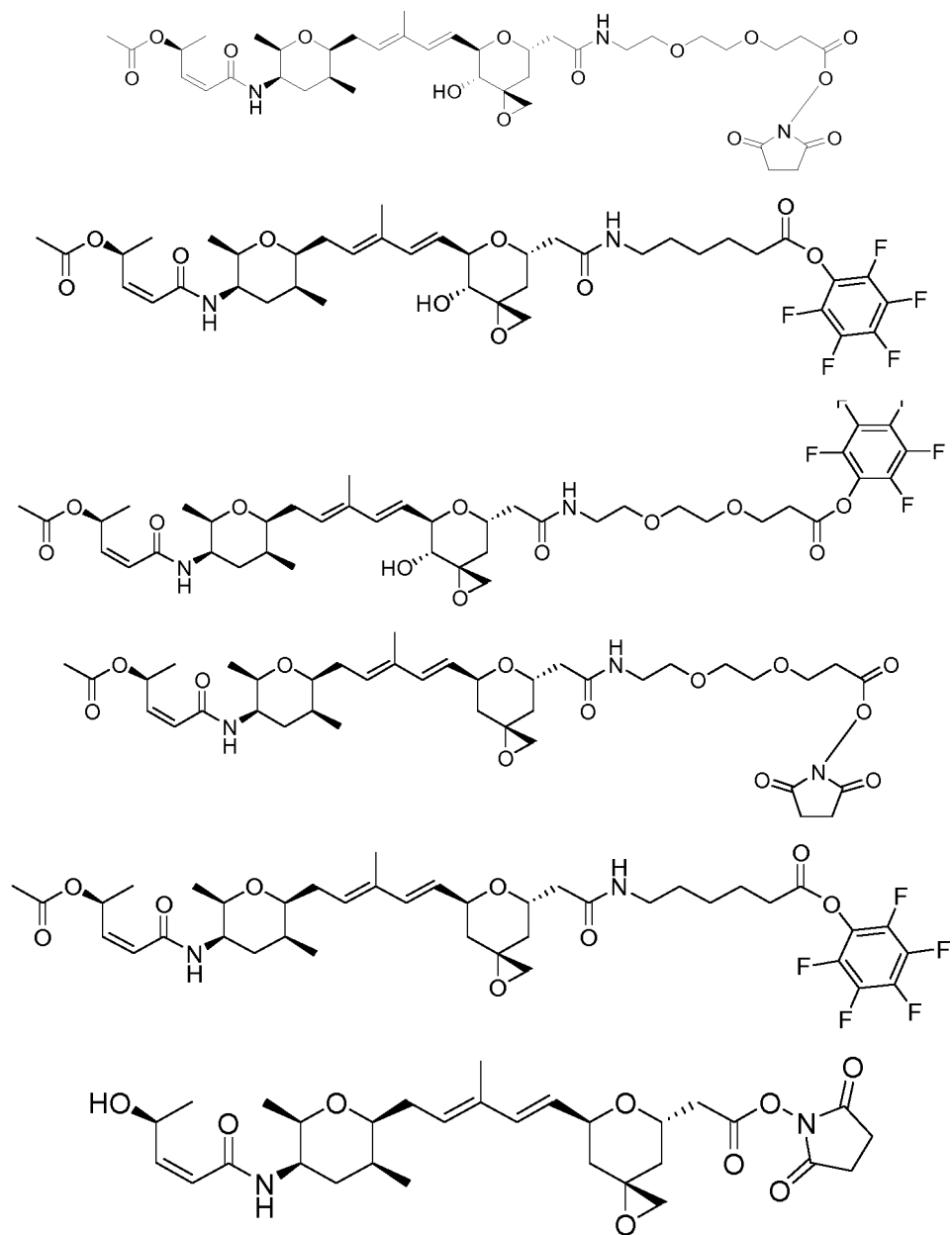
16. El compuesto o sal de la reivindicación 6, en la que: X<sup>1</sup> es -O-; X<sup>2</sup> es -NR-; R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>; R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>; R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>; R<sup>4</sup> es hidrógeno o -OR; R<sup>5</sup> es hidrógeno o -OR; R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> cada uno de se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, o R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede estar sustituido opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R; R<sup>8</sup> es hidrógeno o -OR; R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>; o, cada uno de R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbocicliilo C<sub>3-10</sub>, -heterocicliilo C<sub>3-10</sub>, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>; o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterocicliilo C<sub>3-10</sub>; en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR.

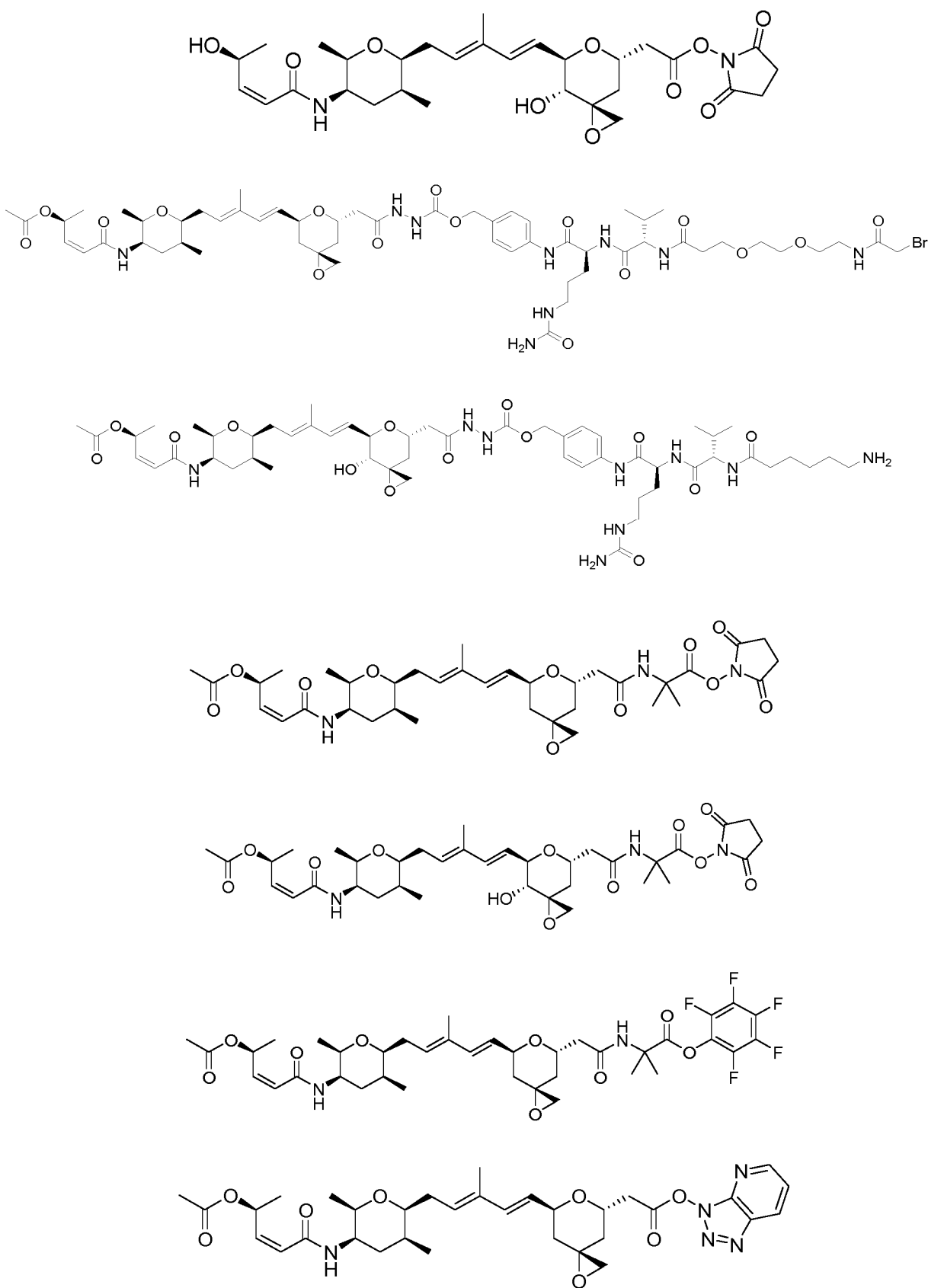


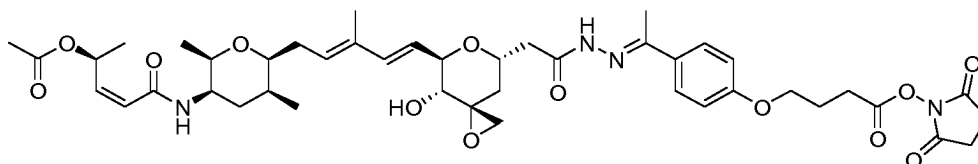
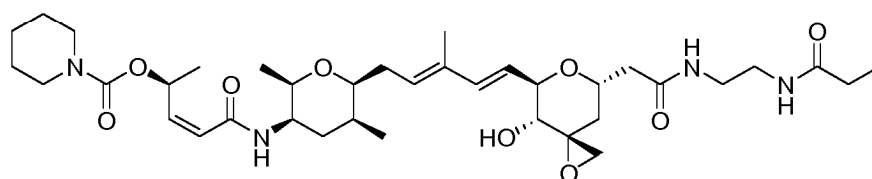
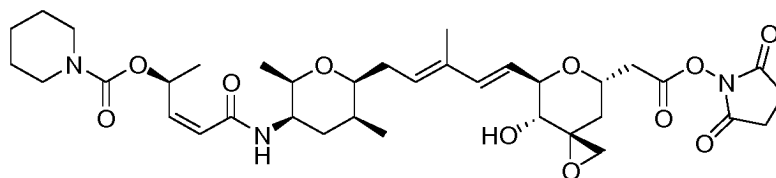
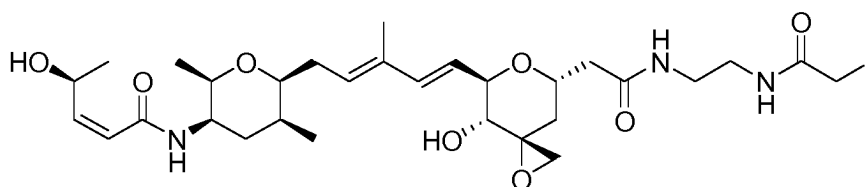
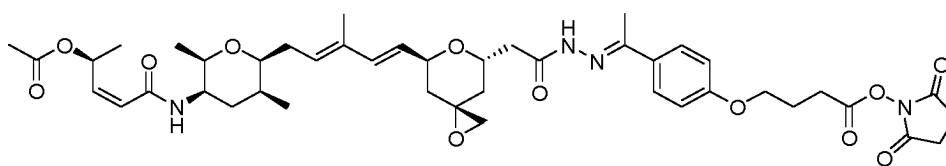
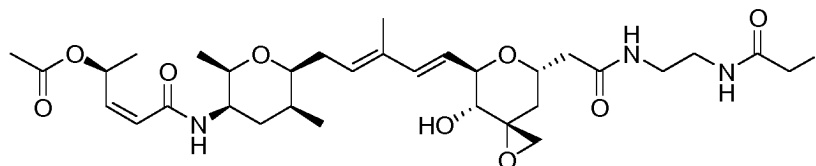
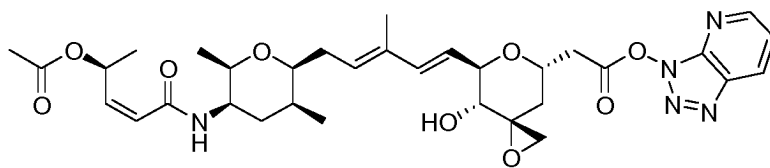
17. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, seleccionado entre el grupo que consiste en:

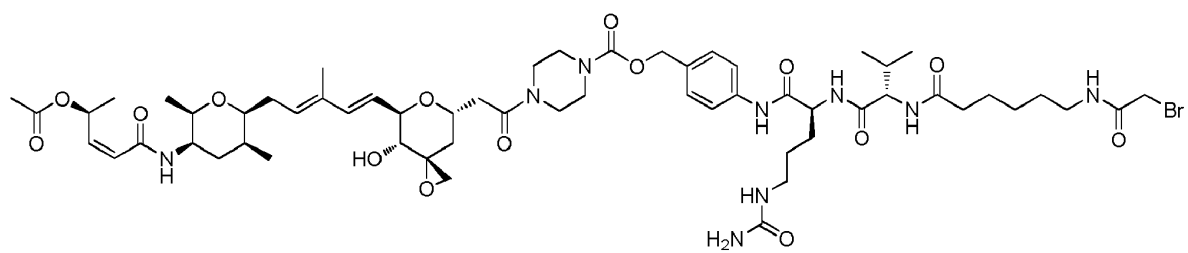
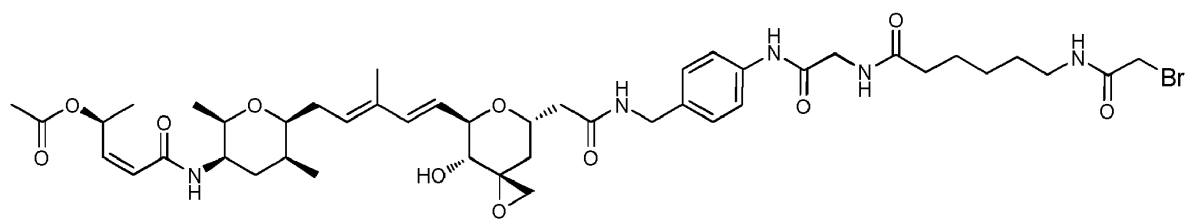
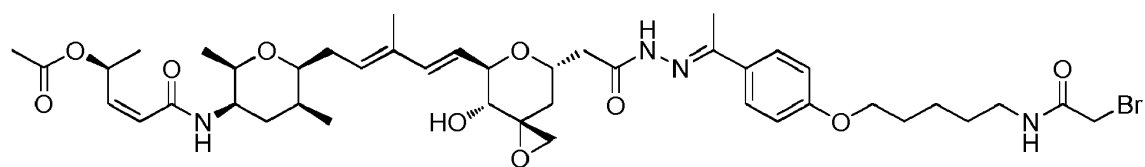
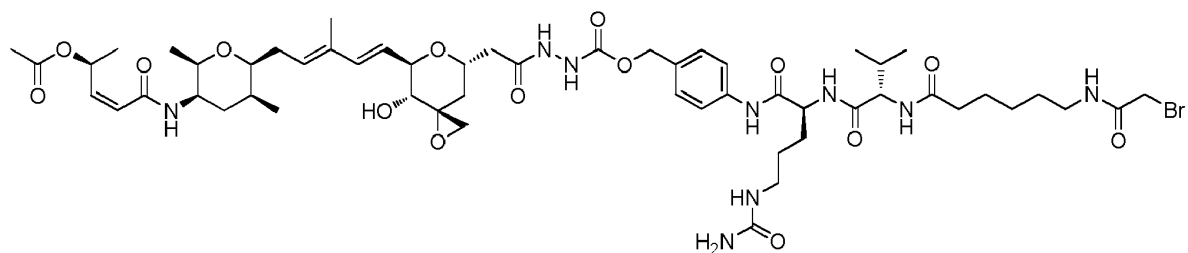
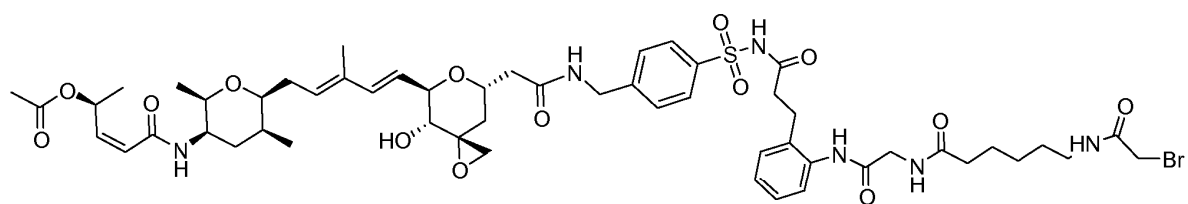
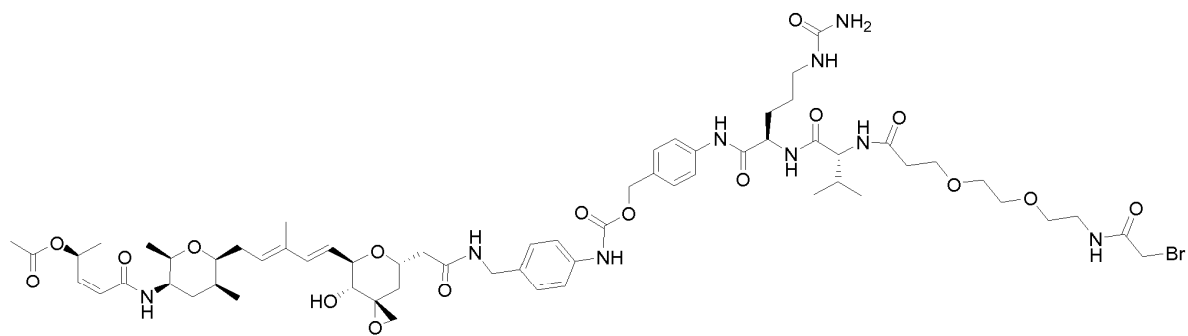


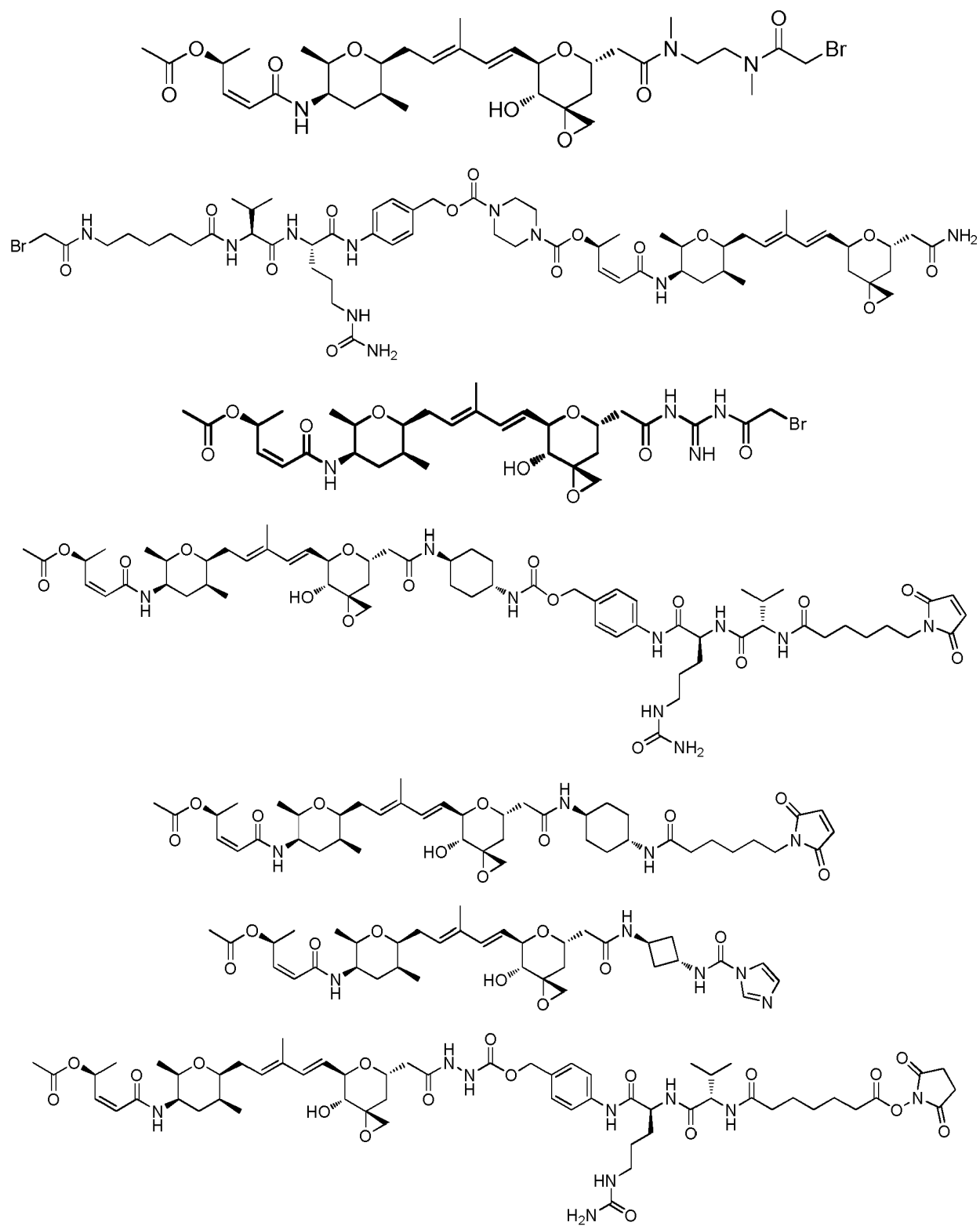


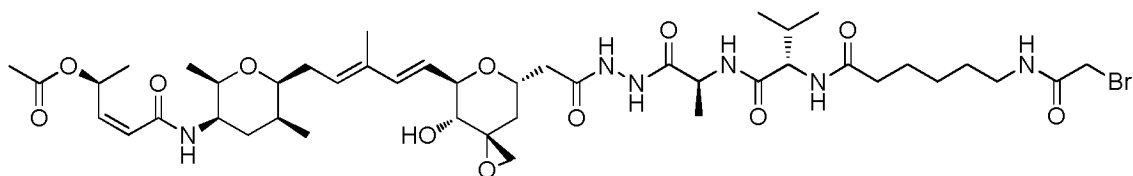
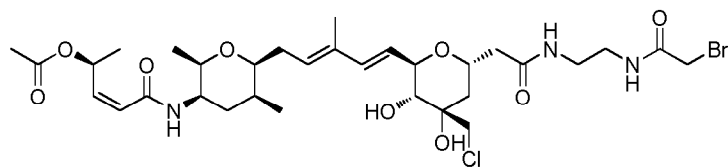
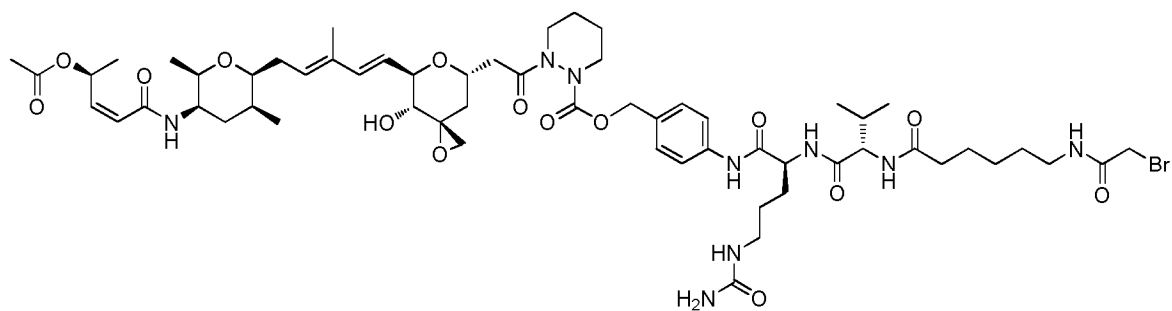
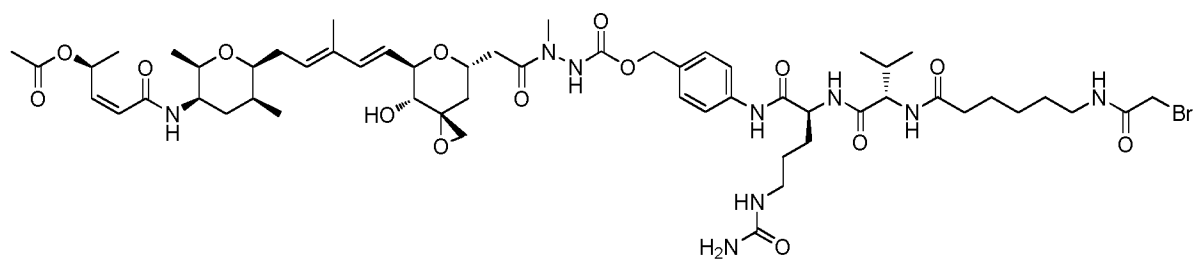
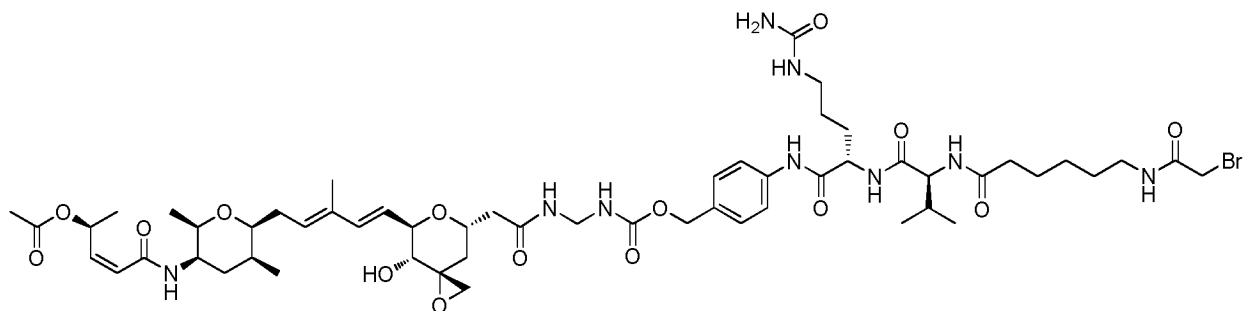
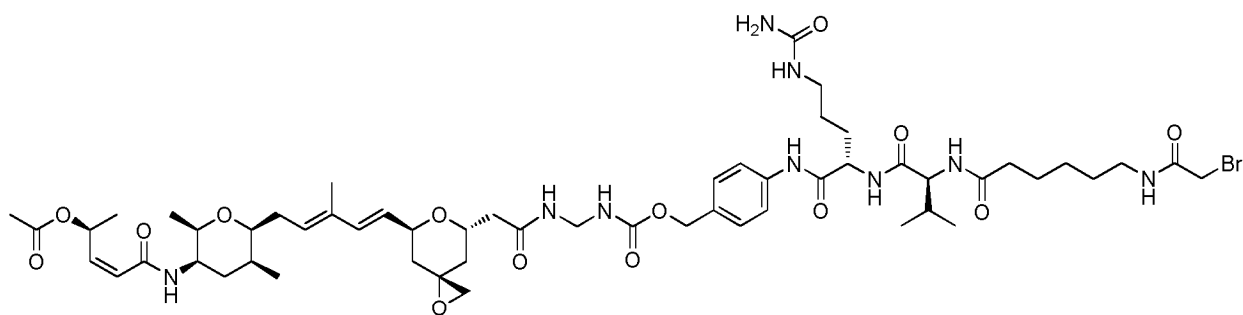




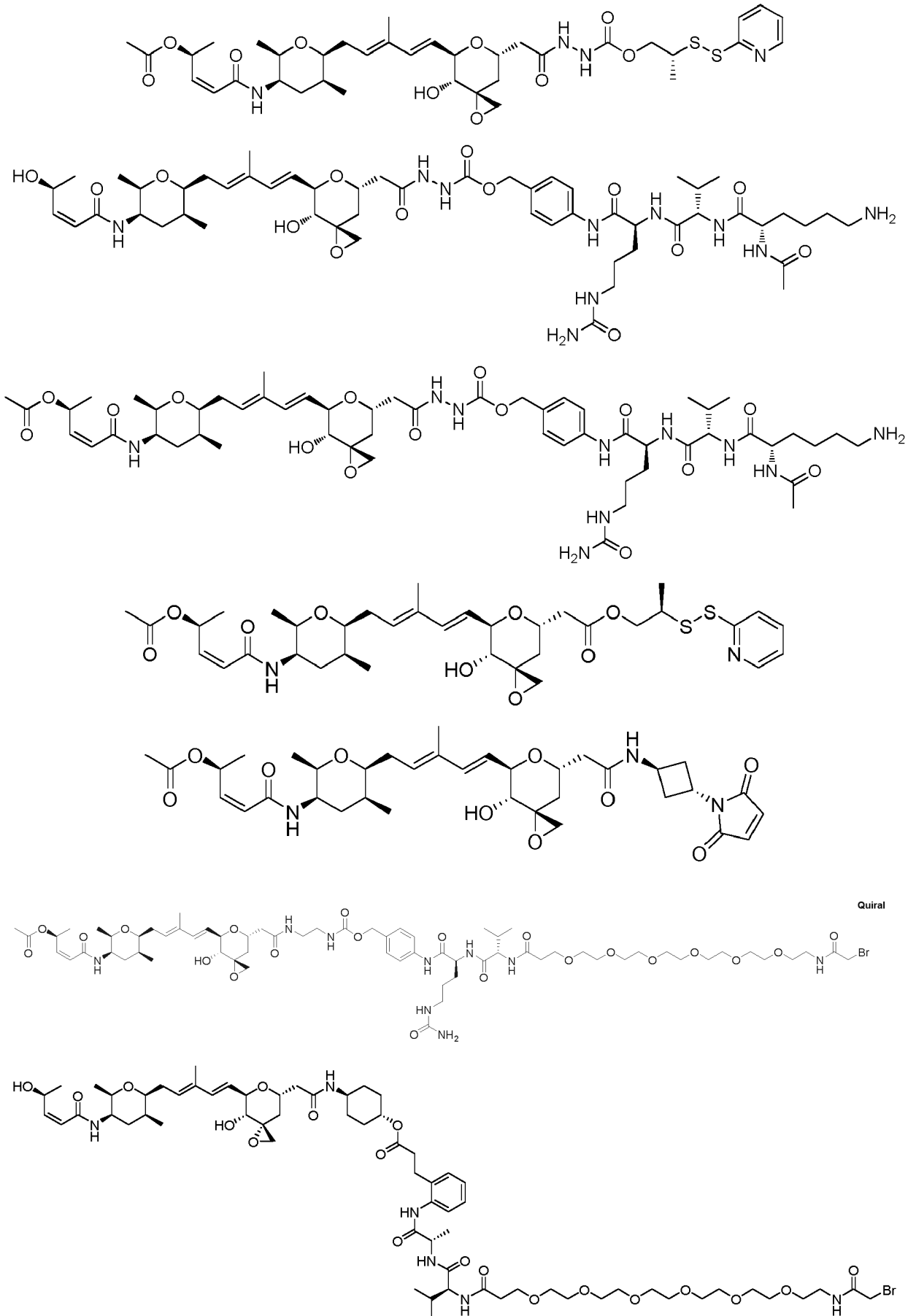




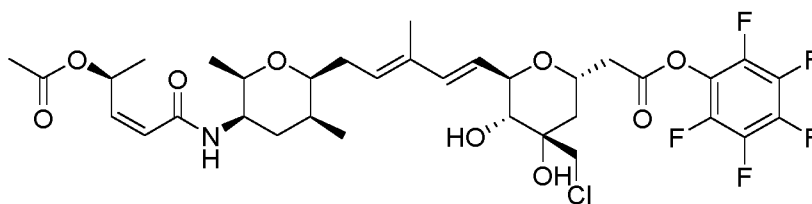






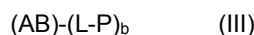


Quiral



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

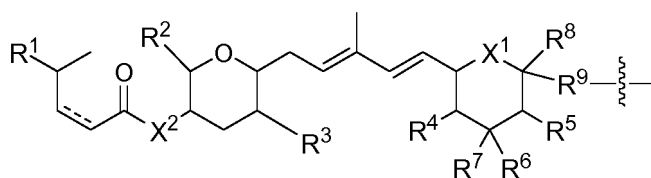
18. Un compuesto de fórmula (III):



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P;

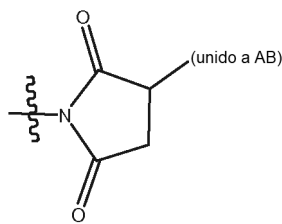
P es un radical de fórmula (I):



(I)

en la que:

- 10 una línea discontinua representa un enlace opcional;  
 AB es un anticuerpo;  
 cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;  
 cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;  
 cada X' es CR o N;
- 15 cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;  
 cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;  
 Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-;
- 20 R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -R, -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)NR(R<sup>15</sup>), =O (doble enlace al oxígeno) y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>;
- R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;
- R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;
- 25 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,
- R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,
- R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o
- 30 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede estar sustituido opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;
- R<sup>9</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;
- 35 R<sup>9</sup> es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-;
- L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

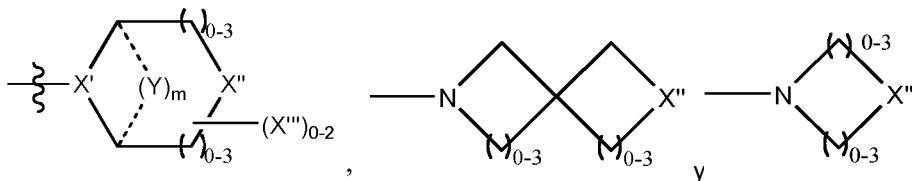
L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

5  
-O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub> o L<sup>2A</sup> está ausente;

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

15  
L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se unen para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

20  
R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-8</sub>, heterociclilo C<sub>3-8</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub>, alquil C<sub>1-6</sub>-heteroarilo C<sub>5-14</sub>, en el que R<sup>13</sup> está opcionalmente sustituido con -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR;

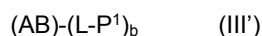
25  
cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbociclilo C<sub>3-10</sub>, -heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>, arilo C<sub>6-14</sub>, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

30  
o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>, en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup>, en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

35  
cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>; y b es 1-20; y

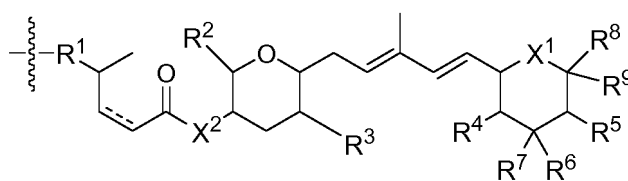
cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

19. Un compuesto de fórmula (III'):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

40  
L es el resto de engarce L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>, en el que L<sup>3</sup> está unido a P';  
P' es un radical de fórmula (I)';



(I')

en la que:

una línea discontinua representa un enlace opcional;

AB es un anticuerpo;

5 cada X<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X<sup>2</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: -O-, -S- y -NR-;

cada X' es CR o N;

10 cada X'' es CH-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-NR-, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR-C(O)- o N- si X'' se une a L<sup>2</sup> o a un adicional L<sup>3</sup>, o por el contrario es O, S, CRR, CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o NRR;

cada X''' es -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR- o CR-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O- si X''' se une a L<sup>2</sup>, o por el contrario es R;

Y es -C(R)<sub>2</sub>-, -O-, -NR- o -S-; R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en: -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -OR'', -OCOR<sup>13</sup>, -OCONRR<sup>14</sup>, -OCON(R<sup>14</sup>)N(R<sup>15</sup>)- y -NR<sup>14</sup>.

15 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, -OR, -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y oxo;

15 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo y halógeno,

20 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un alquilideno C<sub>2-5</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre R,

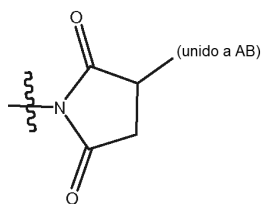
R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos son oxo, o

25 R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5 miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede estar sustituido opcionalmente con uno a tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R;

R<sup>8</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> o -OR;

R<sup>9</sup> se selecciona independientemente entre -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)OR, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>-(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)-SR y -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NR<sup>14</sup>N(R)R<sup>15</sup>;

L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y



30

L<sup>2</sup> es L<sup>2A</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2C</sup> o L<sup>2C</sup>-L<sup>2B</sup>-L<sup>2A</sup> en el que:

L<sup>2A</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre:

35 -O-, -C(O)-, -C(O)NR-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-, -C(O)NRalquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-C(O)-, -alquil C<sub>1-6</sub>-S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-, -N=CR-fenil-O-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-(NR-C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>1-4</sub>-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquil C<sub>1-6</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -O-alquil C<sub>1-6</sub>-S-, -C(O)-O-alquil C<sub>1-6</sub>-S- y -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>1-20</sub> o L<sup>2A</sup> está ausente;

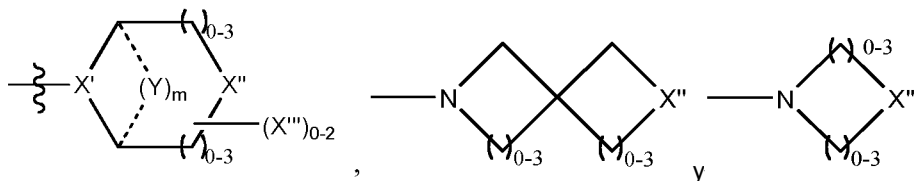
40

L<sup>2B</sup> se selecciona entre AA<sub>0-aa</sub>, en el que AA es un aminoácido natural o no natural y aa es 12; y

L<sup>2C</sup> comprende uno o más componentes seleccionados entre: -PABA- y -PABC-, o L<sup>2C</sup> está ausente;

L<sup>3</sup> se selecciona entre uno o más de: -alquil C<sub>1-6</sub>-, -NR-C<sub>3</sub>-heterociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-C<sub>3</sub>-carbociclil C<sub>8</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR-, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-, -S-, -NR-, -NR-NR- y NR-C(O)-NR- en el que los dos grupos R opcionalmente se unen para formar un anillo de 4-10 miembros, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-NR-, -NR-alquilfenil C<sub>1-6</sub>-SO<sub>2</sub>-NR-, -SO<sub>2</sub>-

, -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-fenil-C(O)-,



o L<sup>3</sup> está ausente;

R<sup>13</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en un enlace, -alquilen C<sub>1-6</sub>-, -carbocicliil C<sub>3-8</sub>-, -heterocicliil C<sub>3-8</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-aril C<sub>6-14</sub>-, -alquil C<sub>1-6</sub>-heteroaril C<sub>5-14</sub>-;

cada R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno, hidroxilo, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-carbocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -heterocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-heterocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NRR, -alquilo C<sub>1-6</sub>-, arilo C<sub>6-14</sub>-, -alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>;

o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterocicliilo C<sub>3-10</sub>,

en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>

R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv)

arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-

SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -C(O)OR, (x) -

cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -OR, (xiii)

-N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

cada R<sup>14</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace, -NR-, -carbocicliil C<sub>3-10</sub>-

-, -heterocicliil C<sub>3-10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OR', -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR- y -alquilen C<sub>1-6</sub>-, en el que R<sup>14</sup>

está opcionalmente sustituido con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre

(i) -NRR, (ii) -C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de

halógeno, -CF<sub>3</sub>, -NRR o -SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix)

-C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R,

(xii) -OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR;

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: hidrógeno y -alquilo C<sub>1-6</sub>;

cada R' se selecciona independientemente entre -H, alquilo C<sub>1-6</sub>-, heteroalquilo C<sub>1-6</sub> y arilo;

cada R'' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un enlace y -alquilen C<sub>1-6</sub>-; y

b es 1-20; y

cada m es independientemente 0, 1, 2 o 3.

20. El compuesto o sal de la reivindicación 18, en la que: X<sup>1</sup> es -O-; X<sup>2</sup> es -NR-; R<sup>1</sup> se selecciona entre el grupo que

consiste en: -OR, -OCOR<sup>13</sup>, -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y -NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>; R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>; R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>; R<sup>4</sup> es hidrógeno o -OR;

R<sup>5</sup> es hidrógeno o -OR; R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> cada uno de se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en:

hidroxilo y alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre

halógeno, o R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un resto heterocicloalquilo de 3 a 5

miembros que comprende 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en

oxígeno, nitrógeno y azufre, en el que dicho resto heterocicloalquilo puede estar sustituido opcionalmente con uno a

tres sustituyentes seleccionados independientemente entre R; R<sup>8</sup> es hidrógeno o -OR; R<sup>13</sup> se selecciona entre el

grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>; o, cada uno de R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se selecciona independientemente entre el

grupo que consiste en: hidrógeno, -NRR, -NRNR<sub>2</sub>, -carbocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -heterocicliilo C<sub>3-10</sub>-, -alquilo C<sub>1-6</sub>-, arilo C<sub>6-14</sub>-,

-alquilen C<sub>1-6</sub>-arilo C<sub>6-14</sub> y -heteroarilo C<sub>5-14</sub>-; o R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman

un anillo heterocicliilo C<sub>3-10</sub>; en el que R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> o ambos, o un anillo formado con R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, están opcionalmente

sustituidos con -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>18</sup> en el que cada R<sup>18</sup> se selecciona independientemente entre (i) -NRR, (ii) -

C(NRR)(C(O)OR), (iii) -S-R, (iv) arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con uno o más de halógeno, -CF<sub>3</sub>, -

(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NRR o -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-SO<sub>2</sub>NRR, (v) -SO<sub>2</sub>R, (vi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-C(O)OR, (vii) -SO<sub>2</sub>NRR, (viii) -C(O)NRR, (ix) -

C(O)OR, (x) -cicloalquilo C<sub>4-6</sub> opcionalmente sustituido con -NRR, -SO<sub>2</sub>NRR o -NR-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>0-6</sub>NRR, (xi) -R, (xii) -

OR, (xiii) -N(R)NRR, (xiv) -C(O)N(R)NRR, (xv) -(C(R)<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-NRR y (xvi) -S-S-alquil C<sub>1-6</sub>-NRR.

21. El compuesto o sal de la reivindicación 18, en la que: X<sup>2</sup> es -NH-, X<sup>1</sup> es -O-, R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup>, OH o -OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>,

R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos forman epóxido, R<sup>13</sup> es

alquilo C<sub>1-6</sub>, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterocicliilo C<sub>3-10</sub>, L<sup>1</sup> se

selecciona entre: un enlace a AB y -NR-(unido a AB), y L<sup>2A</sup>, L<sup>2B</sup>, L<sup>2C</sup> y L<sup>3</sup> están todos ausentes.

22. El compuesto o sal de la reivindicación 18, en la que: X<sup>2</sup> es -NH-, X<sup>1</sup> es -O-, R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup>, OH o -

OCONR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos forman

epóxido, R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo

heterocicliilo C<sub>3-10</sub>, L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB y -NR-(unido a AB), y L<sup>3</sup> es -NR-alquil C<sub>1-6</sub>-NR con R

siendo hidrógeno y el grupo alquilo siendo etilo, L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquil C<sub>1-6</sub>- y L<sup>2B</sup> y L<sup>2C</sup> están ausentes.

23. El compuesto o sal de la reivindicación 18, en la que: X<sup>2</sup> es NH-, X<sup>1</sup> es -O-, R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup>, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es

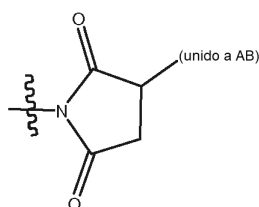
metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> juntos forman epóxido, R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub>, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup>, junto con el átomo o átomos a los que están unidos, forman un anillo heterociclilo C<sub>3-10</sub>, L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB y -NR-(unido a AB), L<sup>3</sup> es -NR-alquilo C<sub>1-6</sub>-NR con R siendo hidrógeno y el grupo alquilo siendo etilo, L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub>- y L<sup>2B</sup> y L<sup>2C</sup> están ausentes.

5 24. El compuesto o sal de la reivindicación 18, en la que: R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup> o -OR, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> forman un epóxido, L<sup>3</sup> es -NR-NR- en el que cada R es hidrógeno o metilo o los dos sustituyentes R forman juntos un anillo de 6 miembros, L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB, L<sup>2C</sup> es PABC, L<sup>2B</sup> es -Cit-Val-, y L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub>-NRC(O)alquilo C<sub>1-6</sub>-.

10 25. El compuesto o sal de la reivindicación 18, en la que: R<sup>1</sup> es -OCOR<sup>13</sup> o -OR, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>4</sup> es -OH, R<sup>5</sup> es hidrógeno, R<sup>8</sup> es hidrógeno, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> forman un epóxido, L<sup>3</sup> es -NR-NR- en el que cada R es hidrógeno o metilo o los dos sustituyentes R forman juntos un anillo de 6 miembros, L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB y -NR-(unido a AB), L<sup>2C</sup> es PABC, L<sup>2B</sup> es -Cit-Val-, y L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub>-C(O)- o -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub>-.

26. El compuesto o sal de la reivindicación 18 o 19, en la que: L<sup>2C</sup> está ausente; L<sup>2B</sup> es -Ala-Val- y L<sup>2A</sup> es -C(O)-alquilo C<sub>1-6</sub>- NRC(O)alquilo C<sub>1-6</sub>-.

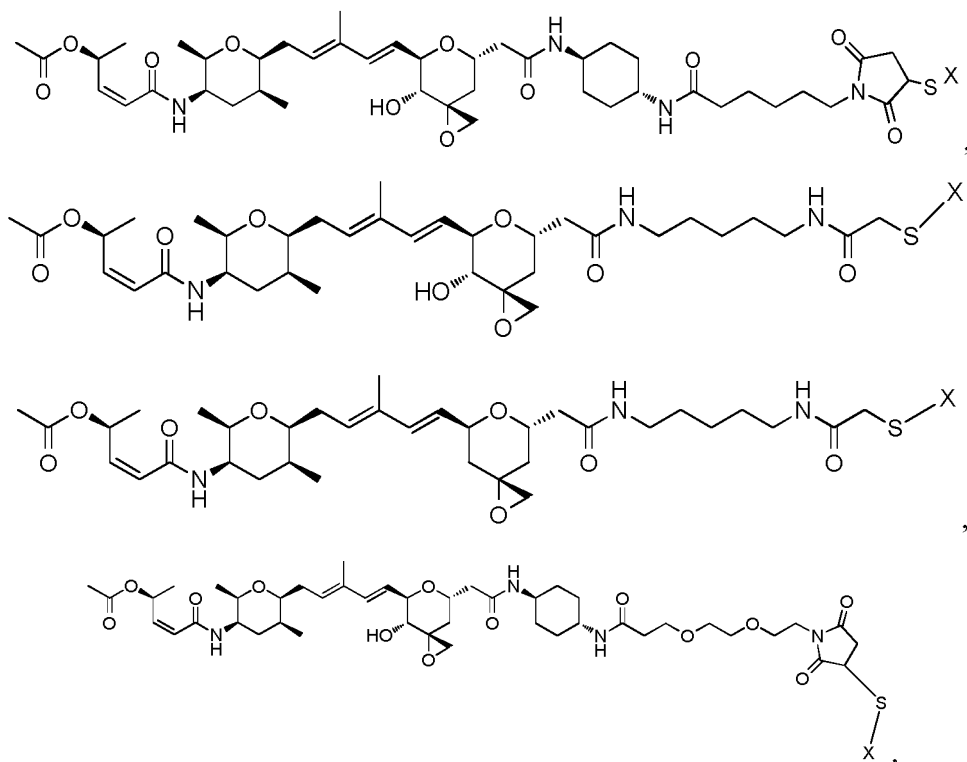
15 27. El compuesto o sal de la reivindicación 18 o 19, en la que: L<sup>1</sup> se selecciona entre: un enlace a AB, -NR-(unido a AB) y

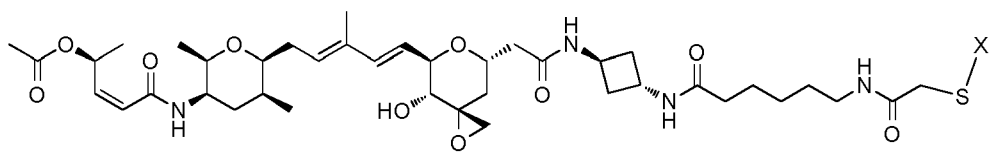
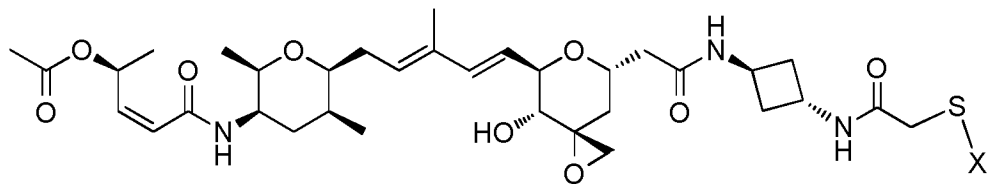
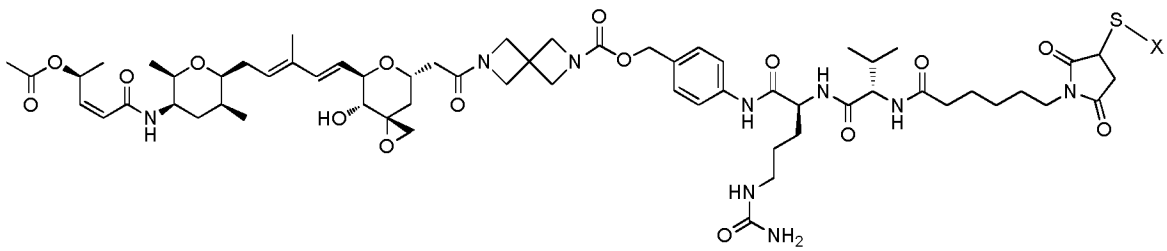
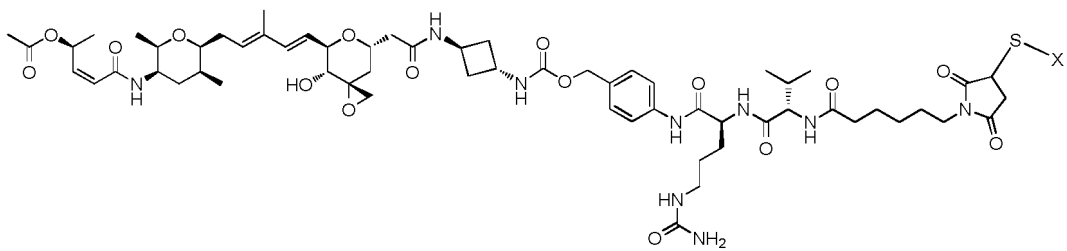
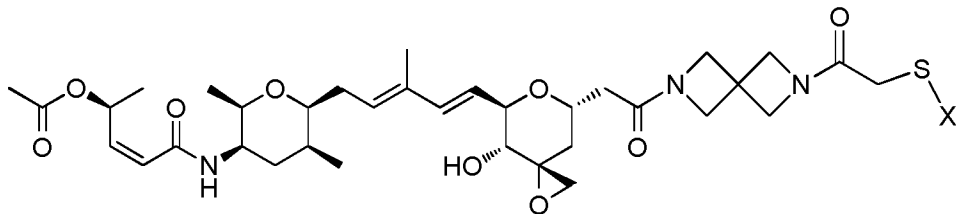
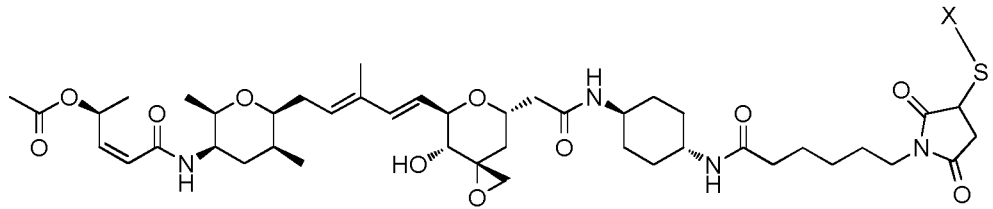
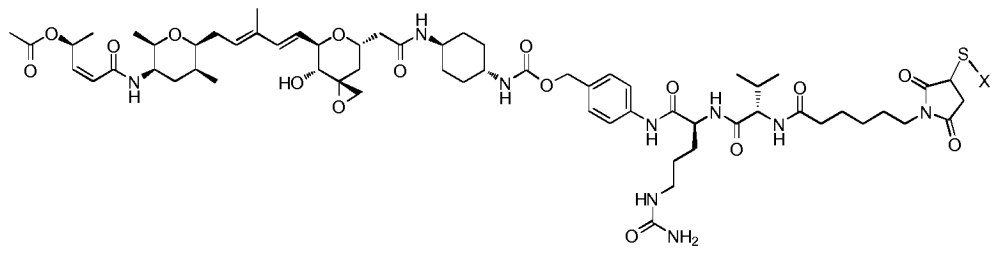


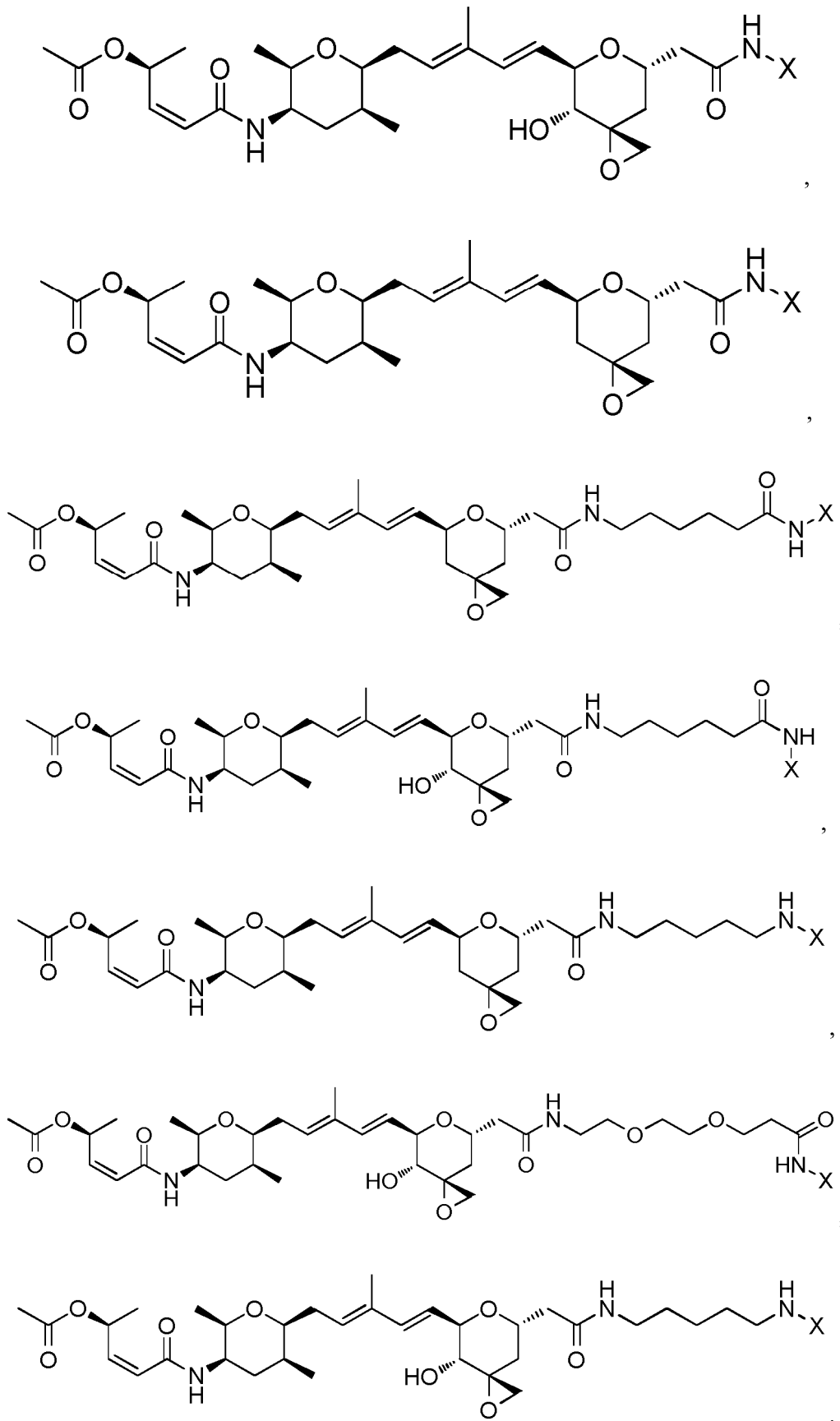
28. El compuesto o la sal de la reivindicación 18 o 19, en el que el anticuerpo se selecciona entre trastuzumab y el trastuzumab mutante K392C+L443C.

20 29. El compuesto o la sal de la reivindicación 18 o 19, en el que el anticuerpo se une mediante un polipéptido que contiene Fc o que contiene Fab diseñado mediante ingeniería genética con una etiqueta que contiene una glutamina donante de acilo o una glutamina endógena preparada reactiva mediante el polipéptido diseñado mediante ingeniería genética en la presencia de transglutaminasa.

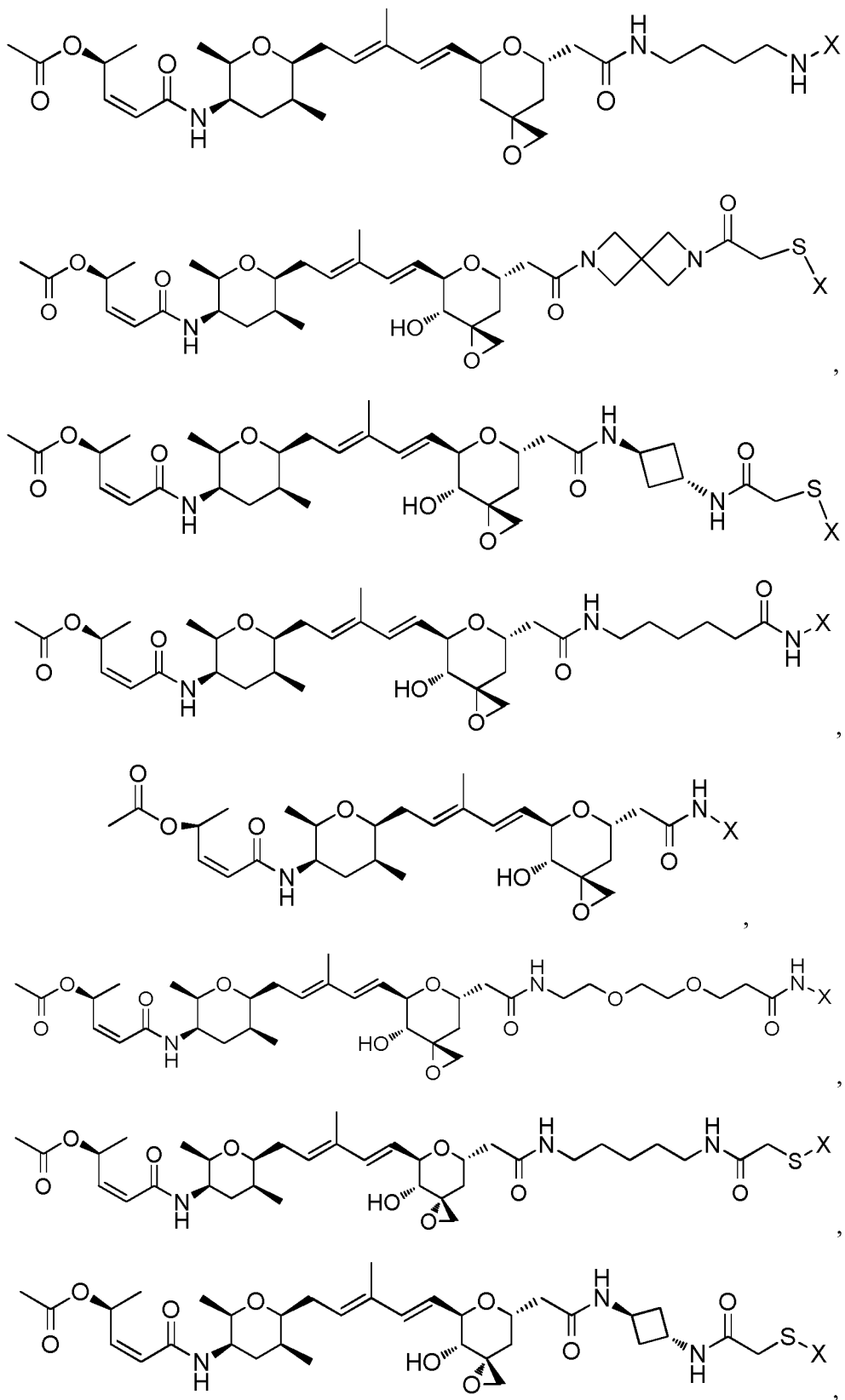
30. El compuesto de la reivindicación 18 o la reivindicación 19, seleccionado entre el grupo que consiste en:

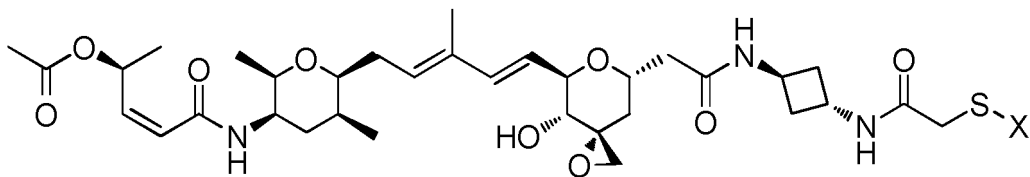
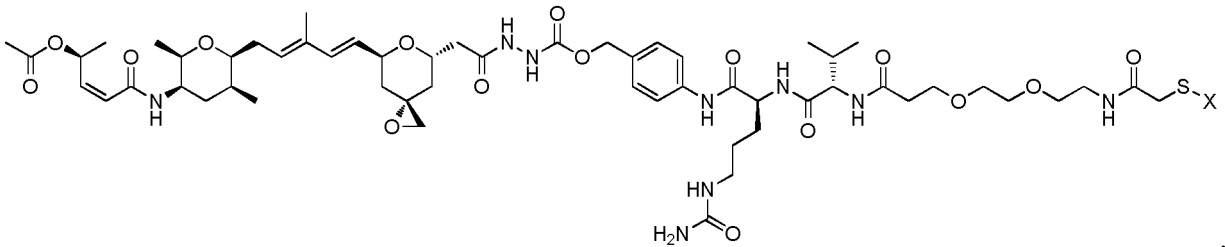
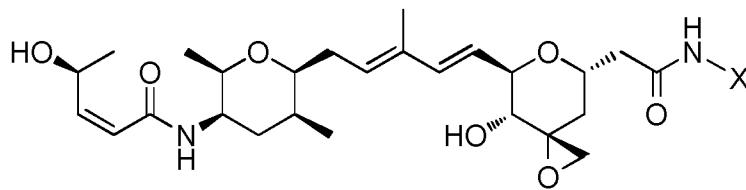
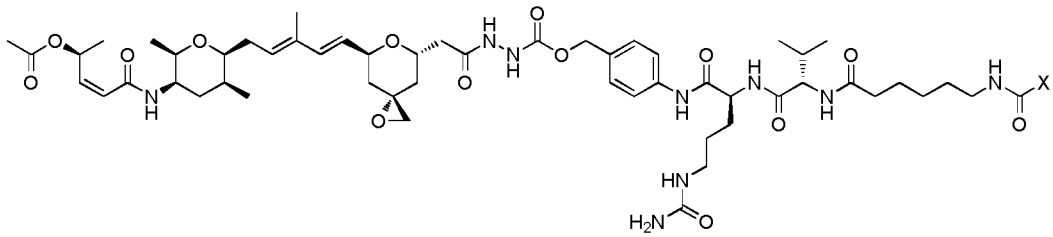
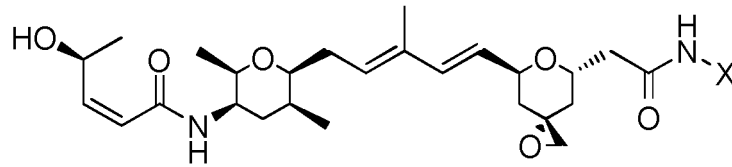
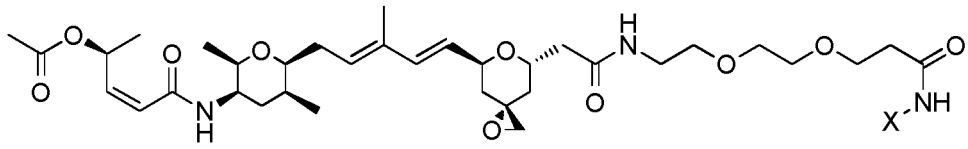


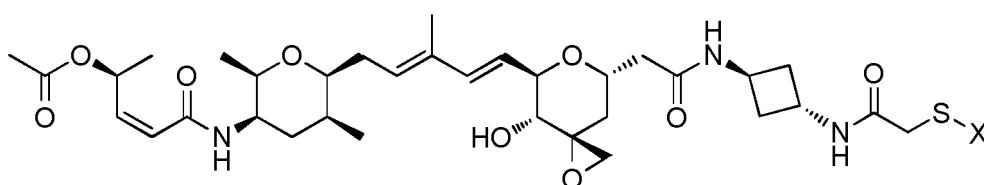
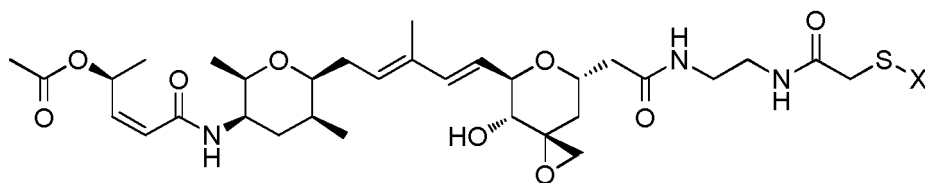
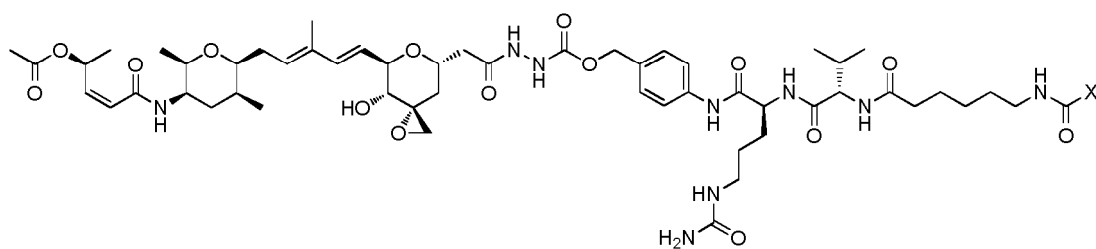
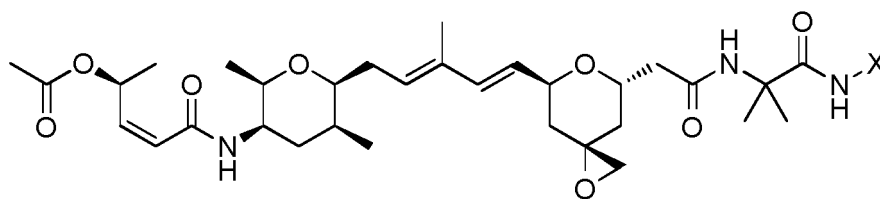
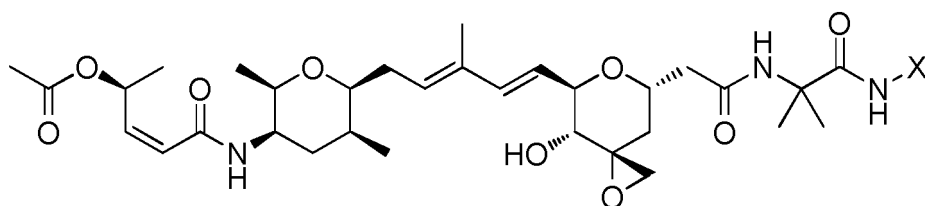
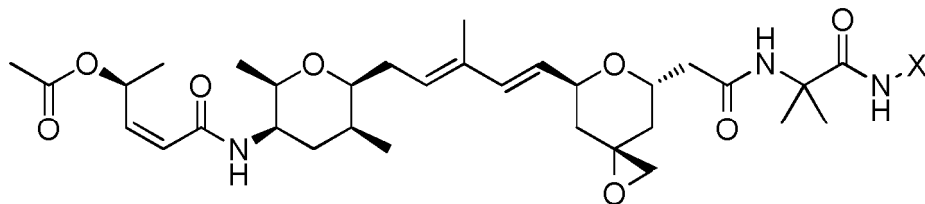
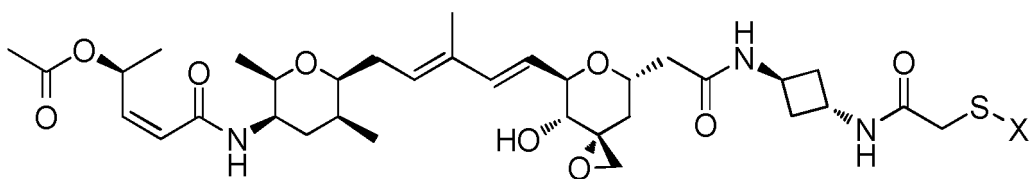


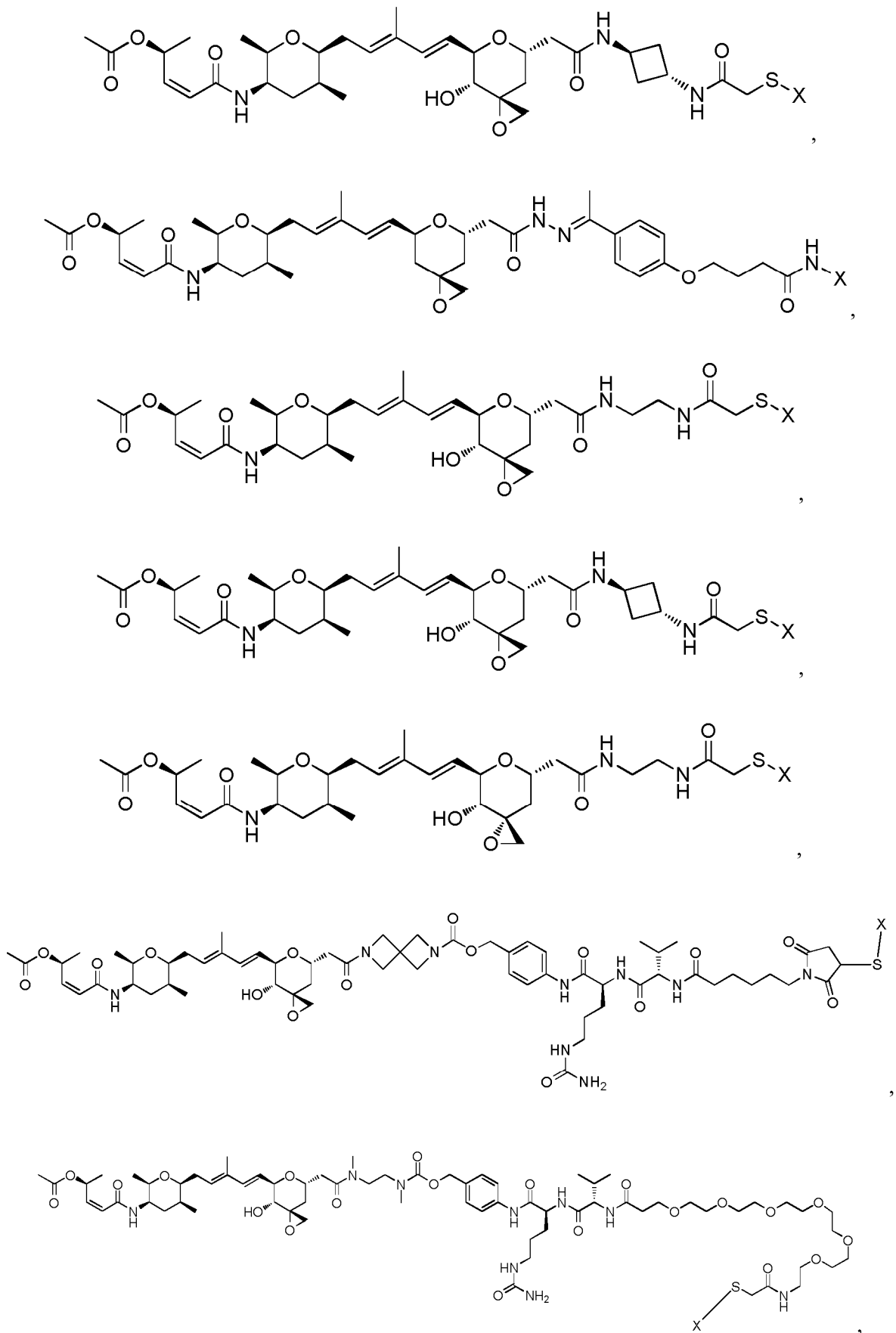


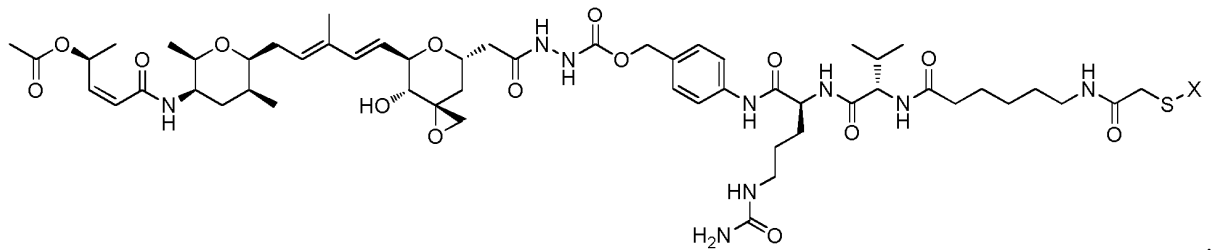
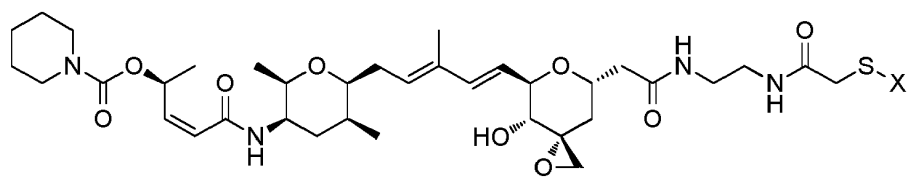
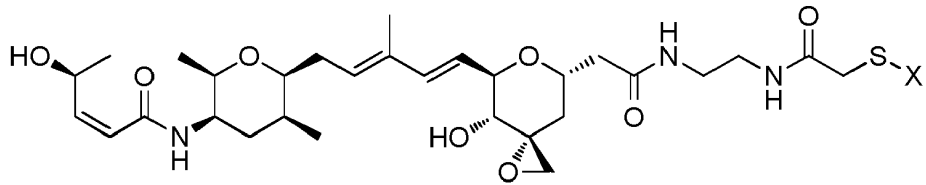
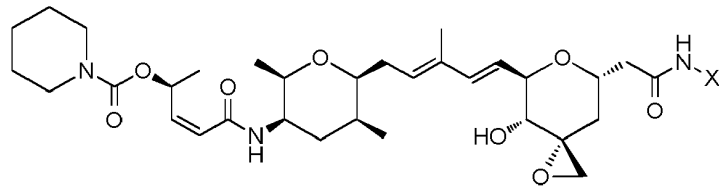
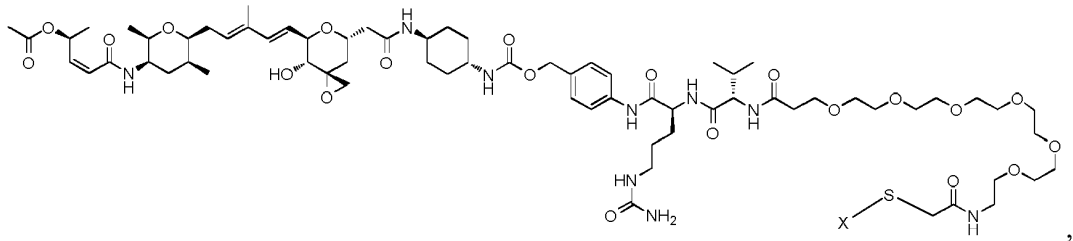
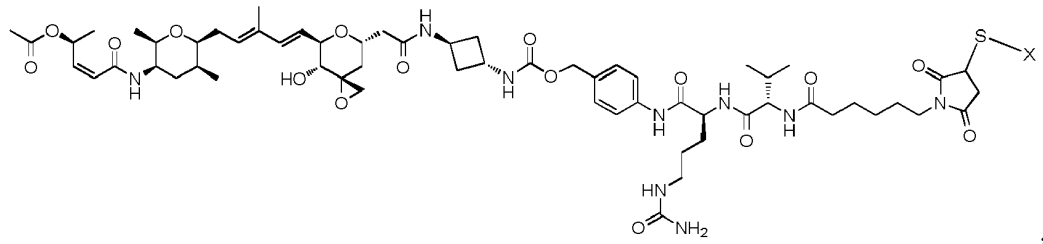


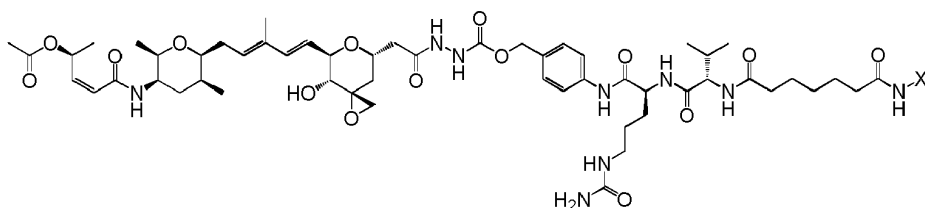
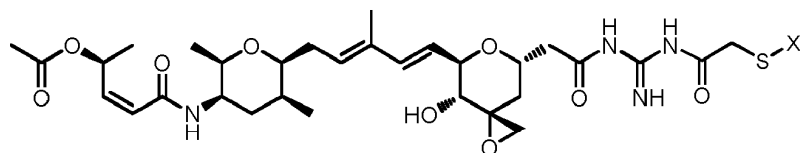
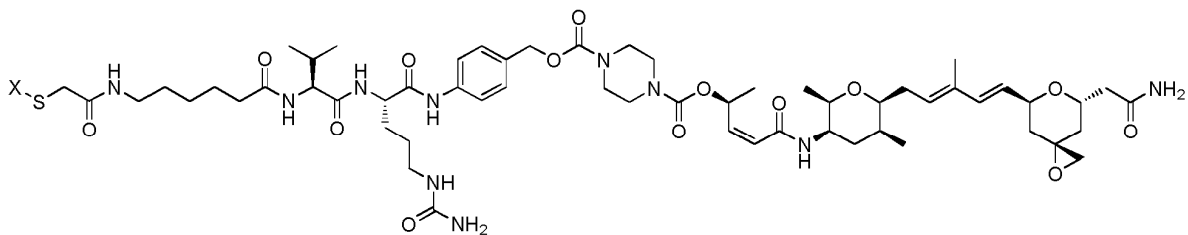
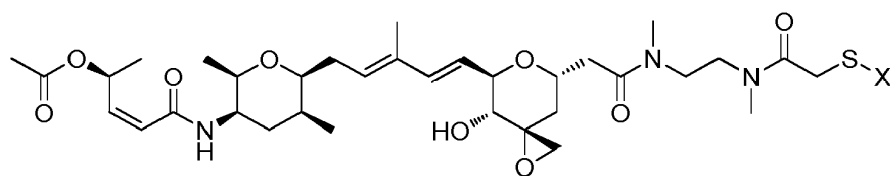
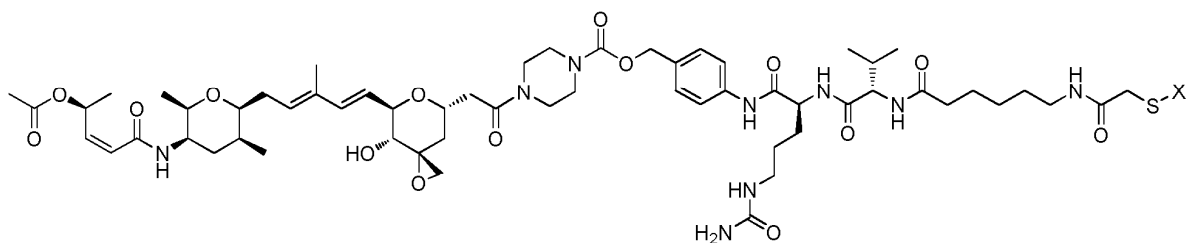
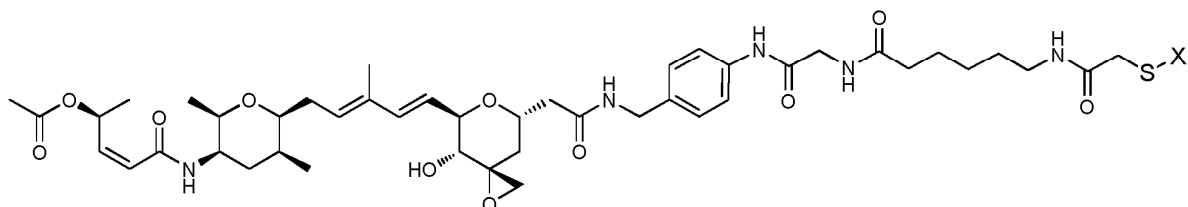
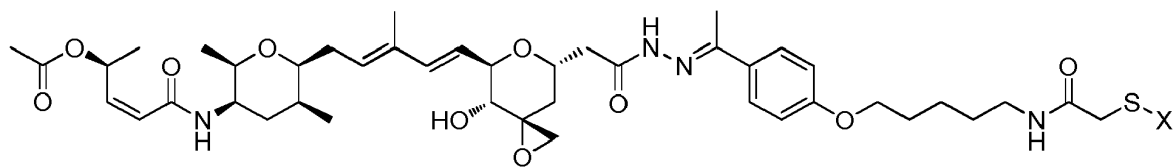


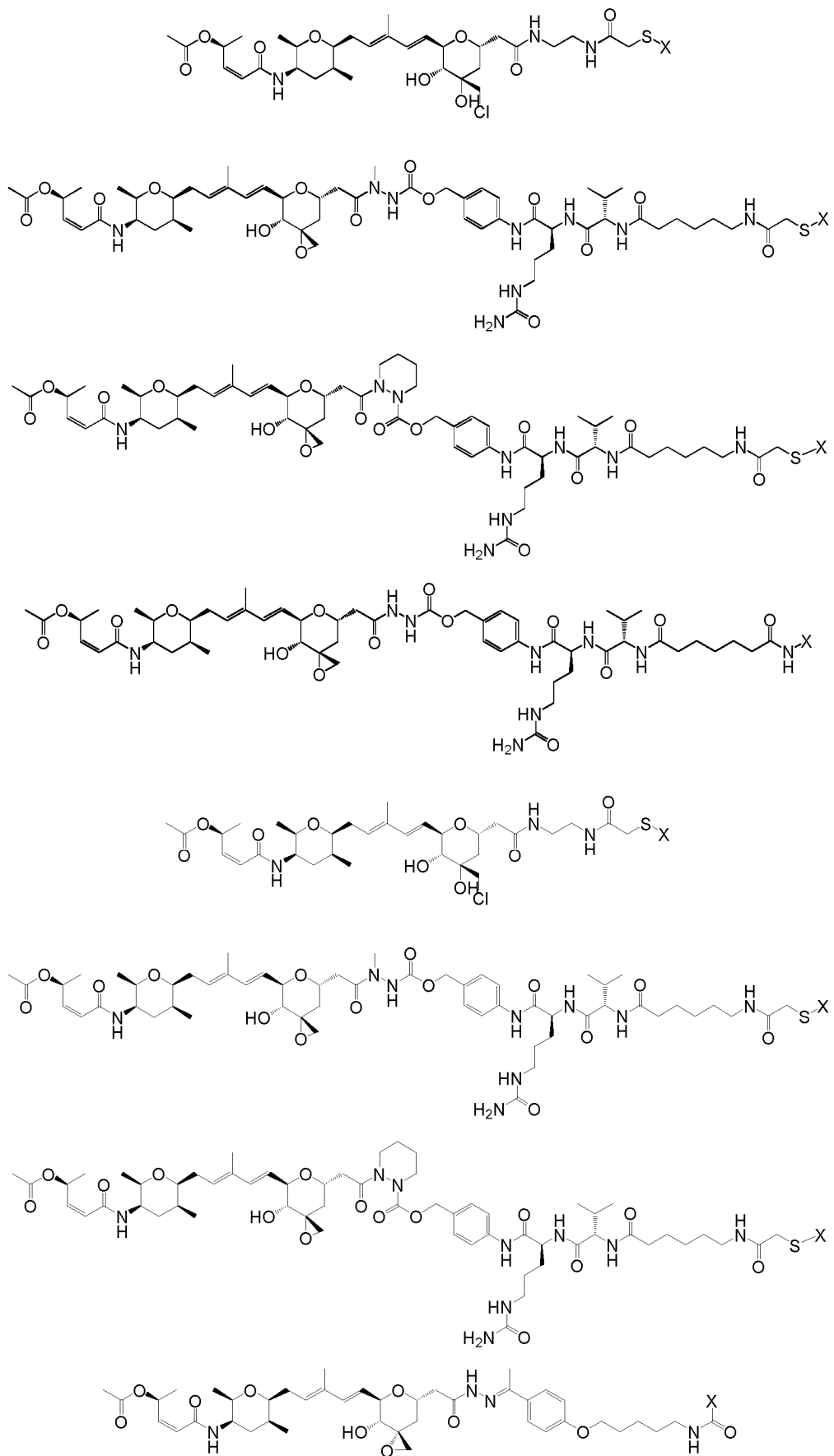


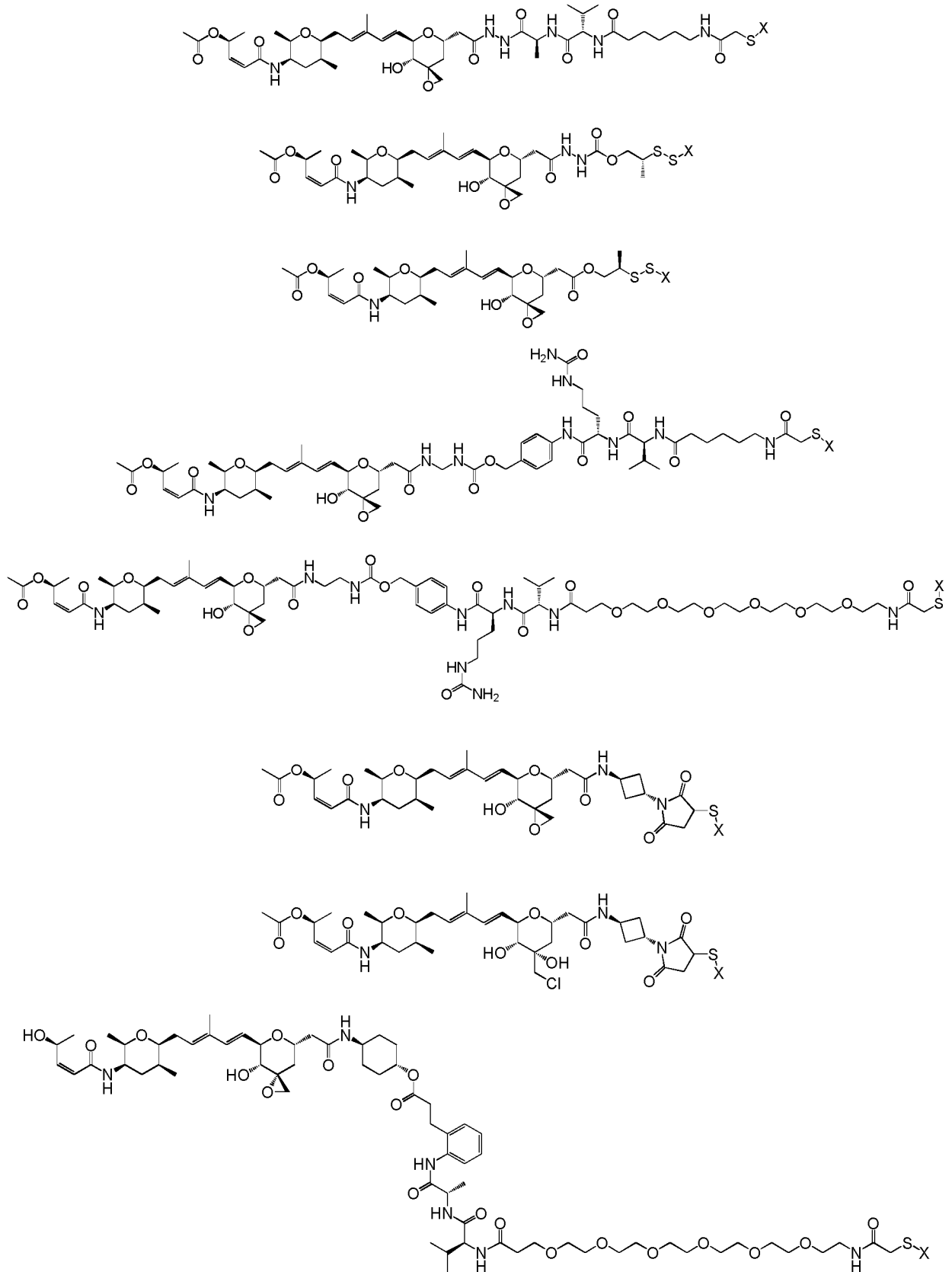












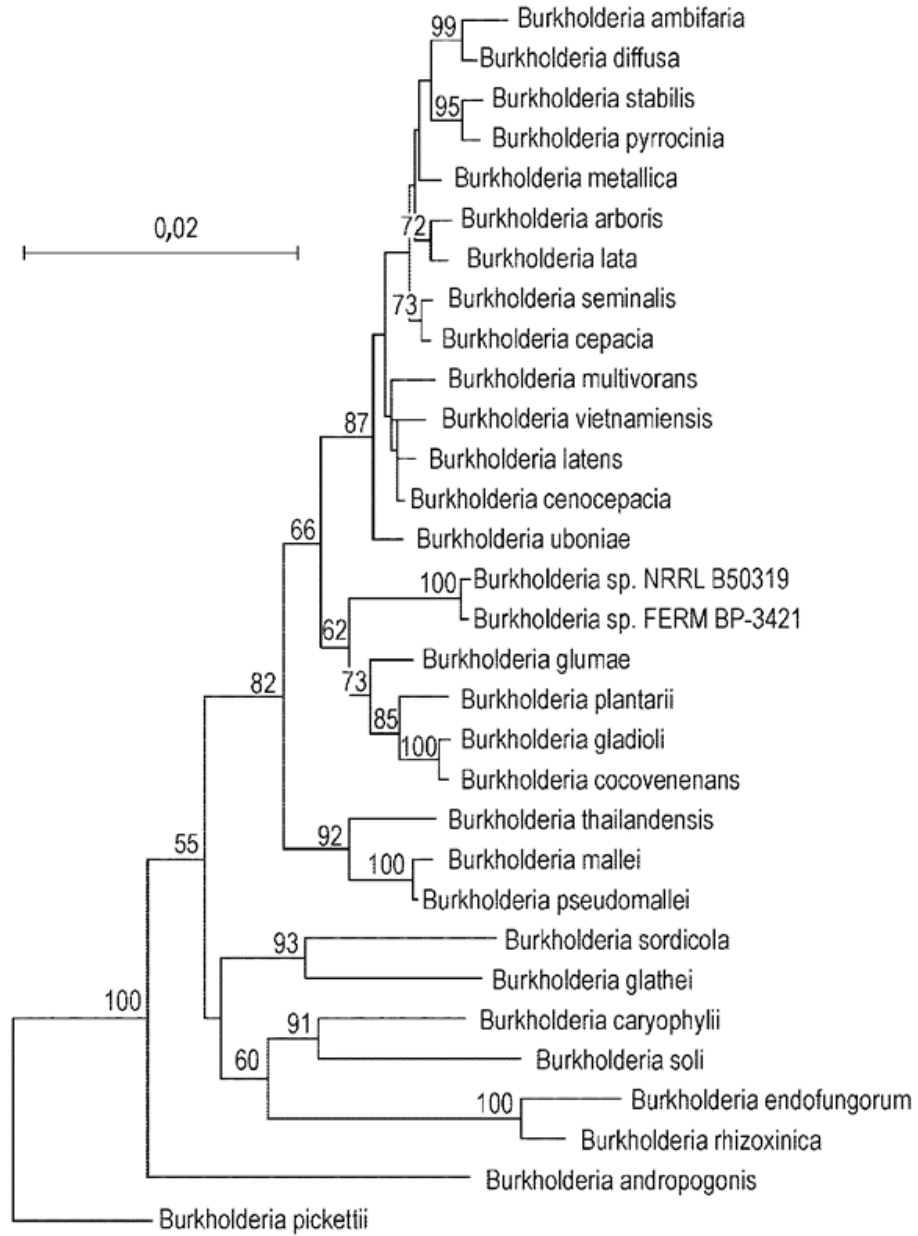
5 en las que -X o -S-X representa el anticuerpo AB; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

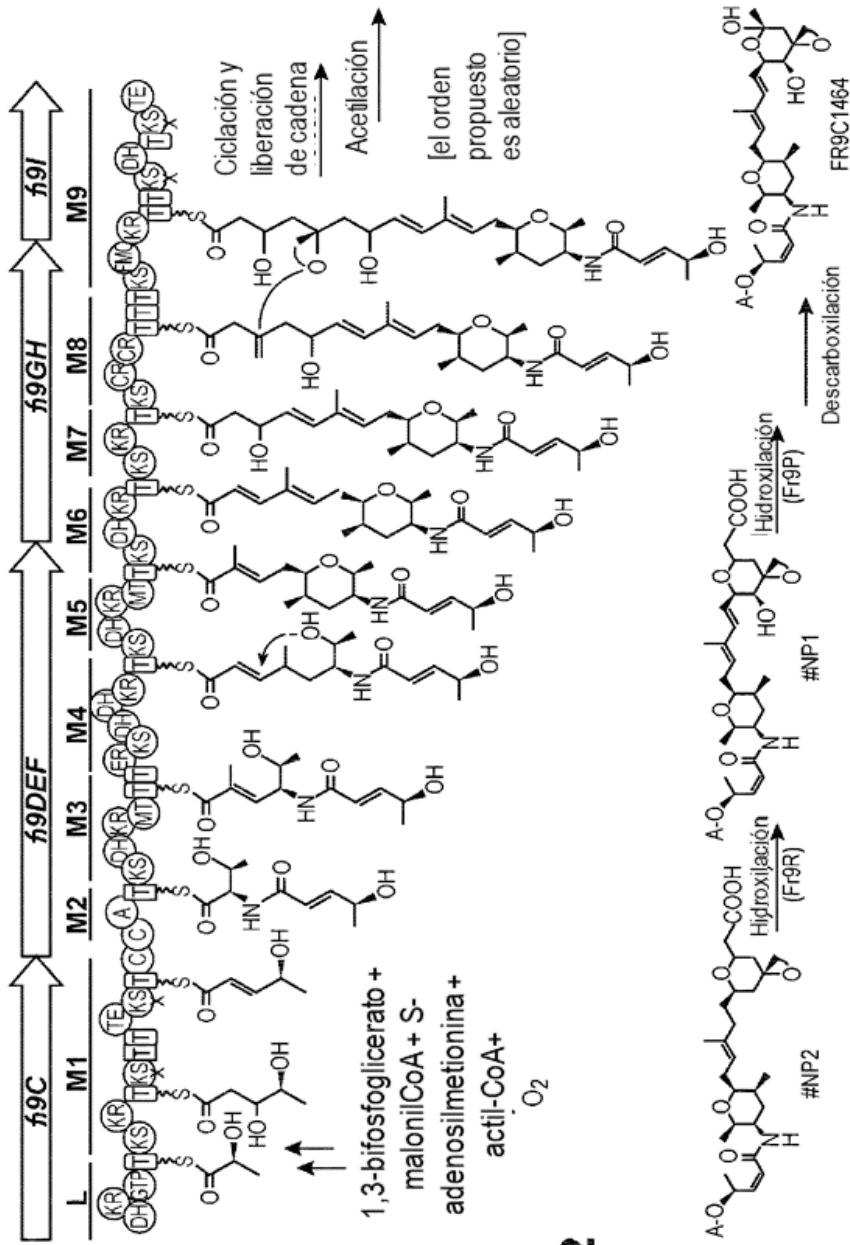
31. El compuesto o la sal de cualquiera de las reivindicaciones 18-30, en el que el anticuerpo AB se selecciona entre: trastuzumab, mutantes trastuzumab, oregovomab, edrecolomab, cetuximab, un anticuerpo monoclonal



- humanizado contra el receptor de vitronectina ( $\alpha_v\beta_3$ ), alemtuzumab, un anticuerpo humanizado dirigido contra HLA-DR para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, 131I Lym-1, un anticuerpo de murino dirigido contra HLA-Dr10 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin, un mAb humanizado dirigido contra CD2 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o del linfoma no de Hodgkin, labetuzumab, bevacizumab, ibritumomab tiuxetan, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, ipilimumab, gemtuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor 5T4 de la proteína oncofetal, M1/70 (anticuerpo contra el receptor de CD11b) y otros anticuerpos.
- 5 32. El compuesto o la sal de cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 18 y 19, en el que P representa un radical del compuesto de las reivindicaciones 1-6.
- 10 33. El compuesto o la sal de cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 18 y 19, en el que L comprende uno o más dirradicales de aminoácidos seleccionados de forma independiente.
34. El compuesto o la sal de cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 18 y 19, en el que L comprende uno o más dirradicales de aminoácidos seleccionados de forma independiente seleccionados entre el grupo que consiste en valina, citrulina, fenilalanina, lisina, alanina y glicina.
- 15 35. El compuesto o la sal de cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 18 y 19, en el que L es capaz de escindir de P, o un radical que comprende P, mediante una proteasa intracelular.
36. El compuesto o la sal de la reivindicación 18 o 19, en el que en AB se une a un dirradical aminoácido mediante un resto de cisteína de AB mediante un azufre o enlace de azufre-azufre.
- 20 37. El compuesto o la sal de la reivindicación 18 o 19, en el que AB se une a un dirradical aminoácido mediante un resto de lisina.
38. El compuesto o la sal de la reivindicación 18 o 19, en el que AB se une a un dirradical aminoácido mediante un resto de glutamina de AB mediante un enlace amida.
- 25 39. El compuesto o la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 18-30, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo.
40. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto o la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 y un diluyente, transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 41. La composición farmacéutica de la reivindicación 40, que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa, y un aglutinante del ADN.
42. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar el cáncer en un paciente.

**FIG. 1**





**FIG. 2**

Clave del dominio PKS

A. adenilación. C. condensación. CR. crotonasa. DH. Deshidratasa. ER: enoil reductasa. TMO. monooxigenasa dependiente de flavina. GT.P. gliceril transferasa fosfatasa. KR: cetoreductasa. K.S. cetosintasa. T. tiolación. X. KS carece de sitio activo de cisteína

FIG. 3

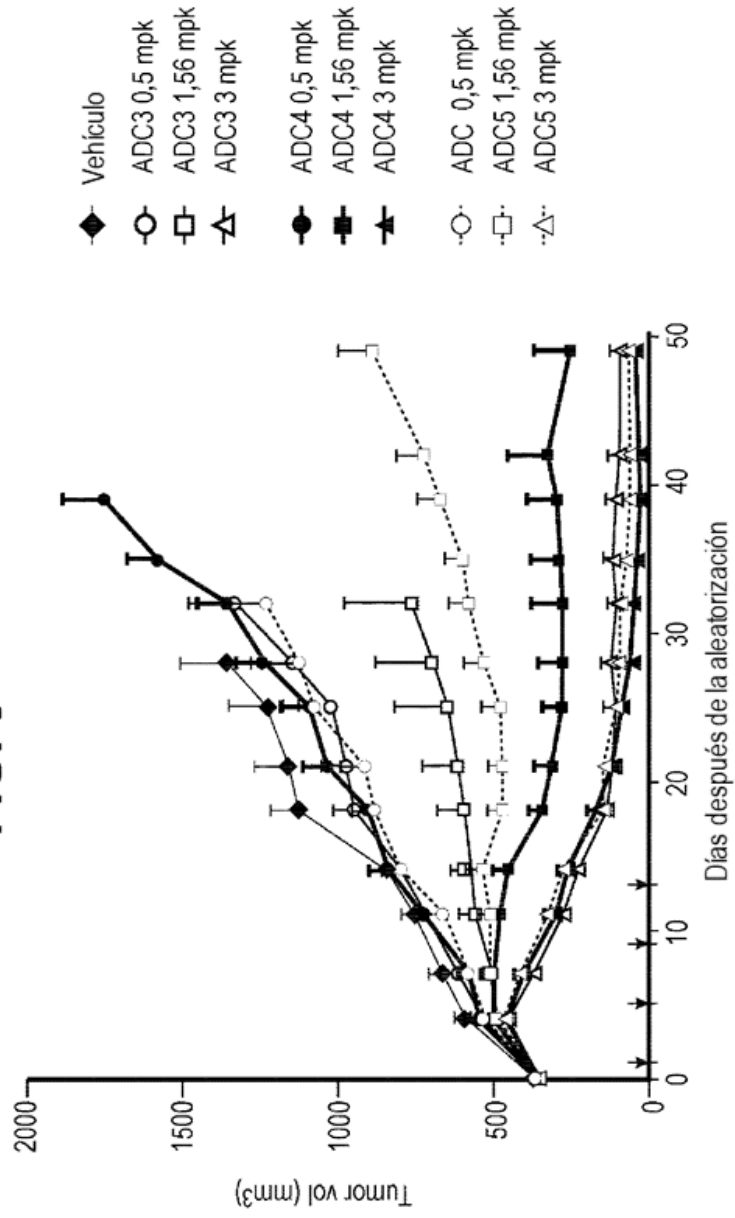


FIG. 4

