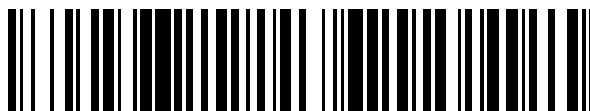


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 756**

51 Int. Cl.:

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>C07K 5/062</b>  | (2006.01) |
| <b>C07D 277/24</b> | (2006.01) |
| <b>C07K 5/078</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 35/00</b>  | (2006.01) |
| <b>C07K 16/30</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 47/68</b>  | (2007.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2015 PCT/US2015/059807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16077260**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2015 E 15805337 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3218391**

54 Título: **Análogos de tubulisina y métodos de fabricación y uso**

30 Prioridad:

**10.11.2014 US 201462077399 P**

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

**12.07.2019**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**PEREZ, HEIDI L.;  
WEI, DONNA D.;  
BORZILLERI, ROBERT M.;  
GANGWAR, SANJEEV;  
SCHROEDER, GRETCHEN M.;  
CHENG, HENG y  
SCHMIDT, ROBERT J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 719 756 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 tubulisin y métodos de fabricación y uso

5 **Campo técnico**

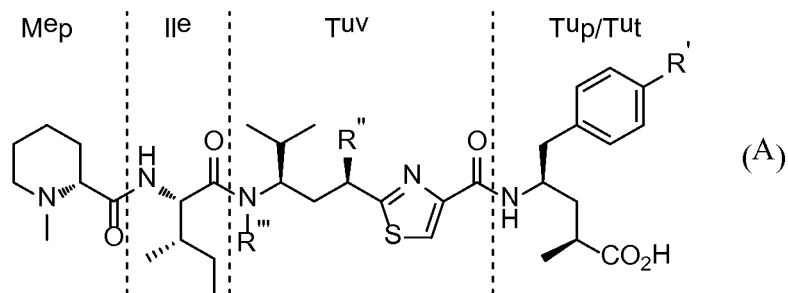
La presente invención se refiere a análogos de tubulisin y a conjugados de los mismos, a métodos para prepararlos y usarlos, y a composiciones que los comprenden.

10 **Técnica antecedente**

Las tubulisin son citotoxinas aisladas en primer lugar de cultivos de mixobacterias *Archangium gephyra* o *Angiococcus disciformis*, cada una de las cuales produce una mezcla de tubulisin diferente (Sasse *et al.* 2000; Reichenbach *et al.* 1998). Su estructura cristalina y su vía biosintética se han dilucidado (Steinmetz *et al.* 2004, Ullrich *et al.* 2009) y sus genes de biosíntesis se han secuenciado (Hoeffle *et al.* 2006b). (Las citas completas de las referencias citadas en el presente documento por el primer autor o inventor y el año se enumeran al final de la presente memoria descriptiva).

Las tubulisin pertenecen a un grupo de polipéptidos antimicóticos y depsipéptidos que incluyen las fomopsinas, las dolastatinas y las criptoficinas (Hamel 2002). Se conocen otros agentes antimicóticos, por ejemplo paclitaxel, las maitansinas y las epotilonas. Durante la mitosis, los microtúbulos de una célula se reorganizan para formar el huso mitótico, un proceso que requiere el rápido montaje y desmontaje de las proteínas constituyentes de los microtúbulos  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Los agentes antimicóticos bloquean este proceso y evitan que una célula sufra mitosis. A nivel molecular, el mecanismo de bloqueo exacto puede diferir de un agente antimicótico a otro. Las tubulisin impiden el ensamblaje de las tubulisin en microtúbulos, causando que las células afectadas se acumulen en la fase G2/M y se sufran apoptosis (Khalil *et al.* 2006).

Las tubulisin tienen un andamio de tetrapeptidilo que consiste en una subunidad de aminoácidos proteinogénica y tres no proteinogénicas como se muestra en la fórmula (A): ácido N-metilpipecolínico (Mep), isoleucina (Ile), tubuvalina (Tuv) y tubufenilalanina (Tup, R' es igual a H) o tubutirosina (Tut, R' es igual a OH). Variaciones estructurales entre las tubulisin (designadas como A, B, etc.) centradas alrededor de los residuos R', R'' y R''' de fórmula (A), como se muestra en la Tabla I. Recientemente, se han aislado tubulisin más naturales (Chai *et al.* 2010).



35

| Tubulisin    | R' | R''      | R'''                                     |
|--------------|----|----------|--|
| A            | OH | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O) <i>n</i> -Bu      |
| B            | OH | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O) <i>n</i> -Pr      |
| C            | OH | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O)Et                 |
| D            | H  | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O) <i>n</i> -Bu      |
| E            | H  | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O) <i>n</i> -Pr      |
| F            | H  | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O)Et                 |
| G            | OH | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O)CH=CH <sub>2</sub> |
| H            | H  | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O)Me                 |
| I            | OH | OC(=O)Me | CH <sub>2</sub> OC(=O)Me                 |
| U            | H  | OC(=O)Me | H  |
| V            | H  | OH       | H  |
| Y            | OH | OC(=O)Me | H  |
| Z            | OH | OH       | H  |
| Pretubulisin | H  | H        | Me                                       |

Kaur *et al.* 2006 estudiaron las propiedades antiproliferativas de la tubulisin A y descubrieron que era más potente que el paclitaxel y la vinblastina y estaba activo en los ensayos de xenoinjerto contra varias líneas celulares de

cáncer. Además, la tubulisina A indujo apoptosis en células cancerosas pero no en células normales y mostró importantes propiedades antiangiogénicas en ensayos *in vitro*. Las propiedades antimetabólicas de otras tubulisinas se han evaluado y, en general, se comparan favorablemente con las de los agentes antimetabólicos que no son tubulisinas (véase, por ejemplo, Balasubramanian *et al.* 2009, Steinmetz *et al.* 2004 y Wipf *et al.* 2004). Por estas razones, hay

5 interés en las tubulisinas como agentes anticancerosos (véase, por ejemplo, Domling *et al.* 2005c y Hamel 2002).  
Numerosas publicaciones describen los esfuerzos dirigidos a la síntesis de tubulisinas, incluyendo: Balasubramanian *et al.* 2009, Domling *et al.* 2006, Hoefle *et al.* 2003, Neri *et al.* 2006, Peltier *et al.* 2006, Sani *et al.* 2007, Sasse *et al.* 2007, Shankar *et al.* 2009, Shibue *et al.* 2009 y 2010, y Wipf *et al.* 2004.

10 Las divulgaciones de análogos de tubulisina en las que la subunidad Mep natural fue reemplazada por un grupo alternativo incluyen Patterson *et al.* 2007, Wang *et al.* 2007, Wipf *et al.* 2010, Balasubramanian *et al.* 2009, Chai *et al.* 2011 y Miao *et al.* 2013.

15 Se han desvelado varios análogos de tubulisina en los que la subunidad Ile fue reemplazada por otro aminoácido: Wipf *et al.* 2010, Vlahov *et al.* 2014a y Zhao *et al.* 2014b.

Cong *et al.* 2014 desvelan el reemplazo del grupo R" acetato en la subunidad Tub con un grupo carbamato.

20 Cong *et al.* 2014 and Cheng *et al.* 2013 desvelan análogos de tubulisina en los que el grupo R'" de la subunidad Tuv fue reemplazado por grupos alternativos. También desvelan el reemplazo del grupo R' de la subunidad Tup/Tut con un grupo amino, como un sitio de conjugación.

25 Balasubramanian *et al.* 2008 y 2009 desvelan análogos de tubulisina en los que el grupo natural (17S)-Me en la subunidad Tup fue reemplazado por un grupo dimetilo geminal junto con el reemplazo del grupo acetato en la subunidad Tuv con un grupo carbonilo.

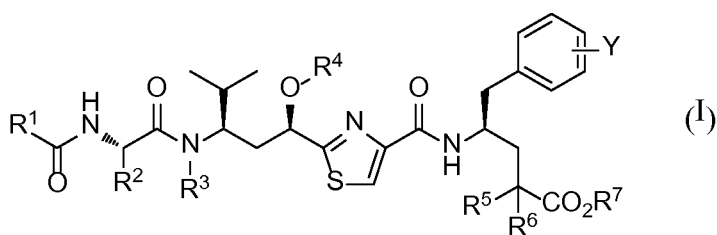
30 Las divulgaciones adicionales sobre la preparación de análogos o derivados de tubulisina incluyen: Balasubramanian *et al.* 2008, Domling 2006, Domling *et al.* 2005a, Ellman *et al.* 2013, Hoefle *et al.* 2001 y 2006a, Pando *et al.* 2011, Patterson *et al.* 2008, Raghavan *et al.* 2008, Richter 2012a, 2012b y 2012c, Shankar *et al.* 2013, Shibue *et al.* 2011, Sreejith *et al.* 2011, Vlahov *et al.* 2010a y 2011, Wessjohann *et al.* 2013, Wipf *et al.* 2007, Zanda *et al.* 2013 y Zhao *et al.* 2014a.

35 Domling *et al.* 2005 desvelan conjugados de tubulisinas con una molécula asociada ilustrada a modo de ejemplo por polietilenglicol (PEG). Otras divulgaciones de conjugados de tubulisinas son Boyd *et al.* 2008 y 2010, Jackson *et al.* 2013, Leamon *et al.* 2013, Vlahov *et al.* 2008a, 2008b, 2010b e 2014b, Leamon *et al.* 2008 y 2010, Reddy *et al.* 2009, Low *et al.* 2010 y Zhao *et al.* 2014a y 2014b. Leung *et al.* 2002 desvelan polipéptidos polianiónicos que pueden conjugarse con medicamentos como las tubulisinas para mejorar su bioactividad y solubilidad en agua. Davis *et al.* 2008 and Schluep *et al.* 2009 desvelan formulaciones a base de ciclodextrina en las que las tubulisinas están unidas covalentemente a una ciclodextrina.

### Divulgación de la invención

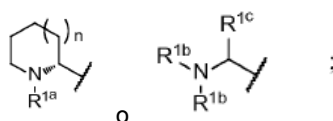
45 La presente invención desvela análogos de tubulisina que tienen actividad citotóxica, que pueden usarse como agentes anticancerosos por administración como tal, como un profármaco o como un conjugado. Los análogos se caracterizan por, entre otros, un grupo geminal dimetilo o un grupo ciclopropilo colocados en posición *alfa* con respecto al grupo carboxilo de la subunidad Tup/Tut.

50 Por consiguiente, en un aspecto, esta invención proporciona un compuesto que tiene una estructura representado por la fórmula (I)



en donde

55 R<sup>1</sup> es

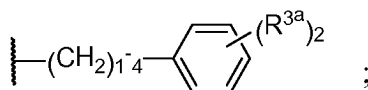


en donde

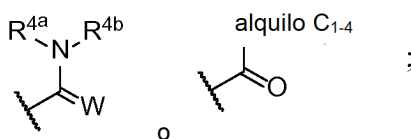
- 5  $R^{1a}$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, CO(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), CO(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) o CO(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>);  
 cada  $R^{1b}$  es independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-3;  
 $R^{1c}$  es H, Me o CH(Me)<sub>2</sub>; y  
 n es 0, 1 o 2;

- 10  $R^2$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, arilo sin sustituir o sustituido, heteroarilo sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, cicloalifático sin sustituir o sustituido, heterocicloalifático sin sustituir o sustituido, arilalquilo sin sustituir o sustituido o alquilarilo sin sustituir o sustituido;

- 15  $R^3$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, arilo sin sustituir o sustituido, heteroarilo sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, cicloalifático sin sustituir o sustituido, heterocicloalifático sin sustituir o sustituido, arilalquilo sin sustituir o sustituido, alquilarilo sin sustituir o sustituido, o



- 30 en donde cada  $R^{3a}$  es independientemente H, NH<sub>2</sub>, NHMe, Cl, F, Me, Et o CN;  
 $R^4$  es



35 en donde

$R^{4a}$  y  $R^{4b}$  son independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>(cicloalquilo C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; y W es O o S;

- 40  $R^5$  y  $R^6$  son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo;  
 $R^7$  es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y  
 Y es H, OH, Cl, F, CN, Me, Et, NO<sub>2</sub> o NH<sub>2</sub>;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 45 En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un compuesto de fórmula (I) unido covalentemente a un resto dirigido que se une específica o preferentemente a una entidad química en una célula diana, célula diana que es, preferentemente, una célula cancerosa. Preferentemente, el resto dirigido es un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal; incluso más preferentemente un anticuerpo monoclonal humano, y la entidad química es un antígeno asociado a un tumor. El antígeno asociado al tumor puede ser uno que se muestra en la superficie de una célula cancerosa o uno que es secretado por una célula cancerosa en el espacio extracelular circundante.

En otra realización, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) unido covalentemente a un resto enlazador que tiene un grupo funcional reactivo, adecuado para la conjugación a un resto dirigido.

5 También se desvela un método para tratar un cáncer en un sujeto que padece tal cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto dirigido. También se desvela el uso de un compuesto de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto dirigido para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer. Un compuesto de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto dirigido también se puede usar para inhibir la proliferación, *in vitro* o *in vivo*, de células cancerosas. Especialmente, el cáncer puede ser cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovarios, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer renal.

#### Breve descripción del dibujo o dibujos

15 La **figura 1** muestra un esquema para la síntesis de los compuestos (Ia-2) y (Ia-6).  
La **figura 2** muestra un esquema para la síntesis del ácido intermedio 19, que se utiliza para la síntesis de los compuestos (Ia-3) y (Ia-7).  
La **figura 3** muestra un esquema para la síntesis de compuestos (Ib-1) a (Ib-4).  
La **figura 4** muestra un esquema para la síntesis del compuesto (Ic-1).  
20 Las **figuras 5a y 5b** muestran, en combinación, un esquema para la síntesis de compuesto (Ic-2).  
La **figura 6** muestra un esquema para la síntesis del compuesto enlazador del análogo (IIIa-2).  
Las **figuras 7a y 7b** muestran, en combinación, un esquema para la síntesis del compuesto enlazador del análogo (IIIa-4).  
25 Las **figuras 8a y 8b** muestran, en combinación, un esquema para la síntesis del compuesto enlazador del análogo (IIIc-3).

#### Modos para realizar la invención

##### DEFINICIONES

30 "Anticuerpo" significa anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o variantes de cadena única de los mismos. Un anticuerpo completo es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y una región constante de la cadena pesada que comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera ( $V_L$  o  $V_k$ ) y una región constante de la cadena ligera que comprende un solo dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercalados con regiones marco más conservadas (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino al carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.  
40 Las regiones variables contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes pueden mediar la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico. Se dice que un anticuerpo se "une" específicamente a un antígeno X si el anticuerpo se une al antígeno X con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente  $6 \times 10^{-9}$  M o menos, más preferentemente  $3 \times 10^{-9}$  M o menos, incluso más preferentemente  $2 \times 10^{-9}$  M o menos. El anticuerpo puede ser quimérico, humanizado, o, preferentemente, ser humano. La región constante de la cadena pesada puede diseñarse para afectar al tipo o extensión de la glicosilación, para extender la semivida del anticuerpo, para mejorar o reducir las interacciones con las células efectoras o el sistema del complemento, o para modular alguna otra propiedad. La ingeniería puede realizarse por reemplazo, adición o eliminación de uno o más aminoácidos o mediante la sustitución de un dominio con un dominio de otro tipo de inmunoglobulina, o una combinación de los anteriores.

"Fragmento de unión a antígeno" y "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo") significa uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, tal como (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, por ejemplo, Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 6ª Ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_{H1}$   $C_{H1}$ ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546). que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Los fragmentos de unión a antígeno preferidos son Fab,  $F(ab')_2$ , Fab', Fv y Fd. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se aparean para formar

moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única o scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena única también están incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo.

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

"Anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" significa una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única, que muestra una única especificidad y afinidad de unión para un epítipo en particular.  
15

"Anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto el marco como las regiones CDR (y la región constante, si está presente) se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones posteriores, incluyendo modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los cuales las secuencias de las CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.  
20  
25

"Anticuerpo monoclonal humano" significa un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión, que tiene regiones variables en las que tanto el marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.  
30

"Alifático" significa una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada, el resto de hidrocarburo no aromático que tiene el número especificado de átomos de carbono (por ejemplo, como en "alifático C<sub>3</sub>", "alifático C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>", o "alifático C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>", siendo las dos últimas frases sinónimas para un resto alifático que tiene de 1 a 5 átomos de carbono) o, donde el número de átomos de carbono no se especifica explícitamente, de 1 a 4 átomos de carbono (2 a 4 carbonos en el caso de restos alifáticos insaturados). Una comprensión similar se aplica al número de carbonos en otros tipos, como en alqueno C<sub>2-4</sub>, cicloalifático C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>, etc. En un sentido similar, un término, tal como  
35  
40 "(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>" debe entenderse como una abreviatura para el subíndice que es 1, 2 o 3, así que tal término representa CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>.

"Alquilo" significa un resto alifático saturado, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono que son aplicables. A modo de ilustración, los restos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, *t*-butilo, 1-butilo, 2-butilo, y similares. "Alquilenos" significa un homólogo divalente de un grupo alquilo, tal como CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>.  
45

"Alqueno" significa un resto de alifático que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono que son aplicables. A modo de ilustración, los restos alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> incluyen, pero sin limitación, etenilo (vinilo), 2-propenilo (alilo o prop-2-enilo), cis-1-propenilo, *trans*-1-propenilo, *E*- (o *Z*-) 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo (but-1,3-dienilo) y similares.  
50

"Alquino" significa un resto alifático que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono que son aplicables. A modo de ilustración, los grupos alquino C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> incluyen etinilo (acetilenilo), propargilo (prop-2-ino), 1-propinilo, but-2-ino y similares.  
55

"Cicloalifático" significa un resto de hidrocarburo no aromático, saturado o insaturado que tiene de 1 a 3 anillos, que tiene cada anillo de 3 a 8 (preferentemente de 3 a 6) átomos de carbono. "Cicloalquilo" significa un resto cicloalifático en el que cada anillo está saturado. "Cicloalqueno" significa un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. "Cicloalquino" significa un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. A modo de ilustración, los restos cicloalifáticos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo y adamantilo. Los restos cicloalifáticos preferidos son los cicloalquilos, especialmente ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. "Cicloalquilenos" significa un homólogo divalente de un grupo cicloalquilo.  
60  
65

"Heterocicloalifático" significa un resto cicloalifático en donde, en al menos un anillo del mismo, hasta tres

(preferentemente 1 a 2) carbonos se han reemplazado con un heteroátomo independientemente seleccionado entre N, O o S, donde el N y S opcionalmente pueden oxidarse y el N opcionalmente puede cuaternizarse. De manera similar, "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo" y "heterocicloalquinilo" significa un resto cicloalquilo, cicloalquenilo o cicloalquinilo, respectivamente, en el que al menos un anillo de los mismos ha sido modificado. Los restos heterocicloalifáticos incluyen aziridinilo, azetidino, 1,3-dioxanilo, oxetanilo, tetrahydrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropirano, tetrahidrotioperano, tetrahidrotioperano sulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, sulfóxido de tiomorfolinilo, tiomorfolinil sulfona, 1,3-dioxolanilo, tetrahydro-1,1-dioxotienilo, 1,4-dioxanilo, tietanilo, y similares. "Heterocicloalquilenilo" significa un homólogo divalente de un grupo heterocicloalquilo.

10 "Alcoxi", "ariloxi", "alquiltio" y "ariltio" significan -O(alquilo), -O(arilo), -S(alquilo) y -S(arilo), respectivamente. Son ejemplos, metoxi, fenoxi, metiltio y feniltio, respectivamente.

"Halógeno" o "halo" significa flúor, cloro, bromo o yodo.

15 "Arilo" significa un resto de hidrocarburo que tiene un sistema de anillo mono, bi o tricíclico en donde cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es aromático. Los anillos en el sistema de anillos pueden condensarse entre sí (como en naftilo) o unirse entre sí (como en bifenilo) y pueden condensarse o unirse a anillos no aromáticos (como en indanilo o ciclohexilfenilo). A modo de ilustración adicional, los restos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antraceno y acenaftilo. "Arieno" significa un homólogo divalente de un grupo arilo, por ejemplo 1,2-fenileno, 1,3-fenileno o 1,4-fenileno.

20 "Heteroarilo" significa un resto que tiene un sistema de anillo mono, bi o tricíclico en donde cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es un anillo aromático que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O o S, donde el N y S opcionalmente pueden oxidarse y el N opcionalmente puede cuaternizarse. Dicho al menos un heteroátomo que contiene un anillo aromático puede condensarse con otros tipos de anillos (como en benzofuranilo o tetrahydroisoquinolilo) o directamente unirse a otros tipos de anillos (como en fenilpiridilo o 2-ciclopentilpiridilo). A modo de ilustración adicional, los restos heteroarilo incluyen pirrolo, furano, tiofenilo (tienilo), imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, N-oxopiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiofenilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, fenotiazolilo, benzoimidazolilo, benzotriazolilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, dibenzotiofenilo, acridinilo y similares. "Heteroarileno" significa un homólogo divalente de un grupo arilo.

35 Cuando se indique que un resto puede estar sustituido, tal como por uso de la frase "sin sustituir o sustituido" u "opcionalmente sustituido" como en "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> no sustituido o sustituido" o "heteroarilo opcionalmente sustituido", tal resto puede tener uno o más sustituyentes seleccionados independientemente, preferentemente de uno a cinco en número, más preferentemente de uno o dos en número. Los sustituyentes y los patrones de sustitución pueden seleccionarse por un experto en la materia, teniendo en cuenta el resto al que está unido el sustituyente, para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse mediante técnicas conocidas en la materia, así como métodos expuestos en el presente documento.

45 "Arientalquilo", (heterocicloalifático)alquilo, "arilalquenilo", "arilalquinilo", "biarilalquilo" y similares, significan un resto alquilo, alquenilo o alquinilo, según sea el caso, sustituido con un resto arilo, heterocicloalifáticos, biarilo, etc., según sea el caso, con la valencia abierta (insatisfecha) en el resto alquilo, alquenilo o alquinilo, por ejemplo como en bencilo, fenetilo, N-imidazoiletilo, N-morfolinoetilo y similares. Por el contrario, "alquilarilo", "alquenilcicloalquilo", y similares, significan un resto arilo, cicloalquilo, etc., según sea el caso, sustituido con un resto alquilo, alquenilo, etc., según sea el caso, por ejemplo como en metilfenilo (tolilo) o alilciclohexilo. "Hidroxi-alquilo", "haloalquilo", "alquilarilo", "cianoarilo", y similares, significan un resto alquilo, arilo, etc., según sea el caso, sustituido con uno o más del sustituyente identificado (hidroxilo, halo, etc., según sea el caso).

50 Por ejemplo, los sustituyentes permisibles incluyen, pero sin limitación, alquilo (especialmente metilo o etilo), alquenilo (especialmente alilo), alquinilo, arilo, heteroarilo, cicloalifáticos, heterocicloalifáticos, halo (especialmente flúor), haloalquilo (especialmente trifluorometilo), hidroxilo, hidroxialquilo (especialmente hidroxietilo), ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo) (especialmente -OCF<sub>3</sub>), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo), -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub> y similares.

65 Cuando el resto que se sustituye es un resto alifático, los sustituyentes preferidos son arilo, heteroarilo, cicloalifáticos, heterocicloalifáticos, halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -

OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(arilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(=O)alquilo, -S(cicloalquilo), -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>. Los sustituyentes más preferidos son halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(arilo), =O, =NOH, =NO(alquilo), -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub> y -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. Son especialmente preferidos, fenilo, ciano, halo, hidroxilo, nitro, alquiloxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, O(alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)OH y O(alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)halo.

Cuando el resto que se sustituye es un resto cicloalifático, heterocicloalifático, arilo o heteroarilo, los sustituyentes preferidos son alquilo, alqueno, alquino, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(arilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), alquilo, ariltio, -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(arilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>. Los sustituyentes más preferidos son alquilo, alqueno, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(arilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub> y -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. Son específicamente preferidos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, ciano, nitro, halo y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

Cuando se indica un intervalo, como en "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>" o "5 al 10 %", tal intervalo incluye los puntos finales del intervalo, como en C<sub>1</sub> y C<sub>5</sub> en primera instancia y 5 % y 10 % en la segunda instancia.

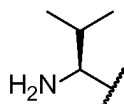
A menos que los estereoisómeros en particular estén indicados específicamente (por ejemplo, mediante un enlace en negrita o discontinuo en un estereocentro relevante en una fórmula estructural, mediante la representación de un doble enlace que tiene una configuración E o Z en una fórmula estructural, o mediante el uso de la nomenclatura estereoquímica-designación), todos los estereoisómeros están incluidos dentro del alcance de la invención, como compuestos puros y mezclas de los mismos. A menos que se indique lo contrario, los enantiómeros individuales, los diastereoisómeros, los isómeros geométricos y las combinaciones y mezclas de los mismos están todos abarcados por esta invención.

Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos pueden tener formas tautoméricas (por ejemplo, formas ceto y enol), formas de resonancia y formas zwitteriónicas que son equivalentes a las representadas en las fórmulas estructurales usadas en el presente documento y que las fórmulas estructurales abarcan tales formas tautoméricas, de resonancia o zwitteriónicas.

"Éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a un éster que se hidroliza *in vivo* (por ejemplo, en el cuerpo humano) para producir el compuesto original o una sal del mismo o tiene una actividad *per se* similar a la del compuesto original. Los ésteres adecuados incluyen ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> o alquino C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, especialmente metilo, etilo o n-propilo.

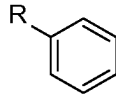
"Sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de un compuesto adecuado para la formulación farmacéutica. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos básicos, la sal puede ser una sal de adición de ácido, tal como un sulfato, bromhidrato, tartrato, mesilato, maleato, citrato, fosfato, acetato, pamoato (embonato), yodhidrato, nitrato, clorhidrato, lactato, metil-sulfato, fumarato, benzoato, succinato, mesilato, lactobionato, suberato, tosilato y similares. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos ácidos, la sal puede ser una sal, tal como sal cálcica, sal potásica, sal de magnesio, sal de meglumina, sal de amonio, sal de zinc, sal de piperazina, sal de trometamina, sal de litio, sal de colina, sal de dietilamina, sal de <sup>4</sup>-fenilciclohexilamina, sal de benzatina, sal sódica, sal de tetrametilamonio y similares. Las formas cristalinas polimórficas y los solvatos también se incluyen dentro del alcance de esta invención.

En las fórmulas de esta memoria descriptiva, una línea ondulada transversal a un enlace denota un sitio de unión covalente. Por ejemplo, una declaración que R es

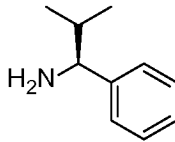




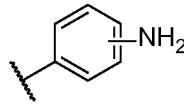
en la fórmula



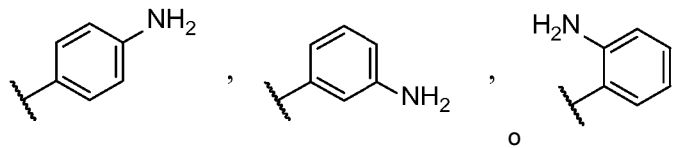
5 se refiere a



10 En las fórmulas de esta memoria descriptiva, un enlace que atraviesa un anillo de fenilo entre sus dos carbonos significa que el grupo unido al enlace puede ubicarse en cualquiera de las posiciones *orto*, *meta* o *para* del anillo de fenilo. A modo de ilustración, la fórmula



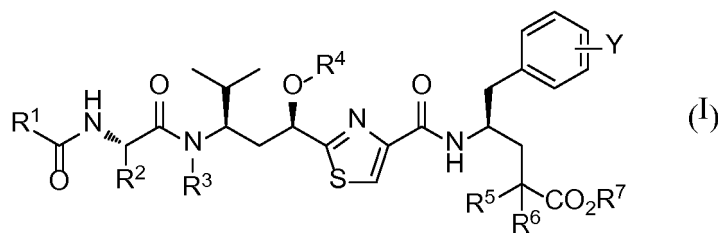
15 representa



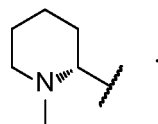
ANÁLOGOS

20

En una realización de análogos de tubulisina de acuerdo con la fórmula (I)

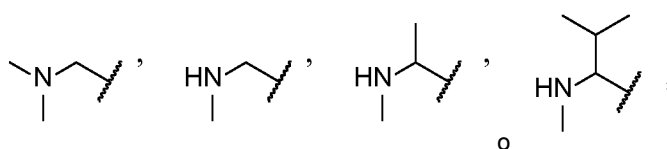


25 R<sup>1</sup> es preferentemente

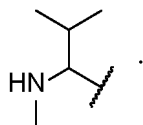


30

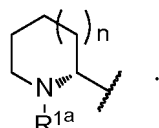
En otra realización preferida de análogos de acuerdo con la fórmula (I), R<sup>1</sup> es



más preferentemente

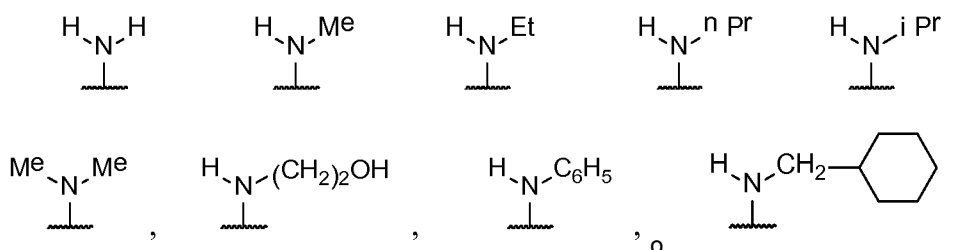


5 Preferentemente uno de R<sup>3a</sup> e Y es NH<sub>2</sub> en la fórmula (I) cuando R<sup>1</sup> es



También en la fórmula (I), grupos preferidos N(R<sup>4a</sup>)(R<sup>4b</sup>) son:

10



15 con ese siendo especialmente preferido que uno de R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> es H y el otro es Me. En otras realizaciones preferidas, R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> son ambos H o ambos Me, o uno de R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> es H y el otro es C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>. Preferentemente, W es O.

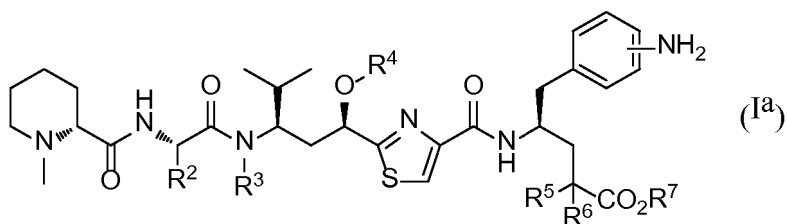
En otra realización preferida de compuestos de acuerdo con la fórmula (I), R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno Me.

20 En las definiciones de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> en la fórmula (I), cuando un grupo se define como sin sustituir o sustituido, preferentemente está sin sustituir.

La síntesis de análogos de tubulisina con diversos grupos en las posiciones R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup> e Y de fórmula (I) se enseñan en Cheng *et al.* 2013 y Cong *et al.* 2014. Las técnicas descritas allí para la síntesis de variantes estructurales en esas posiciones son aplicables a los compuestos de esta invención, *mutatis mutandis*.

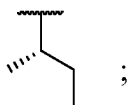
25

En una realización preferida, un compuesto de fórmula (I) tiene una estructura representada por la fórmula (Ia)



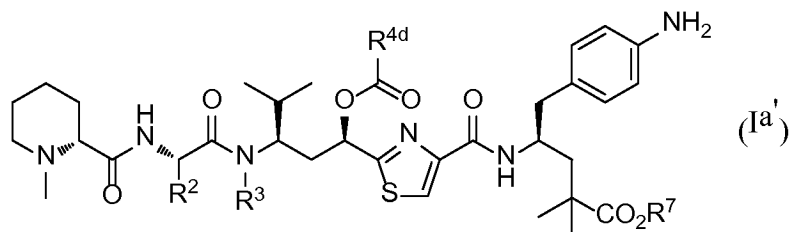
30

en donde R<sup>2</sup> es Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o

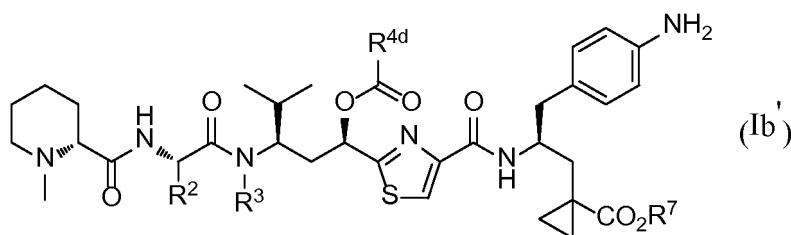


35 R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>; y R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son como se definen con respecto a la fórmula (I).

Un compuesto preferido de acuerdo con la fórmula (Ia) tiene una estructura representada por la fórmula (Ia'):

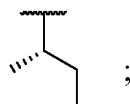


5 Otro compuesto preferido de acuerdo con la fórmula (Ia) tiene una estructura representada por la fórmula (Ib'):



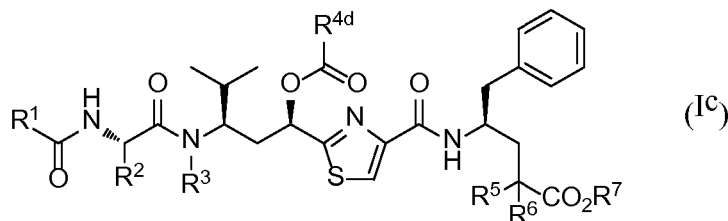
En las fórmulas (Ia') y (Ib'), R<sub>2</sub> es CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o

10



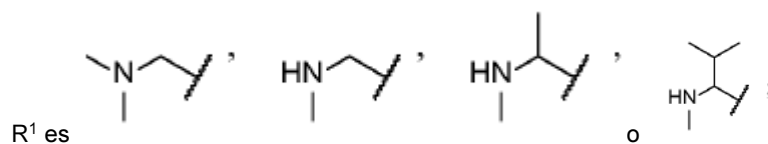
R<sub>3</sub> es alquilo C<sub>1-5</sub>; R<sup>4d</sup> es Me o NHMe; y R<sup>7</sup> es H, Me o Et.

15 En otra realización preferida más, un compuesto de fórmula (I) tiene una estructura representada por la fórmula (Ic):

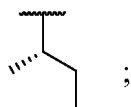


en donde

20



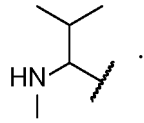
R<sub>2</sub> es CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



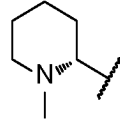
25

R<sub>3</sub> es alquilo C<sub>1-5</sub>; R<sup>4d</sup> es Me o NHMe; R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo; y R<sup>7</sup> es H, Me o Et. Preferentemente, R<sup>5</sup> y

30 R<sup>6</sup> son cada uno Me y R<sup>1</sup> es

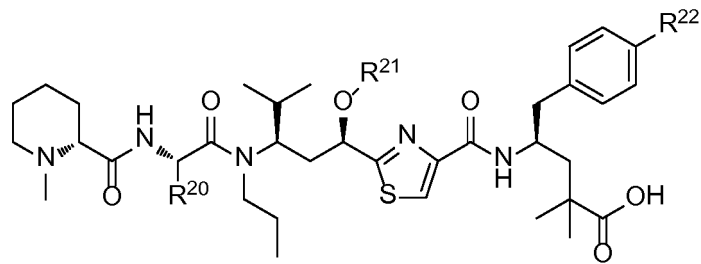


Ejemplos específicos de compuestos de esta invención en donde, en la formula (I), R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos metilo y R<sup>1</sup> es



5

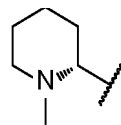
se muestran a continuación:



10

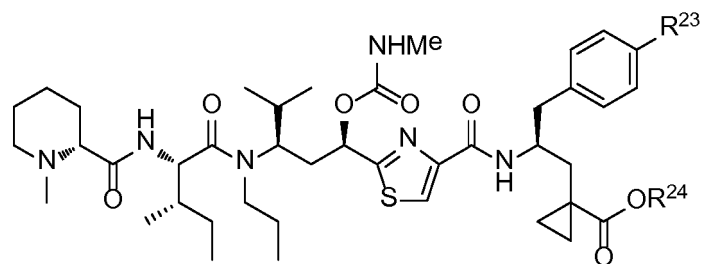
| Compuesto | R <sup>20</sup> | R <sup>21</sup> | R <sup>22</sup> |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| (Ia-1)    |                 |                 | NH <sub>2</sub> |
| (Ia-2)    |                 |                 | NH <sub>2</sub> |
| (Ia-3)    |                 |                 | NH <sub>2</sub> |
| (Ia-4)    |                 |                 | NH <sub>2</sub> |
| (Ia-5)    |                 |                 | NO <sub>2</sub> |
| (Ia-6)    |                 |                 | NO <sub>2</sub> |
| (Ia-7)    |                 |                 | NO <sub>2</sub> |

Ejemplos específicos de compuestos de esta invención en donde, en la formula (I), R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> combinados con el carbono al que están unidos forman un anillo de ciclopropilo y R<sup>1</sup> es



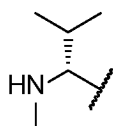
15

se muestran a continuación:

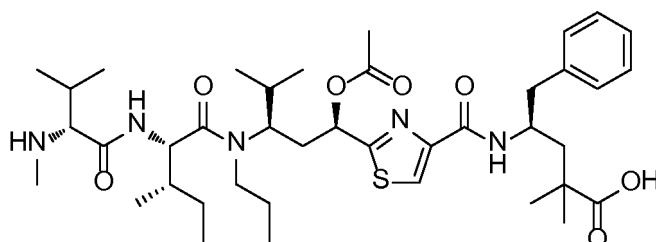


| Compuesto | R <sup>23</sup> | R <sup>24</sup> |
|-----------|-----------------|-----------------|
| (Ib-1)    | NH <sub>2</sub> | H               |
| (Ib-2)    | NH <sub>2</sub> | Me              |
| (Ib-3)    | NO <sub>2</sub> | H               |
| (Ib-4)    | NO <sub>2</sub> | Me              |

5 Ejemplos específicos de compuestos de esta invención en donde, en la fórmula (I), R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos Me y R<sup>1</sup> es

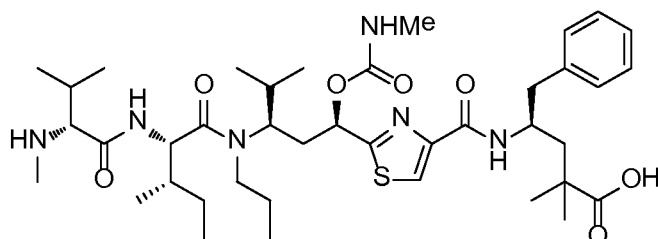


se muestran a continuación:



(Ic<sup>-</sup>1)

10



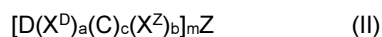
(Ic<sup>-</sup>2)

## 15 CONJUGADOS

### Aspectos generales

Opcionalmente, los compuestos de la presente invención pueden conjugarse con un resto dirigido que se une específicamente o preferentemente a una entidad química en una célula cancerosa. Preferentemente, el resto dirigido es un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo y la entidad química es un antígeno asociado a tumor. Para una revisión sobre el mecanismo de acción y uso de ADC en la terapia del cáncer, véase Schrama *et al.* 2006.

25 Por tanto, otra realización de la presente invención es un conjugado que comprende un compuesto citotóxico de acuerdo con la presente invención y un ligando, representado por la fórmula (II)



30 en la que Z es un ligando, D es un análogo de tubulisina de la presente invención, y  $-(X^D)_a(C)(X^Z)_b-$  se denominan colectivamente como un "resto enlazador" o "enlazador" porque enlazan Z y D. Dentro del enlazador, C es un grupo

escindible diseñado para ser escindido en o cerca del sitio de la acción biológica deseada del compuesto D;  $X^D$  y  $X^Z$  se denominan restos espaciadores (o "espaciadores") porque separan D y C y C y Z, respectivamente; los subíndices a, b y c son independientemente 0 o 1 (es decir, la presencia de  $X^D$ ,  $X^Z$  y C es opcional). El subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 1, 2, 3 o 4). D,  $X^D$ , C,  $X^Z$  y Z se describen más detalladamente a continuación.

El ligando Z, por ejemplo, un anticuerpo, realiza una función de direccionamiento. Al unirse a un tejido o célula objetivo donde se encuentra su antígeno o receptor, el ligando Z dirige el conjugado allí. (Cuando el ligando Z es un anticuerpo, el conjugado a veces se denomina conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) o un inmunoconjugado). Preferentemente, el tejido o célula diana es un tejido o célula cancerosa y el antígeno o receptor es un antígeno asociado a un tumor, es decir, un antígeno que se expresa de forma única en las células cancerosas o está sobreexpresado por las células cancerosas, en comparación con las células no cancerosas. La escisión del grupo C en el tejido o célula diana libera el compuesto D para ejercer su efecto citotóxico localmente. En algunos casos, el conjugado se internaliza en una célula diana mediante endocitosis y la escisión tiene lugar dentro de la célula diana. De esta manera, la administración precisa del compuesto D se logra en el sitio de la acción prevista, reduciendo la dosis necesaria. Asimismo, el compuesto D es normalmente biológicamente inactivo (o significativamente menos activo) en su estado conjugado, reduciendo así la toxicidad no deseada contra tejidos o células no diana. Como los medicamentos contra el cáncer son a menudo altamente tóxicos para las células en general, esta es una consideración importante.

Como refleja el subíndice m, cada molécula del ligando Z puede conjugarse con más de un compuesto D, dependiendo de la cantidad de sitios, el ligando Z tiene disponible para la conjugación y las condiciones experimentales empleadas. Los expertos en la materia apreciarán que, mientras que cada molécula individual del ligando Z se conjuga con un número entero de compuestos D, una preparación del conjugado puede analizar una relación de números no enteros de los compuestos D a ligando Z, reflejando un promedio estadístico. Esta relación se conoce como la relación de sustitución (SR) o, como alternativa, la relación fármaco-anticuerpo (DAR).

#### *Ligando Z*

Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo. Por conveniencia y brevedad y no por limitación, la siguiente discusión detallada en el presente documento sobre la conjugación del ligando Z se escribe en el contexto de que es un anticuerpo, pero los expertos en la técnica entenderán que se pueden conjugar otros tipos de ligando Z, haciendo los cambios necesarios. Por ejemplo, los conjugados con ácido fólico como el ligando pueden dirigirse a las células que tienen el receptor de folato en sus superficies (Vlahov et al., 2008; Leamon et al. 2008). Por la misma razón, la discusión detallada a continuación se escribe principalmente en términos de una relación 1:1 del anticuerpo Z al análogo D ( $m = 1$ ).

Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo contra un antígeno asociado a un tumor, permitiendo la selección selectiva de células cancerosas. Ejemplos de tales antígenos incluyen: mesotelina, antígeno de membrana específico de la próstata (AMEP), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H4 (también conocido como 08E), proteína tirosina quinasa 7 (PTK7), glipican-3, RG1, CTLA-4 y CD44. El anticuerpo puede ser animal (por ejemplo, murino), quimérico, humanizado, o, preferentemente, ser humano. El anticuerpo es, preferentemente, monoclonal, especialmente un anticuerpo humano monoclonal. La preparación de anticuerpos monoclonales humanos contra algunos de los antígenos mencionados anteriormente se describe en Korman et al., documento US 2009/0074660 A1 (B7H4); Rao-Naik et al., 8,097,703 B2 (CD19); King et al., documento US 2010/0143368 A1 (CD22); Keler et al., documento US 7.387.776 B2 (2008) (CD30); Terrett et al., documento US 8,124,738 B2 (CD70); Korman et al., documento US 6.984.720 B1 (2006) (CTLA-4); Korman et al., documento US 8.008.449 B2 (2011) (PD-1); Huang et al., documento US 2009/0297438 A1 y Cardarelli et al., documento US 7.875.278 B2 (PSMA); Terrett et al., documento US 2010/0034826 A1 (PTK7); Terrett et al., documento US 2010/0209432 (A1) (glipican-3); Harkins et al., documento US 7.335.748 B2 (2008) (RG1); Terrett et al., documento US 8.268.970 B2 (2012) (mesotelina); y Xu et al., Documento US 2010/0092484 A1 (CD44).

El ligando Z también puede ser un fragmento de anticuerpo o mimético de anticuerpo, tal como un afficuerpo, un anticuerpo de dominio (dAb), un nanocuerpo, un unicuerpo, una DARPin, una anticalina, un versacuerpo, una duocalina, una lipocalina o un avímero.

Cualquiera de varios grupos reactivos diferentes en el ligando Z puede ser un sitio de conjugación, incluyendo grupos  $\epsilon$ -amino en restos de lisina, restos de carbohidratos colgantes, grupos de ácido carboxílico, grupos disulfuro y grupos tiol. Cada tipo de grupo reactivo representa una compensación, que tiene algunas ventajas y algunas desventajas. Para revisiones sobre grupos reactivos de anticuerpos adecuados para conjugación, véase, por ejemplo, Garnett, Adv. Drug Delivery Rev. 53 (2001), 171-216 y Dubowchik y Walker, Pharmacology & Therapeutics 83 (1999), 67-123.

En una realización, el ligando Z se conjuga a través de un grupo  $\epsilon$ -amino de lisina. La mayoría de los anticuerpos tienen múltiples grupos  $\epsilon$ -amino de lisina, que se puede conjugar a través de enlaces amida, urea, tiourea o carbamato que utilizan técnicas conocidas en la materia. Sin embargo, es difícil controlar cuál y cuántos grupos  $\epsilon$ -

amino reaccionan, lo que conduce a una potencial variabilidad entre lotes en las preparaciones de conjugados. Asimismo, la conjugación puede producir la neutralización de un grupo  $\epsilon$ -amino protonado importante para mantener la conformación nativa del anticuerpo o puede tener lugar en una lisina cercana o en el sitio de unión al antígeno, ninguno de los cuales es algo deseable.

5 En otra realización, el ligando Z se puede conjugar a través de una cadena lateral de carbohidratos, dado que muchos anticuerpos están glicosilados. La cadena lateral de carbohidratos se puede oxidar con peryodato para generar grupos aldehído, que a su vez puede reaccionar con aminas para formar un grupo imina, tal como en una semicarbazona, oxima o hidrazona. Si se desea, el grupo imina se puede convertir en un grupo amina más estable por reducción con cianoborohidruro de sodio. Para divulgaciones adicionales sobre la conjugación a través de cadenas laterales de carbohidratos, véase, por ejemplo, Rodwell et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83, 2632-2636 (1986). Al igual que con los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina, existe preocupación con respecto a la reproducibilidad de la localización del sitio o sitios de conjugación y la estequiometría.

15 En otra realización más, el ligando Z se puede conjugar a través de un grupo de ácido carboxílico. En una realización, un grupo terminal de ácido carboxílico está funcionalizado para generar una carbohidrazida, que luego se hace reaccionar con un resto de conjugación portador de aldehído. Véase Fisch et al., Bioconjugate Chemistry 1992, 3, 147-153.

20 En otra realización más, el anticuerpo Z puede conjugarse a través de un grupo disulfuro que une un resto de cisteína en el anticuerpo Z y un azufre en la otra porción del conjugado. Algunos anticuerpos carecen de grupos tiol libres (sulfhidrilo) pero tienen grupos disulfuro, por ejemplo en la región bisagra. En tal caso, los grupos tiol libres pueden generarse por reducción de grupos disulfuro nativos. Los grupos tiol generados de este modo se pueden usar para la conjugación. Véase, por ejemplo, Packard et al., Biochemistry 1986, 25, 3548-3552; King et al., Cancer Res. 54, 6176-6185 (1994); y Doronina et al., Nature Biotechnol. 21(7), 778-784 (2003). De nuevo, existe preocupación con respecto a la localización del sitio de conjugación y la estequiometría y la posible alteración de la conformación nativa del anticuerpo.

30 Se conocen varios métodos para introducir grupos tiol libres en los anticuerpos sin romper los enlaces disulfuro nativos, métodos que se pueden poner en práctica con un ligando Z de la presente invención. Dependiendo del método empleado, puede ser posible introducir un número predecible de sulfhidrilos libres en localizaciones predeterminadas. En un enfoque, se preparan anticuerpos mutados en los que una cisteína se sustituye por otro aminoácido. Véase, por ejemplo, Eigenbrot et al., documento US 7.521.541 B2 (2009); Chilkoti et al., Bioconjugate Chem. 1994, 5: 504-507; Urmovitz et al., documento US 4,698,420 (1987); Stimmel et al., J. Biol. Chem., 275 (39), 30445-30450 (2000); Bam et al., documento US 7.311.902 B2 (2007); Kuan et al., J. Biol. Chem., 269 (10), 7610-7618 (1994); Poon et al., J. Biol. Chem., 270 (15), 8571-8577 (1995). En otro enfoque, se añade una cisteína adicional al extremo C. Véase, por ejemplo, Cumber et al., J. Immunol., 149, 120-126 (1992); King et al., Cancer Res., 54, 6176-6185 (1994); Li et al., Bioconjugate Chem., 13, 985-995 (2002); Yang et al., Protein Engineering, 16, 761-770 (2003); y Olafson et al., Protein Engineering Design & Selection, 17, 21-27 (2004). Un método preferente para introducir cisteínas libres es el que enseñan Liu et al., documento WO 2009/026274 A1, en el que se añade una secuencia de aminoácidos que contiene cisteína al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo. Este método introduce un número conocido de residuos de cisteína (uno por cadena pesada) en una localización conocida del sitio de unión del antígeno.

45 En otra realización más, los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina pueden modificarse con reactivos tales como 2-iminotiolano o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), convirtiendo un grupo  $\epsilon$ -amino en un grupo tiol o disulfuro, de modo que se crea un sustituto de cisteína, como estaba. Sin embargo, este método tiene la misma localización de conjugación y limitaciones estequiométricas asociadas con los grupos  $\epsilon$ -amino propiamente dichos.

#### 50 Componentes del enlazador

Como se ha señalado anteriormente, la parte del enlazador de un conjugado de la presente invención comprende hasta tres elementos: un grupo C escindible y espaciadores opcionales  $X^z$  y  $X^D$ .

55 El grupo C escindible es un grupo escindible en condiciones fisiológicas, preferentemente seleccionado de modo que sea relativamente estable mientras el conjugado está en circulación general en el plasma sanguíneo, pero se escinde fácilmente una vez que el conjugado alcanza su sitio de acción prevista, es decir, cerca, en, o dentro de la célula objetivo. Preferentemente, el conjugado es internalizado por una célula diana tras la unión del anticuerpo Z a un antígeno mostrado en la superficie de la célula diana. Posteriormente, la escisión del grupo C se produce en un cuerpo vesicular de la célula diana (un endosoma temprano, un endosoma tardío o, especialmente, un lisosoma).

65 En una realización, el grupo C es un grupo sensible al pH. El pH en el plasma sanguíneo es ligeramente superior al neutro, mientras que el pH dentro de un lisosoma es ácido, aproximadamente 5. Por tanto, un grupo C cuya escisión es catalizada por ácido se escindirán a una velocidad de varios órdenes de magnitud más rápida dentro de un lisosoma que en el plasma sanguíneo. Ejemplos de grupos sensibles a los ácidos adecuados incluyen cis-aconitilamidas e hidrazonas, como se describe en Shen et al., documento US 4,631,190 (1986); Shen et al.,

documento US 5,144,011 (1992); Shen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1048-1054 (1981) y Yang et al., *Proc. Natl Acad. Sci (USA)*, 85, 1189-1193 (1988).

En otra realización, el grupo C es un disulfuro. Los disulfuros pueden ser escindidos por un mecanismo de intercambio tiol-disulfuro, a una velocidad dependiente de la concentración ambiental de tiol. Como la concentración intracelular de glutatión y otros tioles es más alta que sus concentraciones séricas, la velocidad de escisión de un disulfuro será mayor intracelularmente. Además, la velocidad de intercambio tiol-disulfuro se puede modular mediante el ajuste de las características estéricas y electrónicas del disulfuro (por ejemplo, un disulfuro de alquil-arilo frente a un disulfuro de alquil-alquilo; sustitución en el anillo arilo, etc.), lo que permite el diseño de enlaces disulfuro que tienen una estabilidad en suero mejorada o una velocidad de escisión en particular. Para divulgaciones adicionales relacionadas con grupos disulfuro escindibles en los conjugados, véase, por ejemplo, Thorpe et al., *Cancer Res.* 48, 6396-6403 (1988); Santi et al., documento US 7.541.530 B2 (2009); Ng et al., documento US 6.989.452 B2 (2006); Ng et al., documento WO 2002/096910 A1; Boyd et al., documento US 7.691.962 B2; y Sufi et al., documento US 2010/0145036 A1.

Un grupo escindible preferido es un péptido que se escinde selectivamente por una proteasa dentro de la célula diana, a diferencia de una proteasa en el suero. Normalmente, un grupo péptido escindible comprende de 1 a 20 aminoácidos, preferentemente de 1 a 6 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 3 aminoácidos. El/los aminoácido(s) pueden ser  $\alpha$ -aminoácidos naturales y/o no naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como los aminoácidos obtenidos a partir de los mismos, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, citrulina y O-fosfoserina. En este contexto, el término "aminoácido" también incluye análogos y miméticos de aminoácidos. Los análogos son compuestos que tienen la misma estructura general de  $H_2N(R)CHCO_2H$  de un aminoácido natural, excepto que el grupo R no se encuentra entre los aminoácidos naturales. Ejemplos de análogos incluyen homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido y metionina metil sulfonio. Un mimético de aminoácido es un compuesto que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un  $\alpha$ -aminoácido pero funciona de una manera similar al mismo. El aminoácido puede ser de la estereoquímica "L" de los aminoácidos codificados genéticamente, así como de la estereoquímica "D" enantiomérica.

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

Para conjugados que no están destinados a ser internalizados por una célula, se puede elegir un grupo C de modo que sea escindido por una proteasa presente en la matriz extracelular en las proximidades del tejido objetivo, por ejemplo, una proteasa liberada por células moribundas cercanas o una proteasa asociada a un tumor. Las proteasas asociadas a tumores extracelulares de ejemplo son las metaloproteasas de matriz (MMP), oligopeptidasa Thimet (TOP) y CD10.

Para conjugados que están diseñados para ser internalizados por una célula, el grupo C comprende, preferentemente, una secuencia de aminoácidos seleccionada para la escisión por una proteasa endosomal o lisosomal, especialmente esta última. Los ejemplos no limitantes de tales proteasas incluyen catepsinas B, C, D, H, L y S, especialmente catepsina B. La catepsina B escinde, preferentemente, los péptidos en una secuencia  $-AA^2-AA^1-$  en la que  $AA^1$  es un aminoácido básico o con enlaces de hidrógeno muy fuertes (tal como lisina, arginina o citrulina) y  $AA^2$  es un aminoácido hidrofóbico (tal como fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina), por ejemplo, Val-Cit (donde Cit indica citrulina) o Val-Lys. (En el presente documento, las secuencias de aminoácidos se escriben en la dirección N a C, como en  $H_2N-AA^2-AA^1-CO_2H$ , a menos que el contexto indique claramente otra cosa). Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit y Asp-Val-Cit también son motivos peptídicos de sustrato para la catepsina B, aunque en algunos casos la velocidad de escisión puede ser más lenta. Para obtener información adicional sobre los grupos escindibles con catepsina, véase Dubowchik et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.* 8, 3341-3346 (1998); Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 3347-3352 (1998); y Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13, 855-869 (2002). Otra enzima que se puede utilizar para romper los enlaces peptídicos es la legumaina, una cisteína proteasa lisosomal que se escinde, preferentemente, en Ala-Ala-Asn.

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

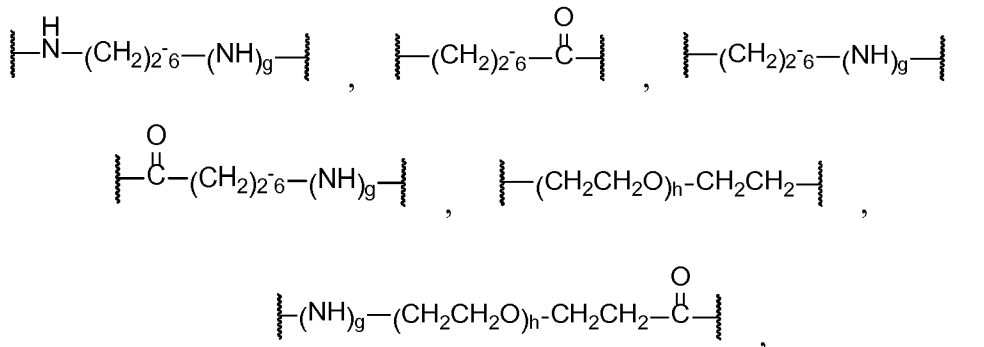
La preparación y diseño de los grupos C escindibles que consisten en un solo aminoácido se describe en Chen et al., documento US 2010/0113476 A1.

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

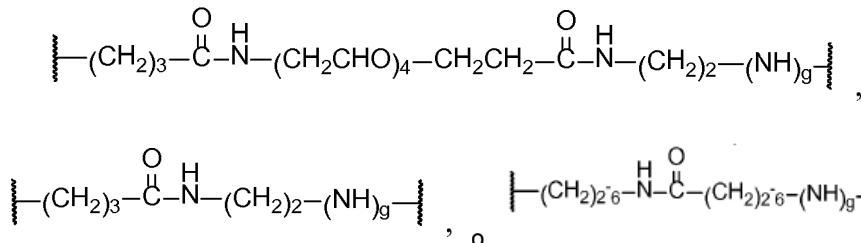


El grupo C puede unirse directamente al anticuerpo Z o al análogo D; es decir los espaciadores X<sup>Z</sup> y X<sup>D</sup>, según sea el caso, pueden estar ausentes. Por ejemplo, si el grupo C es un disulfuro, uno de los dos azufres puede ser un residuo de cisteína o su sustituto en el anticuerpo Z. O, el grupo C puede ser una hidrazona unida a un aldehído en una cadena lateral de carbohidrato del anticuerpo. O, el grupo C puede ser un enlace peptídico formado con un grupo lisina ε-amino del anticuerpo Z. En una realización preferida, el compuesto D está unido directamente al grupo C a través de un enlace peptídico a un grupo carboxilo o amina en el compuesto D.

Cuando están presentes, el espaciador X<sup>Z</sup> proporciona separación espacial entre el grupo C y el anticuerpo Z, para que el primero no interfiera estéricamente con la unión del antígeno por este último o el último interfiera estéricamente con la escisión del primero. Además, el espaciador X<sup>Z</sup> puede usarse para conferir mayor solubilidad o propiedades de agregación disminuidas a los conjugados. Un espaciador X<sup>Z</sup> puede comprender uno o más segmentos modulares, que pueden ensamblarse en cualquier número de combinaciones. Ejemplos de segmentos adecuados para un espaciador X<sup>Z</sup> son:



y combinaciones de los mismos, donde el subíndice g es 0 o 1 y el subíndice h es 1 a 24, preferentemente 2 a 4. Estos segmentos pueden combinarse, tal como se ilustran a continuación:



El espaciador X<sup>D</sup>, si está presente, proporciona una separación espacial entre el grupo C y el compuesto D, para que el último no interfiera estéricamente o electrónicamente con la división del primero. El espaciador X<sup>D</sup> también puede servir para introducir masa molecular adicional y funcionalidad química en un conjugado. En general, la masa adicional y la funcionalidad afectarán la vida media del suero y otras propiedades del conjugado. Por lo tanto, a través de la selección juiciosa de grupos espaciadores, se puede modular la semivida en suero de un conjugado. El espaciador X<sup>D</sup> también puede ensamblarse a partir de segmentos modulares, como se describió anteriormente en el contexto del espaciador X<sup>Z</sup>.

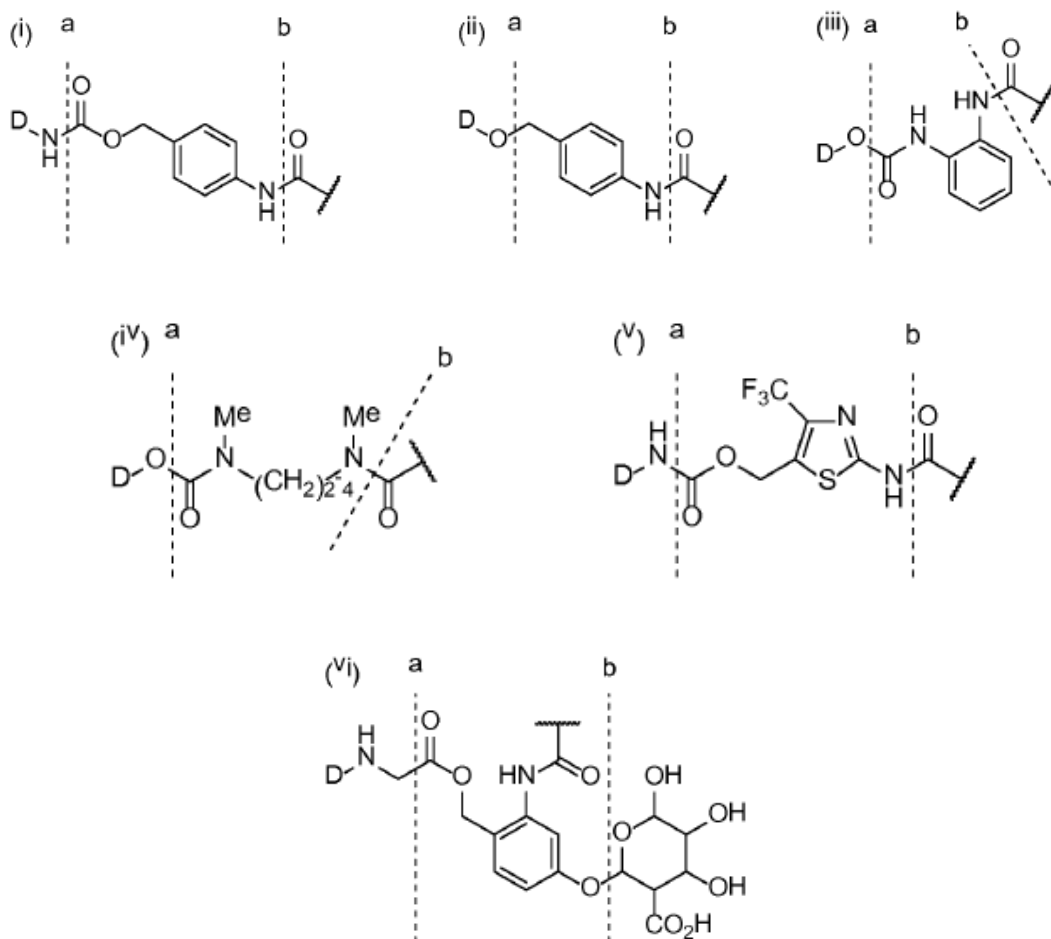
Los espaciadores X<sup>Z</sup> y/o X<sup>D</sup>, cuando están presentes, preferentemente proporcionan una separación lineal de 4 a 25 átomos, más preferentemente de 4 a 20 átomos, entre Z y C o D y C, respectivamente.

El enlazador puede realizar otras funciones además de enlazar covalentemente el anticuerpo y el fármaco. Por ejemplo, el enlazador puede contener grupos de poli(etilenglicol) (PEG), que mejoran la solubilidad durante el desempeño de la química de conjugación o en el producto final de ADC. Cuando un grupo PEG está presente, puede incorporarse en el espaciador X<sup>Z</sup> de X<sup>D</sup>, o en ambos. El número de unidades repetidas en un grupo de PEG puede ser de 2 a 20, preferentemente entre 4 y 10.

Ya sea el espaciador X<sup>Z</sup> o el X<sup>D</sup>, o ambos, pueden comprender un resto autoinmolador. Un resto autoinmolador es un resto que (1) está unido al grupo C y el anticuerpo Z o la citotoxina D y (2) tiene una estructura tal que la escisión del grupo C inicia una secuencia de reacción que resulta en el resto autoinmolador que se separa del anticuerpo Z o citotoxina D, según sea el caso. En otras palabras, la reacción en un sitio distal del anticuerpo Z o citotoxina D (escisión del grupo C) hace que el enlace X<sup>Z</sup>-Z o X<sup>D</sup>-D también se rompa. La presencia de un resto autoinmolador es deseable en el caso del espaciador X<sup>D</sup> porque, si después de la escisión del conjugado, el espaciador X<sup>D</sup> o una porción del mismo permaneciera unido a la citotoxina D, la actividad biológica de este último puede verse afectada.

El uso de un resto autoinmolador es especialmente deseable cuando el grupo C escindible es un polipéptido, en cuyo caso el resto autoinmolador está normalmente localizado adyacente al mismo.

5 Los restos autoinmoladores a modo de ejemplo (i)-(v) unidos a un grupo hidroxilo o amino en una molécula D asociada se muestran a continuación:

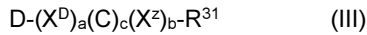


10 El resto autoinmolador es la estructura entre las líneas de puntos a y b, con características estructurales adyacentes que se muestran para proporcionar contexto. Los restos autoinmoladores (i) y (v) están unidos a un compuesto D-NH<sub>2</sub> (es decir, el compuesto D se conjuga a través de un grupo amino), mientras que los restos autoinmoladores (ii),  
 15 (iii) y (iv) son unido a un compuesto D-OH (es decir, el compuesto D se conjuga mediante un grupo hidroxilo o carboxilo). La escisión del enlace amida en la línea de puntos b (por ejemplo, mediante una peptidasa) libera el nitrógeno de la amida como un nitrógeno de amina, iniciando una secuencia de reacción que resulta en la escisión del enlace en la línea de puntos a y la consiguiente liberación de D-OH o D-NH<sub>2</sub>, según sea el caso. Como alternativa, la escisión que desencadena la reacción de autoinmolación puede ser por un tipo diferente de enzima, por ejemplo, por una β-glucuronidasa, como en el caso de la estructura (vi). Para divulgaciones adicionales con respecto a restos autoinmoladores, véase Carl et al., J. Med. Chem., 24 (3), 479-480 (1981); Carl et al., WO 81/01145 (1981); Dubowchik et al., Pharmacology & Therapeutics, 83, 67-123 (1999); Firestone et al., US 6,214,345 B1 (2001); Toki et al., J. Org. Chem. 67, 1866-1872 (2002); Doronina et al., Nature Biotechnology 21 (7), 778-784 (2003) (*erratum*, pág. 941); Boyd et al., documento US 7,691,962 B2; Boyd et al., documento US 2008/0279868 A1; Sufi et al., documento WO 2008/083312 A2; Feng, documento US 7,375,078 B2; Jeffrey et al., documento US 8039,273; y Senter et al., US 2003/0096743 A1. Un grupo autoinmolador preferido es el grupo p-aminobenciloxycarbonilo (PABC), como se muestra en la estructura (i).

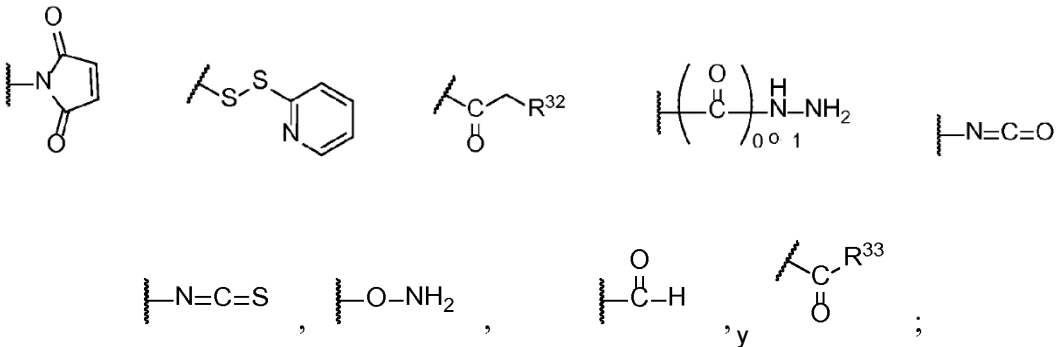
20 En otra realización, un anticuerpo dirigido a un resto y el compuesto citotóxico D están unidos por un enlazador no escindible, es decir, el elemento C está ausente. La degradación del anticuerpo reduce eventualmente el enlazador a un pequeño resto unido que no interfiere con la actividad biológica del compuesto citotóxico D.  
 30

Técnicas de conjugación

Los conjugados de esta invención se hacen preferiblemente preparando primero un compuesto que comprende un análogo de esta invención (representado por D en las fórmulas a continuación) y el enlazador  $(X^D)_a(C)_c(X^Z)_b$  (donde  $X^D$ , C,  $X^Z$ , a, b y c son como se definen para la fórmula (II)) para formar una composición de enlace a análogo representado por la fórmula (III):



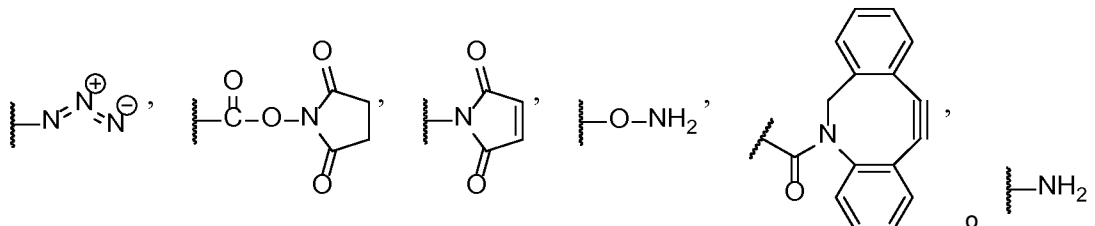
10 donde  $R^{31}$  es un grupo funcional adecuado para reaccionar con un grupo funcional complementario en el anticuerpo Z para formar el conjugado. Ejemplos de grupos  $R^{31}$  adecuados incluyen amino, azida, ciclooctina,



donde  $R^{32}$  es Cl, Br, F, mesilato o tosilato y  $R^{33}$  es Cl, Br, I, F, OH, -O-N-succinimido, -O-(4-nitrofenilo), -O-pentafluorofenilo u -O-tetrafluorofenilo. La química generalmente utilizable para la preparación de restos adecuados  $D-(X^D)_a(C)_c(X^Z)_b-R^{31}$  se desvela en Ng et al., documento US 7,087,600 B2 (2006); Ng et al., documento US 6,989,452 B2 (2006); Ng et al., documento US 7,129,261 B2 (2006); Ng et al., documento WO 02/096910 A1; Boyd et al., documento US 7,691,962 B2; Chen et al., documento US 7,517,903 B2 (2009); Gangwar et al., documento US 7,714,016 B2 (2010); Boyd et al., documento US 2008/0279868 A1; Gangwar et al., documento US 7,847,105 B2 (2010); Gangwar et al., documento US 7,968,586 B2 (2011); Sufi et al., documento US 2010/0145036 A1; y Chen et al., documento US 2010/0113476 A1.

25

Preferentemente el grupo funcional reactivo  $-R^{31}$  es  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-CO_2H$ ,  $-SH$ , maleimido, ciclooctina, azido ( $-N^3$ ), hidroxilamino ( $-ONH_2$ ) o N-hidroxisuccinimido. Los grupos funcionales  $-R^{31}$  especialmente preferidos son:



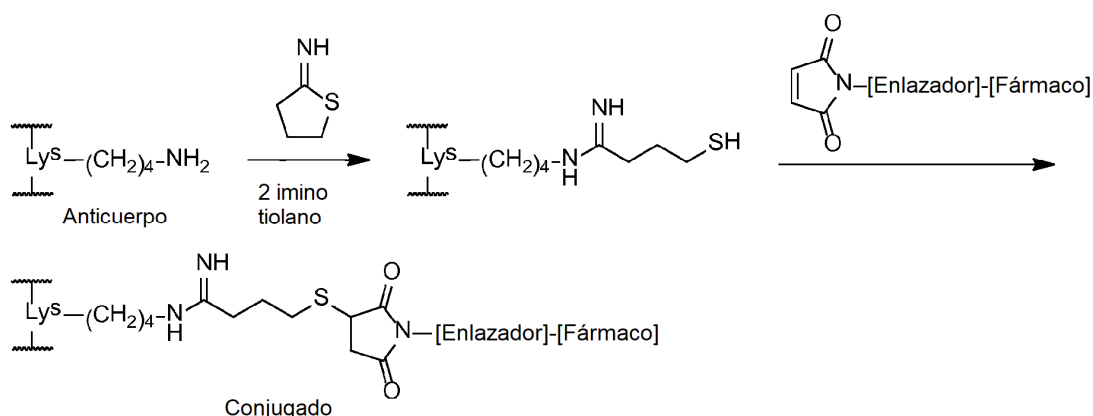
Un grupo  $-OH$  puede esterificarse con un grupo carboxi en el anticuerpo, por ejemplo, en una cadena lateral de ácido aspártico o glutámico.

35 Un grupo  $-CO_2H$  puede esterificarse con un grupo  $-OH$  o amidarse con un grupo amino (por ejemplo, en una cadena lateral de lisina) en el anticuerpo.

Un grupo N-hidroxisuccinimida es funcionalmente un grupo carboxilo activado y puede amidarse convenientemente por reacción con un grupo amino (por ejemplo, de lisina).

40 Un grupo maleimida se puede conjugar con un grupo  $-SH$  en el anticuerpo (por ejemplo, de la cisteína o de la modificación química del anticuerpo para introducir una funcionalidad sulfhidrilo), en una reacción de adición de Michael.

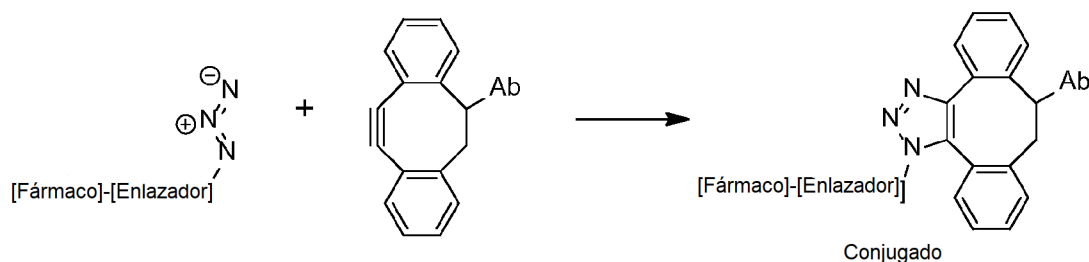
45 Varias técnicas pueden ser la introducción de un grupo  $-SH$  en un anticuerpo. En uno preferido, un grupo  $\epsilon$ -amino en la cadena lateral de un residuo de lisina en el anticuerpo se hace reaccionar con 2-iminotiolano para introducir un grupo tiol libre ( $-SH$ ). El grupo tiol puede reaccionar con una maleimida u otro grupo aceptor de nucleófilos para efectuar la conjugación:



Normalmente, se alcanza un nivel de tiolación de dos a tres tioles por anticuerpo. Para un procedimiento representativo, véase Cong et al. Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo para la conjugación con un análogo de tubulicina de esta invención tiene uno o más residuos de lisina (preferentemente dos o tres) modificados por reacción con iminotiolano.

También se puede usar un grupo -SH para la conjugación donde el anticuerpo se ha modificado para introducir un grupo de maleimida al mismo, en una reacción de adición de Michael que es la "imagen especular" de la descrita anteriormente. Los anticuerpos pueden modificarse para que tengan grupos maleimida con 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo (SMCC) o su variante sulfo-SMCC sulfonada, estando disponibles ambos reactivos de Sigma-Aldrich.

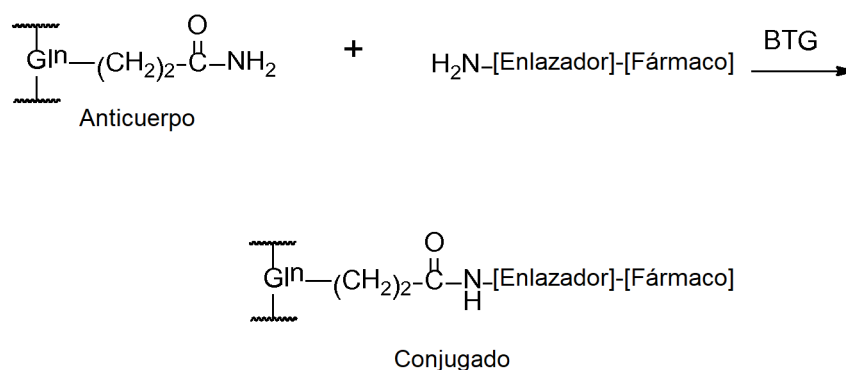
Una técnica de conjugación alternativa emplea la "química de clic", libre de cobre, en la que un grupo azida se agrega a través del enlace alquino colado de un ciclooctino para formar un anillo de 1,2,3-triazol. Véase, por ejemplo, Agard et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 2004,126, 15046; Best, *Biochemistry* 2009, 48, 6571. La azida puede localizarse en el anticuerpo y el resto del fármaco, o viceversa. Un grupo ciclooctino preferido es dibenzociclooctino (DIBO). Varios reactivos que tienen un grupo DIBO están disponibles en Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregón. La siguiente reacción ilustra la conjugación química de clic para el caso en el que el grupo DIBO está unido al anticuerpo (Ab):



Otra técnica de conjugación implica la introducción de un aminoácido no natural en un anticuerpo, con el aminoácido no natural que proporciona una funcionalidad para la conjugación con un grupo funcional reactivo en el resto de fármaco. Por ejemplo, el aminoácido no natural p-acetilfenilalanina puede incorporarse en un anticuerpo u otro polipéptido, como se enseña en Tian et al., documento WO 2008/030612 A2 (2008). El grupo cetona en p-acetilfenilalanina puede ser un sitio de conjugación a través de la formación de una oxima con un grupo hidroxilamino en el resto enlazante-fármaco. Como alternativa, el aminoácido no natural p-azidofenilalanina puede incorporarse en un anticuerpo para proporcionar un grupo funcional azida para la conjugación mediante química de clic, como se ha analizado anteriormente. Los aminoácidos no naturales también pueden incorporarse en un anticuerpo u otro polipéptido usando métodos libres de células, como se enseña en Goerke et al., documento US 2010/0093024 A1 (2010) y Goerke et al., *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102 (2), 400-416. Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo que se usa para hacer un conjugado con una tubulicina de esta invención tiene uno o más aminoácidos reemplazados por un aminoácido no natural, que preferentemente es p-acetilfenilalanina o p-azidofenilalanina, más preferentemente p-acetilfenilalanina.

Otra técnica de conjugación más, utiliza la enzima transglutaminasa (preferentemente transglutaminasa bacteriana o BTG), según Jeger et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9995. BTG forma un enlace amida entre la carboxamida de la cadena lateral de una glutamina (el aceptor de amina) y un grupo alquilenamino (el donante de amina), que puede ser, por ejemplo, el grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina o un grupo 5-amino-n-pentilo. En una reacción de conjugación típica, el residuo de glutamina se encuentra en el anticuerpo, mientras que el grupo alquilenamino se encuentra en el

resto enlazador-fármaco, como se muestra a continuación:



5 La posición de un resto de glutamina en una cadena polipeptídica tiene un gran efecto sobre su susceptibilidad a la transamidación mediada por BTG. Ninguno de los restos de glutamina en un anticuerpo son sustratos normales de BTG. Sin embargo, si el anticuerpo está desglicosilado, siendo el sitio de glicosilación asparagina 297 (N297, la glutamina 295 (Q295) cercana se vuelve susceptible a BTG. Un anticuerpo puede desglicosilarse enzimáticamente por tratamiento con PNGasa F (Péptido-N-Glicosidasa F). Como alternativa, se puede sintetizar un anticuerpo libre de glucósidos mediante la introducción de una mutación N297A en la región constante, para eliminar el sitio de glicosilación N297. Además, se ha demostrado que una sustitución N297Q en un anticuerpo no solo elimina la glicosilación, sino que también introduce un segundo resto de glutamina (en la posición 297) que también es un aceptor de amina. Por tanto, en una realización, un anticuerpo que está conjugado con un análogo de tubulisina de la presente invención está desglicosilado. En otra realización, el anticuerpo tiene una sustitución N297Q. Los expertos en la materia apreciarán que la desglicosilación por modificación posterior a la síntesis o introduciendo una mutación N297A genera dos restos de glutamina reactivos a BTG por anticuerpo (uno por cadena pesada, en la posición 295), mientras que un anticuerpo con una sustitución N297Q tendrá cuatro restos de glutamina reactivos con BTG (dos por cadena pesada, en las posiciones 295 y 297).

20 La conjugación también puede efectuarse utilizando la enzima Sortasa A, como se enseña en Levary et al., PLoS One 2011, 6(4), e18342; Proft, Biotechnol. Lett. 2010, 32: 1-10; Ploegh et al., documento WO 2010/087994 A2 (2010); y Mao et al., documento WO 2005/051976 A2 (2005). El motivo de reconocimiento de la sortasa A (normalmente LPXTG, donde X es cualquier aminoácido natural) puede ubicarse en el ligando Z y el motivo del aceptor nucleófilo (normalmente GGG) puede ser el grupo R31 en la fórmula (III), o viceversa.

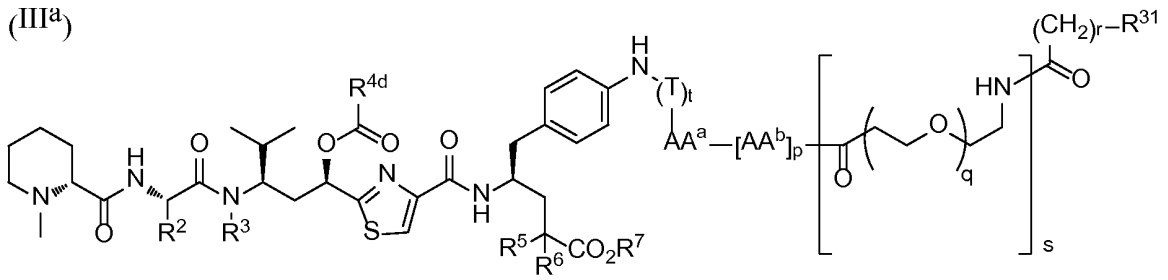
25 Un anticuerpo también puede adaptarse para la conjugación modificando su grupo glicosilo para introducir un grupo ceto que sirve como sitio de conjugación mediante la formación de oxima, según lo enseñado por Zhu et al., mAbs 2014, 6, 1. En otra variación de la geoingeniería, se puede modificar un grupo glicosilo de un anticuerpo para introducir un grupo azida para la conjugación mediante "química de clic". Véase Huang et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308 y Wang, documentos US 8.900.826 B2 (2014) y US 7.807.405 B2 (2010).

35 Otra técnica de conjugación se puede denominar en general puente de disulfuro: los enlaces disulfuro en un anticuerpo se escinden, creando un par de grupos tiol (-SH). El anticuerpo se trata luego con un compuesto fármaco-enlazador que contiene dos sitios reactivos con tiol. La reacción de los grupos tiol con los dos sitios efectúa una reconexión que vuelve a crear, de una manera, el puente disulfuro original, preservando así la estructura terciaria del anticuerpo y uniendo un resto enlazador-fármaco. Véase, por ejemplo, Burt et al., documento WO 2013/190292 A2 (2013) y Jackson et al., documento US 2013/0224228 A1 (2013).

#### Compuestos de análogo-enlazador

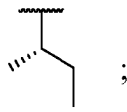
40 En general, un ADC de un análogo de tubulisina de la presente invención comprende un enlazador unido en un extremo del mismo a un grupo amina localizado en una subunidad Mep, Tuv o Tup modificada (preferentemente una subunidad Mep o Tup modificada). El enlazador está unido en el otro extremo del mismo al anticuerpo. Reflejando la diversidad de técnicas de conjugación disponibles, los análogos de tubulisina de la presente invención pueden elaborarse en muchos compuestos de enlazador-análogo de tubulisina diferentes adecuados para la conjugación con un anticuerpo.

Un compuesto de enlace a análogo de tubulisina preferido tiene una estructura representada por la fórmula (IIIa):

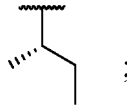


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;  
en donde

5 R<sup>2</sup> es Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



10 preferentemente CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



15 R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> (preferentemente alquilo C<sub>1-5</sub>);

R<sup>4d</sup> es Me o NHMe;

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo (preferentemente ambos son Me);

R<sup>7</sup> es H, Me o Et;

20 T es un grupo autoinmolador;

t es 0 o 1;

AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

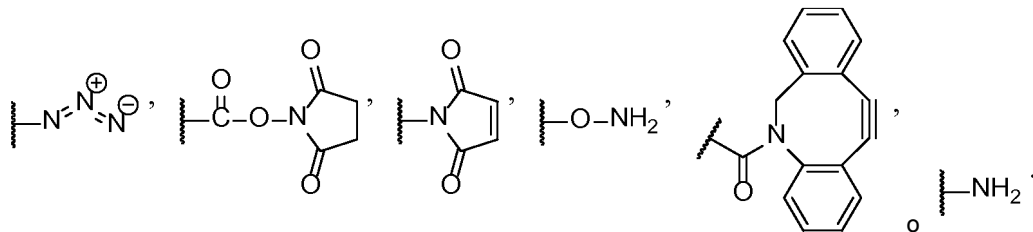
p es 1, 2, 3 o 4;

q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 2, 3 o 4);

r es 1, 2, 3, 4 o 5;

s es 0 o 1; y

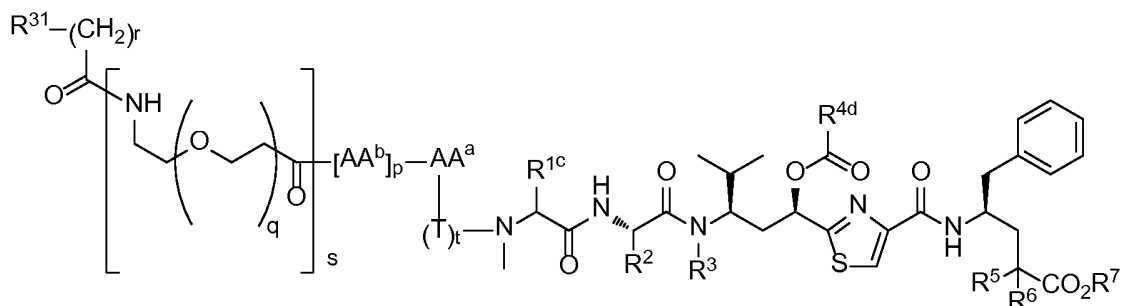
30 R<sup>31</sup> es



Otro compuesto de enlace a análogo de tubulisina preferido tiene una estructura representada por la fórmula (IIIc):

35

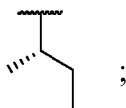
(IIIc)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;  
en donde

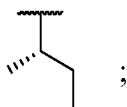
5

R<sup>1c</sup> es H, Me o CH(Me)<sub>2</sub> (preferentemente CH(Me)<sub>2</sub>);  
R<sup>2</sup> es Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



10

preferentemente CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



15

R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenido C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquenido C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> (preferentemente alquilo C<sub>1-5</sub>);  
R<sup>4d</sup> es Me o NHMe;

20

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo (preferentemente ambos son Me);

25

R<sup>7</sup> es H, Me o Et;

T es un grupo autoinmolador;

t es 0 o 1;

AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

p es 1, 2, 3 o 4;

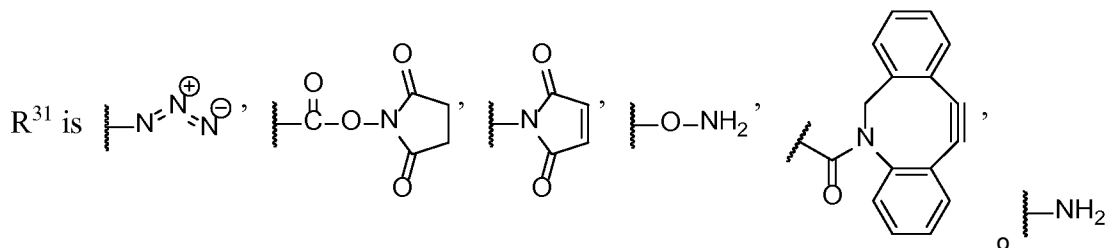
q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 2, 3 o 4);

r es 1, 2, 3, 4 o 5;

30

s es 0 o 1; y

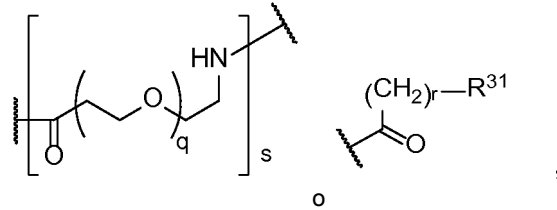
R<sup>31</sup> es



35 Por lo tanto, R<sup>31</sup> en las fórmulas (IIIa) y (IIIc) es un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional complementario en el anticuerpo.

En las fórmulas (IIIa) y (IIIc),  $-AA^a-[AA^b]_p-$  representa un polipéptido cuya longitud está determinada por el valor de  $p$  (dipéptido si  $p$  es 1, tetrapéptido si  $p$  es 3, etc.).  $AA^a$  está en el extremo carboxi del polipéptido y su grupo carboxilo forma un enlace peptídico (amida) con un nitrógeno de amina del análogo de tubulisina. Por el contrario, el último  $AA^b$  está en el extremo amino del polipéptido y su grupo  $\alpha$ -amino forma un enlace peptídico con

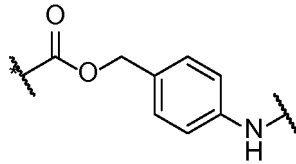
5



dependiendo de si  $s$  es 1 o 0, respectivamente.

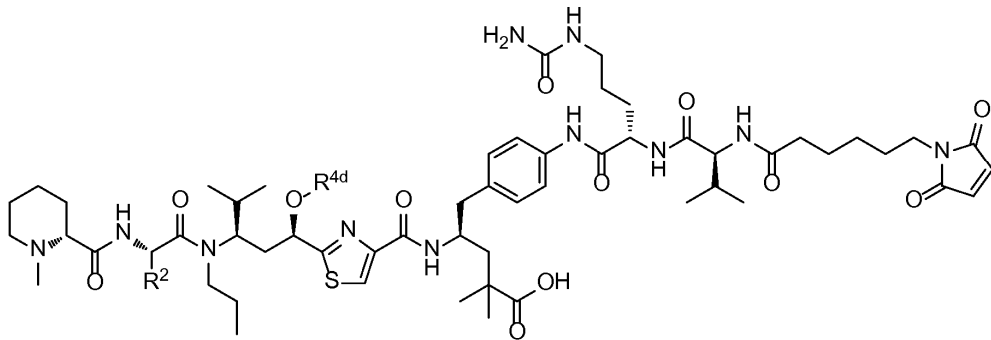
- 10 En las fórmulas (IIIa) y (IIIc), los polipéptidos preferidos  $-AA^a-[AA^b]_p-$  son Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit o Asp-Val-Cit, escrito en la dirección convencional de N a C, como en  $H_2N-Val-Cit-CO_2H$ ). Más preferentemente, el polipéptido es Val-Cit, Val-Lys o Val-Ala.

- 15 Como lo indica el subíndice  $t$  es igual a 0 o 1, el grupo autoinmolador está opcionalmente presente en los compuestos de fórmulas (IIIa) y (IIIc). Cuando está presente, el grupo C autoinmolador es preferentemente un grupo *p*-aminobenciloxycarbonilo (PABC), cuya estructura se muestra a continuación, con un asterisco (\*) que denota el final del PABC unido a un nitrógeno de amina del análogo de tubulisina.



20

Ejemplos de compuestos de enlace a análogo de esta invención de acuerdo con la fórmula (IIIa), en donde  $R^5$  y  $R^6$  son ambos metilo, incluyen compuestos (IIIa-1) a través de (IIIa-4):

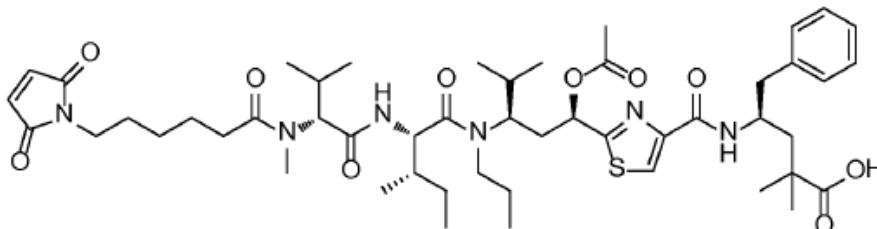
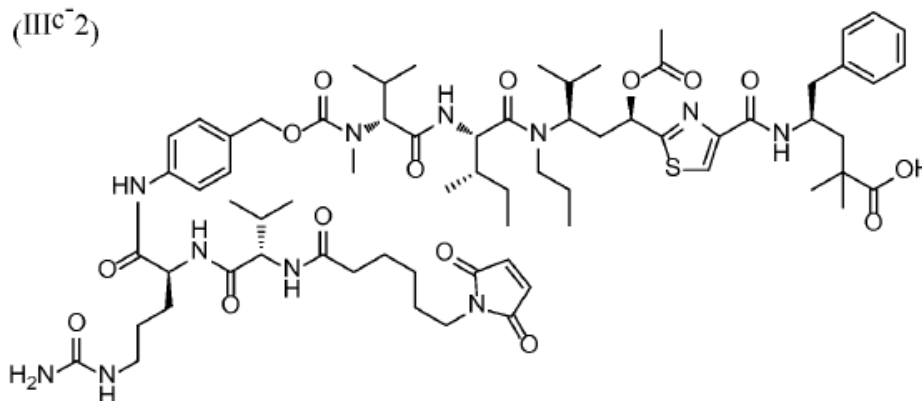
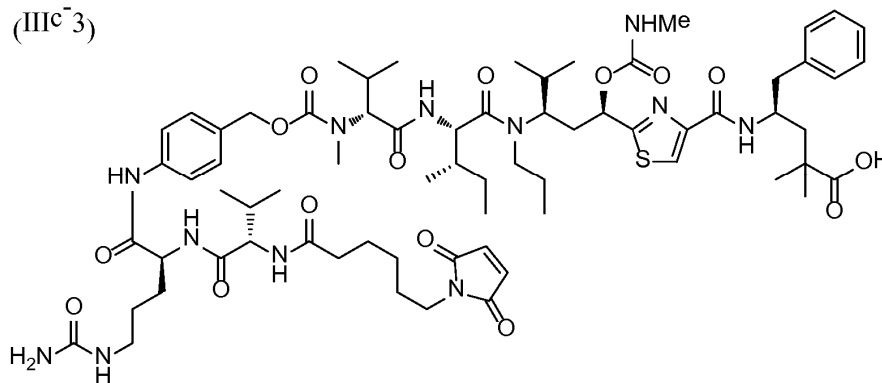


25

| Compuesto | $R^2$ | $R^{4d}$ |
|-----------|-------|----------|
| (IIIa-1)  |       | NHMe     |
| (IIIa-2)  |       |          |
| (IIIa-3)  |       |          |
| (IIIa-4)  |       |          |



Los compuestos enlazadores análogos de tubulisina específicos de acuerdo con la fórmula (IIIc) incluyen aquellos que tienen estructuras representadas por las fórmulas (IIIc-1) a (IIIc-3):

(IIIc<sup>1</sup>)(IIIc<sup>2</sup>)(IIIc<sup>3</sup>)

#### Preparación de conjugados

- 10 Este procedimiento general se basa en la introducción de grupos tiol libres en un anticuerpo por reacción de grupos  $\epsilon$ -amino de lisina con 2-iminotiolano, seguido de reacción con un resto fármaco-enlazador que contiene maleimida, tal y como se ha descrito con anterioridad. Inicialmente, el anticuerpo se intercambia en tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM y ácido pentaacético dietilentriamina 2 mM (DTPA) y se concentra a 5-10 mg/ml. La tiolación se logra mediante la adición de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano que debe
- 15 agregarse puede determinarse mediante un experimento preliminar y varía de un anticuerpo a otro. En un experimento preliminar, se añade una titulación de cantidades crecientes de 2-iminotiolano al anticuerpo, y después de la incubación con el anticuerpo durante 1 h a TA (temperatura ambiente, alrededor de 25 °C), el anticuerpo se desala en HEPES 50 mM, Glicina 5 mM, DTPA 2 mM, pH 5,5 usando una columna SEPHADEX™ G-25 y el número de grupos tiol introducidos se determinaron rápidamente por reacción con ditiodipiridina (DTDP). La reacción de los
- 20 grupos tiol con DTDP da como resultado la liberación de tiopiridina, que puede monitorizarse espectroscópicamente a 324 nm. Normalmente se usan muestras a una concentración de proteína de 0,5-1,0 mg/ml. La absorbancia a 280 nm puede usarse para determinar con precisión la concentración de proteína en las muestras, y después se incuba

una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 minutos a TA. Las muestras en blanco de tampón solo más DTDP también se incuban al lado. Después de 10 min, se mide la absorbancia a 324 nm y se cuantifica el número de grupos tiol utilizando un coeficiente de extinción para tiopiridina de 19.800 M<sup>-1</sup>.

5 Normalmente, es deseable un nivel de tiolación de aproximadamente dos a tres grupos tiol por anticuerpo. Por ejemplo, con algunos anticuerpos, esto se puede lograr mediante la adición de un exceso molar de 15 veces de 2-iminotiolano seguido de incubación a TA durante 1 h. Después, el anticuerpo se incubaba con 2-iminotiolano en la proporción molar deseada y después se desala en tampón de conjugación (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, DTPA 10 2 mM, pH 5,5)). El material tiolado se mantiene en hielo, mientras que el número de tioles introducidos se cuantifica como se describe anteriormente.

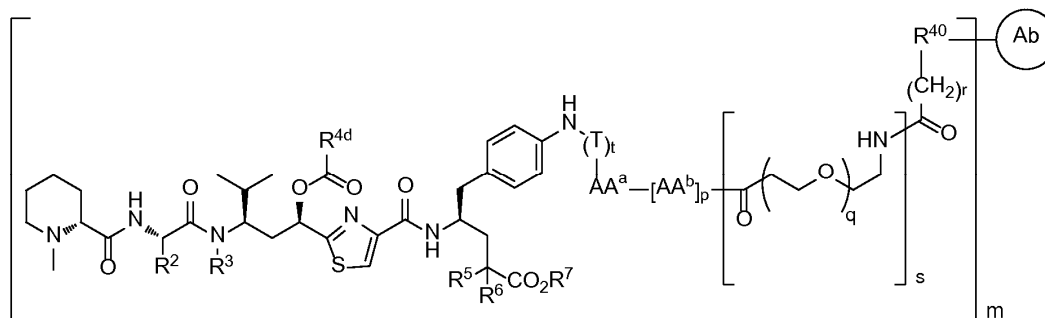
Después de la verificación del número de tioles introducidos, el resto del fármaco (citotoxina) se añade a un exceso molar de 2,5 veces por tiol. La reacción de conjugación se la permite proceder en un tampón de conjugación que 15 contiene una concentración final de propilenglicol al 25 % y de trehalosa al 5 %. De manera habitual, la solución madre de enlace a fármaco se disuelve en DMSO al 100 %. La solución madre se añade directamente al anticuerpo tiolado.

La mezcla de reacción de conjugación se incubaba a TA durante 2 h con agitación suave. Después, se añade un exceso molar de 10 veces de N-etil maleimida (100 mM solución madre en DMSO) a la mezcla de conjugación y se 20 agita durante una hora adicional para bloquear los tioles que no hayan reaccionado.

Después, la muestra se filtra a través de un filtro de 0,2 μ. El material se intercambia con tampón a través de una membrana TFF VivaFlow 50 Sartorius 30 MWCO PES en 10 mg/ml de glicina, 20 mg/ml de sorbitol, acetonitrilo al 25 % pH 5,0 (5X volumen de intercambio tampón TFF), para retirar cualquier fármaco sin reaccionar. La formulación 25 final se realiza por TFF en 20 mg/ml de sorbitol, 10 mg/ml de glicina, pH 5,0.

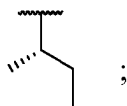
Un conjugado de anticuerpo-fármaco preferido de esta invención está representado por la fórmula (IIa):

30 (IIa)

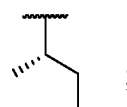


en donde

35 R<sup>2</sup> es Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



40 preferentemente CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



45 R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> (preferentemente alquilo C<sub>1</sub>-5);

R<sup>4d</sup> es Me o NHMe;

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo

(preferentemente ambos son Me);

R<sup>7</sup> es H, Me o Et;

T es un grupo autoinmolador;

t es 0 o 1;

5 AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

p es 1, 2, 3 o 4;

10 q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 2, 3 o 4);

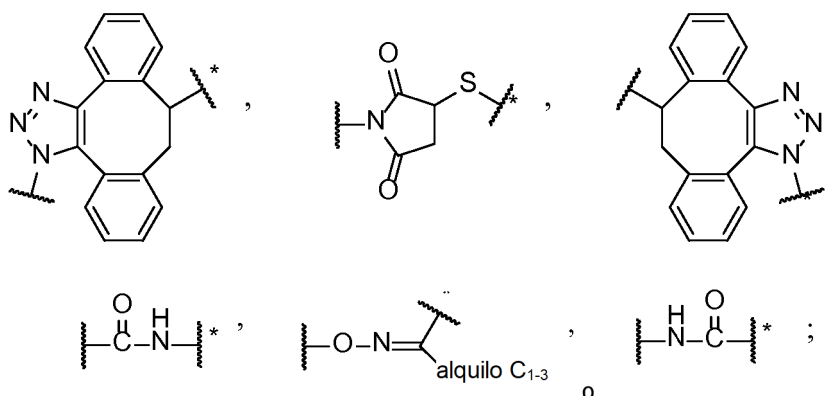
r es 1, 2, 3, 4 o 5;

s es 0 o 1;

Ab es un anticuerpo;

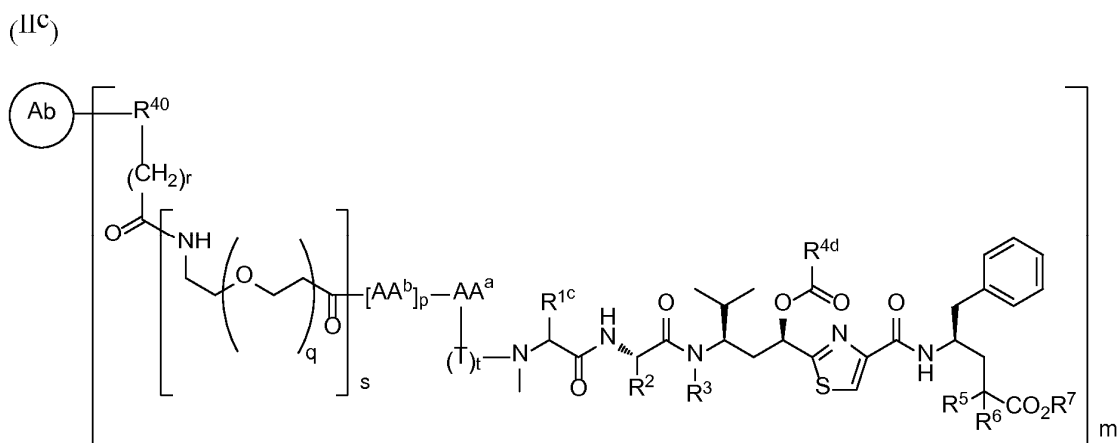
R<sup>40</sup> es

15



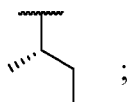
donde la valencia abierta de R<sup>40</sup> que se une a Ab se indica con un asterisco (\*); y m es 1, 2, 3 o 4.

20 Otra realización preferida de un conjugado de anticuerpo-fármaco de esta invención tiene una estructura representada por la fórmula (IIc):

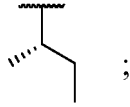


25 en donde

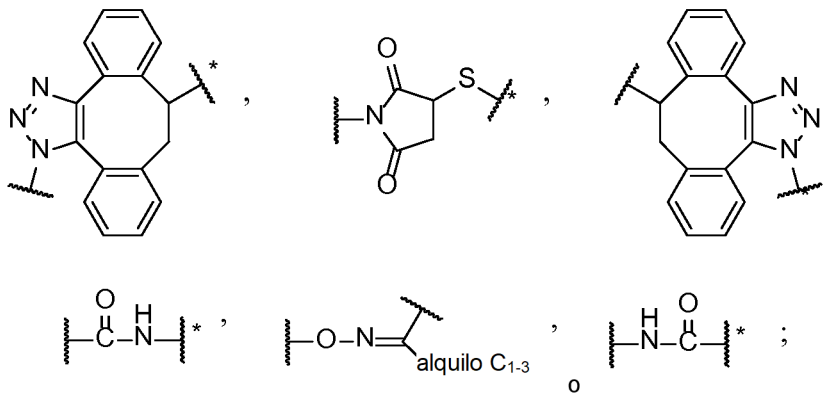
R<sup>2</sup> es Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



30 preferentemente CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



- 5  $R^3$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> (preferentemente alquilo C<sub>1</sub>-5);  
 $R^{4d}$  es Me o NHMe;  
 $R^5$  y  $R^6$  son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo (preferentemente ambos son Me);  
 $R^7$  es H, Me o Et;  
 T es un grupo autoinmolador;  
 t es 0 o 1;  
 AAa y cada AAb se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;  
 p es 1, 2, 3 o 4;  
 q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 2, 3 o 4);  
 r es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 s es 0 o 1;  
 Ab es un anticuerpo;  
 20  $R^{40}$  es



25 donde la valencia abierta de  $R^{40}$  que se une a Ab se indica con un asterisco (\*); y m es 1, 2, 3 o 4.

Los polipéptidos preferidos -AA<sup>a</sup>-[AA<sup>b</sup>]<sub>p</sub>- en la fórmula (IIa) y (IIc) son los mismos como en las fórmulas (IIIa) y (IIIc).

Los conjugados específicos de análogos de tubulisina de esta invención incluyen:

30 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, o de un conjugado del mismo, formulado junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente puede contener uno o más principios farmacéuticamente activos adicionales, tal como un anticuerpo u otro fármaco. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una terapia de combinación con otro agente terapéutico, especialmente otro agente contra el cáncer.

35 La composición farmacéutica puede comprender uno o más excipientes. Los excipientes que pueden usarse incluyen vehículos, agentes tensioactivos, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, solubilizantes, colorantes, agentes aromatizantes, recubrimientos, agentes disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos y combinaciones de los mismos. La selección y el uso de excipientes adecuados se enseña en Gennaro, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003)

45 Preferentemente, una composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, administración espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede estar recubierto en un material para protegerlo de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivarlo. La frase "administración parenteral" significa modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e

incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, la composición farmacéutica puede administrarse por vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, vaginal, por vía rectal, sublingual o tópica.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles. También se pueden formular en una microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para lograr una alta concentración de fármaco. Las composiciones también se pueden proporcionar en forma de liofilizados, para la reconstitución en agua antes de la administración.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración y generalmente será esa cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente un noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, de la forma preferente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar una respuesta terapéutica. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar en el tiempo varias dosis divididas, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. "Forma de unidad de dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como monodosis para los sujetos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir la respuesta terapéutica deseada, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y, más generalmente, de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o estar en el intervalo de 1-10 mg/kg. Los regímenes de tratamiento de ejemplo son administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada de tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferentes incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, utilizando una de las siguientes pautas posológicas: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpos en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y, en algunos métodos, de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención produce, preferentemente, una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos sin síntomas de enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debida a la enfermedad padecida. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos con tumores, una "cantidad terapéuticamente eficaz" inhibe, preferentemente, el crecimiento del tumor en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente en un 40 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente en un 60 % y, aún más preferentemente, al menos aproximadamente en un 80 % con respecto a los sujetos no tratados. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o, de otro modo, mejorar los síntomas en un sujeto, que normalmente es un ser humano pero puede ser otro mamífero.

La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación controlada o sostenida, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Biodegradable, pueden usarse polímeros biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

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

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la barrera hematoencefálica, se pueden formular en liposomas, que adicionalmente pueden comprender restos de direccionamiento para mejorar el transporte selectivo a células u órganos específicos. Véase, por ejemplo, los

documentos US 4.522.811; 5.374.548; 5.416.016; y 5.399.331; V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685; Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038; Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180; Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134; Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090; Keinanen y Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; y Killion y Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

## USOS

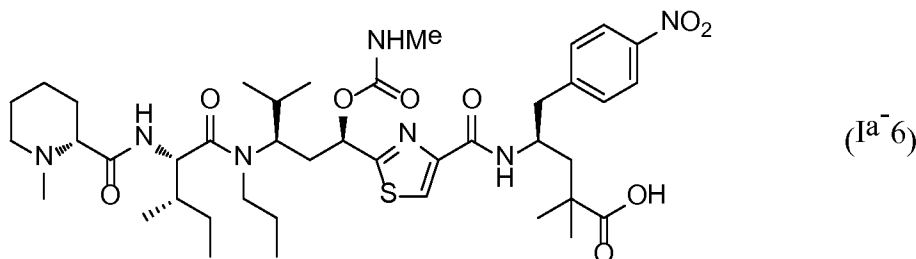
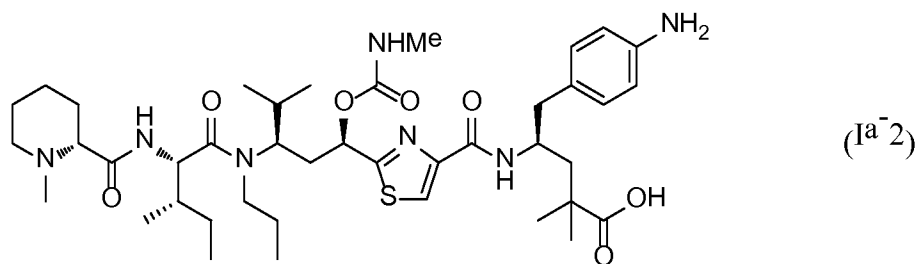
Los compuestos de la presente invención o sus conjugados pueden usarse para tratar enfermedades tales como, pero sin limitación, enfermedades hiperproliferativas, incluyendo: cánceres de cabeza y cuello, que incluyen tumores de la cabeza, cuello, cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glándulas salivales, y paragangliomas; cánceres del hígado y el árbol y biliar, particularmente carcinoma hepatocelular; cánceres intestinales, particularmente cáncer colorrectal; cáncer de ovarios; cáncer de pulmón microcítico y no microcítico (SCLC y NSCLC); sarcomas de cáncer de mama, tales como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, rabdomiosarcoma embrionario, leiomiomasarcoma, neurofibrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial, liposarcoma, sarcoma alveolar de partes blandas; leucemias, tales como leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mielógena crónica (LMC); neoplasias malignas del sistema nervioso central, particularmente cáncer de cerebro; mieloma múltiple (MM), linfomas tales como linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmocitoide, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes de linaje B, linfoma de Burkitt y linfoma anaplásico de células grandes de linfocitos T. Clínicamente, la práctica de los métodos y el uso de las composiciones descritas en el presente documento darán como resultado una reducción en el tamaño o número del crecimiento canceroso y/o una reducción de los síntomas asociados (cuando corresponda). Patológicamente, la práctica del método y el uso de las composiciones descritas en el presente documento producirán una respuesta patológicamente relevante, tales como: inhibición de la proliferación de células cancerosas, reducción en el tamaño del cáncer o tumor, prevención de nuevas metástasis e inhibición de la angiogénesis tumoral. El método para tratar tales enfermedades comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de la invención. El método puede repetirse según sea necesario. Especialmente, el cáncer puede ser cáncer renal, de pulmón, gástrico u ovárico.

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, incluidos los anticuerpos, agentes alquilantes, inhibidores de la angiogénesis, antimetabolitos, escisores del ADN, reticuladores del ADN, intercaladores de ADN, aglutinantes de la ranura menor del ADN, enediinas, inhibidores de la proteína 90 de choque térmico, inhibidores de la histona deacetilasa, inmunomoduladores, estabilizantes de los microtúbulos, análogos de nucleósidos (purina o pirimidina), inhibidores de la exportación nuclear, inhibidores de proteasomas, inhibidores de la topoisomerasa (I o II), inhibidores de tirosina cinasa e inhibidores de serina/treonina cinasa. Los agentes terapéuticos específicos incluyen adalimumab, ansamitocina P3, auristatina, bendamustina, bevacizumab, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, busulfán, calistatina A, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cetuximab, cisplatino, cladribina, citarabina, criptoficinas, dacarbazina, dasatinib, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, duocannicina, dinemicina A, epotilonas, etopósido, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, ipilimumab, hidroxiurea, imatinib, infliximab, interferones, interleucinas,  $\beta$ -lapacona, lenalidomida, irinotecán, maitansina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitomicina C, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, procarbazona, ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), 6-tioguanidina, tiotepa, tenipósido, topotecán, trastuzumab, tricostatina A, vinblastina, vincristina y vindesina.

## Ejemplos

La práctica de esta invención puede entenderse adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos.

## Ejemplo 1 - Compuestos (Ia-2) y (Ia-6)



5 La síntesis de los compuestos (Ia-2) y (Ia-6) se muestra en los esquemas de la Fig. 1.

A una solución de ácido (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(4-nitrofenil)propanoico **1** (2,0 g, 6,45 mmol; Cong et al. 2014) en diclorometano (DCM) (20 ml) a 0 °C se le añadió 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 1,18 g, 9,67 mmol) y después 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona **2** (ácido de Meldrum, 1,02 g, 7,09 mmol). Se añadió clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida sólida (EDC, 1,36 g, 7,09 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 8 h. La mezcla de reacción de color pardo se lavó con una solución acuosa al 5 % de KHSO<sub>4</sub> (**4x**) y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se filtró para dar (1-(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-ilideno)-1-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de (S)-*tert*-butilo **3** en bruto en forma de una solución de DCM de color amarillo que se usó directamente en la siguiente etapa. EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 437,4 (M + H)<sup>+</sup>.

15 A una solución del compuesto **3** anterior en DCM (50 ml) a 0 °C, se le añadió ácido acético (4,06 ml, 71,0 mmol) seguido de NaBH<sub>4</sub> (0,610 g, 16,1 mmol) en porciones de 0,2 gramos durante 15 min. Después de agitar a 0 °C durante 2 h, se añadió NaBH<sub>4</sub> adicional (0,2 g). Después de agitar a 0 °C durante un adicional de 30 min, la reacción se completó. La reacción se detuvo con salmuera y se extrajo con DCM (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc del 0 % al 40 %/DCM) para proporcionar (1-(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-il)-3-(4-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de (R)-*tert*-butilo **4** (2,54 g, 93 %) en forma de un aceite de color castaño transparente. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,20 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,42 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 4,31 (m, 1H), 3,86 (s, 1H), 3,64 (s, 1H), 2,93 - 3,03 (m, 2H), 2,16 - 2,38 (m, 2H), 1,80 (s, 3H), 1,78 (s, 3H), 1,37 (s, 9H). EM (IEN<sup>-</sup>) m/z 423,4 (M + H)<sup>+</sup>.

20 Una solución del compuesto **4** (2,54 g, 6,01 mmol) en tolueno (50 ml) se agitó a 90 °C durante 6 h. Después de enfriar a temperatura ambiente (TA), la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc del 0 % al 60 %/DCM) para proporcionar 2-(4-nitrobenzil)-5-oxopirrolidin-1-carboxilato de (R)-*tert*-butilo **5** (0,80 g, 42 %) en forma de un sólido de color castaño. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8,22 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,39 - 4,48 (m, 1H), 3,31 (dd, J = 13,2, 3,6 Hz, 1H), 2,87 (dd, J = 13,2, 9,2 Hz, 1H), 2,39 - 2,48 (m, 1H), 1,98 - 2,12 (m, 1H), 1,73 - 1,84 (m, 2H), 1,60 (s, 9 H). EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 343,2 (M + Na)<sup>+</sup>.

35 A una solución del compuesto **5** (150 mg, 0,468 mmol) en tetrahidrofurano (THF, 3 ml) a -78 °C se le añadió LiHMDS (1,17 ml, 1,17 mmol, 1 M en tolueno). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 30 min. Se añadió gota a gota yodometano (266 mg, 1,87 mmol) en 1 ml de THF. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 2 h, gradualmente se calentó hasta 0 °C y después se agitó a 0 °C durante 1 h. La reacción se detuvo añadiendo una solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl y se extrajo con DCM (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó en una columna HPLC preparativa de fase inversa C18 Phenomenex Luna S5 ODS 30 x 100 mm eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 10-90 % que contenía ácido trifluoroacético al 0,05 % (TFA) durante un gradiente de 12 minutos para proporcionar 3,3-dimetil-5-(4-nitrobenzil)-2-oxopirrolidin-1-carboxilato de (S)-*tert*-butilo **6** (61 mg, 37 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,18 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,19 - 4,28 (m, 1H), 3,59 (dd, J = 13,0; 3,5 Hz, 1H), 2,75 (dd, J = 13,0, 9,9 Hz, 1H), 1,83 (dd, J = 13,0; 8,3 Hz, 1H), 1,61 (m, 1H), 1,59 (s, 9H), 1,23 (s, 3H), 1,15 (s, 3H). EM (IEN<sup>-</sup>) m/z 719,1 (2M + Na)<sup>+</sup>.

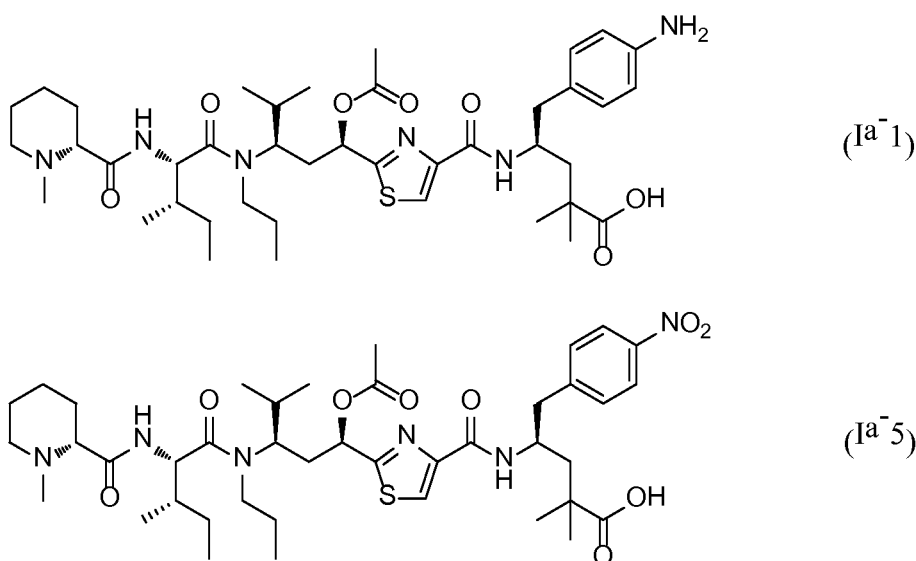
A una solución del compuesto **6** (110 mg, 0,316 mmol) en THF (1,0 ml) y MeOH (1,0 ml) a TA se le añadió gota a gota una solución acuosa 3 N de NaOH (0,21 ml, 0,63 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 h. Después de enfriar a 0 °C, el pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 3 con una solución acuosa 1 N de HCl y se extrajo con DCM (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron *al vacío* para dar ácido (S)-4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2,2-dimetil-5-(4-nitrofenil)pentanoico **7** en bruto. EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 755,0 (2M + Na)<sup>+</sup>.

El producto en bruto anterior se disolvió en 1,5 ml de DCM. Se añadió TFA (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y después se concentró al vacío. El residuo se purificó en una columna HPLC preparativa C18 Phenomenex Luna S5 ODS 30 x 100 mm eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 10-90 % que contenía TFA al 0,05 % durante un gradiente de 12 minutos para dar ácido (S)-4-amino-2,2-dimetil-5-(4-nitrofenil)pentanoico **8** (48 mg, 40 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 8,25 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 3,58 - 3,66 (m, 1H), 3,03 - 3,11 (m, 2H), 1,97 (dd, J = 15,4; 6,6 Hz, 1H), 1,75 (dd, J = 15,4, 3,7 Hz, 1H), 1,23 (s, 3H), 1,10 (s, 3H). EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 296,3 (M + Na)<sup>+</sup>.

A una solución de ácido 2-((5R,7R,10S)-10-((S)-*sec*-butil)-7-isopropil-12-((7?)-1-metilpiperidin-2-il)-3,9,12-trioxo-8-propil-4-oxa-2,8,11-triazadodecan-5-il)tiazol-4-carboxílico **9** (Cong et al. 2014, 20 mg, 0,034 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadió hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (HATU, 15,7 mg, 0,041 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA, 0,018 ml, 0,103 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. Se añadieron una solución de ácido pentanoico **8** (9,15 mg, 0,034 mmol) y 1 equiv. de DIEA (4,4 mg, 0,034 mmol) en DMF (0,5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. La mezcla de reacción se purificó en una columna HPLC de fase inversa C18 Phenomenex Luna S5 ODS 30 x 100 mm eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 10-90 % que contenía TFA al 0,05 % durante un gradiente de 12 minutos para dar ácido (S)-5-(4-nitrofenil)-4-(2-((5R,7R,10S)-10-((S)-*sec*-butil)-7-isopropil-12-((R)-1-metilpiperidin-2-il)-3,9,12-trioxo-8-propil-4-oxa-2,8,11-triazadodecan-5-il)tiazol-4-carboxamido)-2,2-dimetilpentanoico (**la-6**) (16 mg, 56 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 830,2 (M + H)<sup>+</sup>.

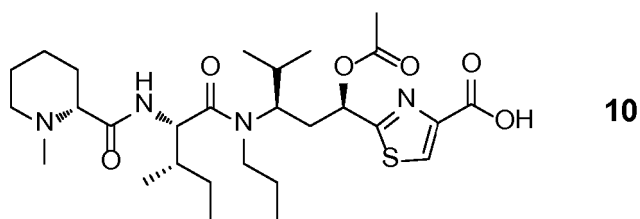
A una solución del compuesto (**la-6**) (15 mg, 0,018 mmol) en MeOH (4 ml) se le añadió paladio sobre carbono, 50 % húmedo (7,69 mg, 3,61 μmol). La suspensión resultante se agitó en un globo de hidrógeno a TA durante 4 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una pipeta que contenía un lecho de algodón y CELITE™ y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó en una columna preparativa HPLC de fase inversa C18 Phenomenex Luna S5 ODS 21 x 100 mm eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 10-90 % que contenía TFA al 0,05 % sobre un gradiente de 12 minutos para dar ácido (S)-5-(4-aminofenil)-4-(2-((5R,7R,10S)-10-((S)-*sec*-butil)-7-isopropil-12-((R)-1-metilpiperidin-2-il)-3,9,12-trioxo-8-propil-4-oxa-2,8,11-triazadodecan-5-il)tiazol-4-carboxamido)-2,2-dimetilpentanoico (**la-2**) (6 mg, 37 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 8,03 (s, 1H), 7,35 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,16 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 5,62 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 4,64 - 4,74 (m, 1H), 4,44 (s a, 1H), 3,78 (m, 1H), 3,41 - 3,53 (m, 2H), 3,01 - 3,12 (m, 2H), 2,83 - 2,96 (m, 1H), 2,75 (s, 3H), 2,72 (s, 3H), 2,22 (m, 5H), 1,95 (m, 3H), 1,68 - 1,85 (m, 3H), 1,23 (s, 3H), 1,20 (d, J = 7,04 Hz, 6H), 1,16 (s, 3H), 0,98-1,08 (m, 16H). EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 800,1 (M + H)<sup>+</sup>.

#### 40 Ejemplo 2 - Compuestos (**la-1**) y (**la-5**)



En general, siguiendo el procedimiento de la Fig. 1 y el Ejemplo 1, se usó el ácido **10** (Cheng et al. 2013) para preparar el compuesto (**la-5**), que después, se convirtió al compuesto (**la-1**) (10 mg, 44 % en dos etapas).

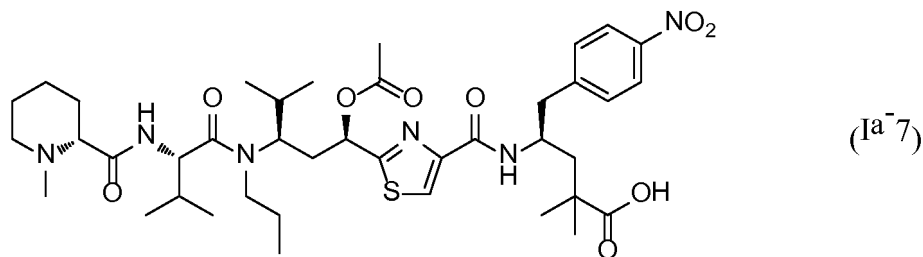
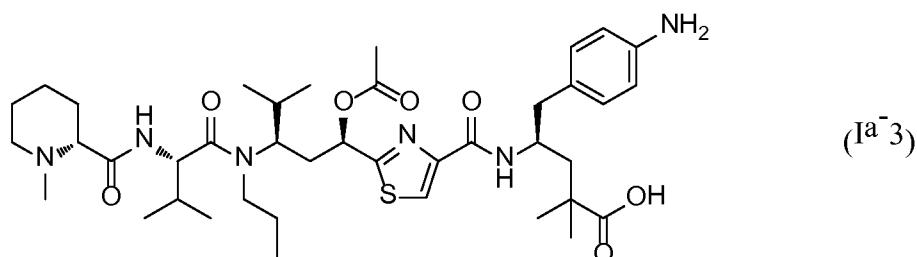




Las propiedades analíticas del compuesto (**1a-1**) fueron: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,04 (s, 1H), 7,38 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H), 7,18 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H), 5,70 (d, *J*= 10,6 Hz, 1H), 4,55 (d, *J*= 8,2 Hz, 1H), 4,45-4,43 (m, 1H), 3,79 (d, *J*= 9,5 Hz, 1H), 3,57-3,53 (m, 1H), 3,47-3,45 (m, 1H), 3,26 - 3,14 (m, 1H), 3,06 (m, 1H), 2,93 - 2,81 (m, 3H), 2,74 (s, 3H), 2,39 - 2,33 (m, 1H), 2,22 - 2,25 (m, 4H), 2,18 (s, 3H), 1,93 - 1,91 (m, 3H), 1,82 - 1,69 (m, 4H), 1,67 - 1,58 (m, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,14 (s, 3H), 1,05 - 0,86 (m, 17H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 785,5 (M + H)<sup>+</sup>.

Las propiedades analíticas del compuesto (**1a-5**) fueron: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,17 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H), 8,04 (s, 1H), 7,48 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H), 5,75 (d, *J*= 12,1 Hz, 1H), 4,64 (t, *J*= 8,9 Hz, 1H), 4,58 - 4,47 (m, 1H), 3,75 (dd, *J*= 12,2; 2,8 Hz, 1H), 3,59 (m, 1H), 3,44 (d, *J*= 12,2 Hz, 1H), 3,20 - 3,09 (m, 1H), 3,07 - 2,96 (m, 3H), 2,74 (s, 3H), 2,41 - 2,31 (m, 1H), 2,22 - 2,24 (m, 3H), 2,19 (s, 3H), 1,93 (m, 4H), 1,79 (m, 3H), 1,66 - 1,50 (m, 2H), 1,21 (s, 3H), 1,15 (s, 3H), 1,05 (d, *J*= 6,6 Hz, 3H), 1,00 - 0,86 (m, 17H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 815,4 (M + H)<sup>+</sup>.

### 15 Ejemplo 3 - Compuestos (**1a-3**) y (**1a-7**)



20 La Fig. 2 muestra un esquema para la síntesis de ácido **19**, que es un precursor para la síntesis de los compuestos (**1a-7**) y (**1a-3**).

Se añadió diciclohexilcarbodiimida (DCC, 0,824 g, 3,99 mmol) a una mezcla de 2-((1R,3R)-1-hidroxi-4-metil-3-(propilamino)pentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **11** (Cheng et al. 2013, 1 g, 3,33 mmol), valina **12** protegida con Boc (0,796 g, 3,66 mmol) e hidrato de *t*-butanol (0,612 g, 3,99 mmol) en DCM (15 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y se agitó a TA durante una noche. El sólido se retiró por filtración y el filtrado se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-8 % en DCM que contenía NH<sub>4</sub>OH al 1 % para proporcionar 1,3 g de 2-((6S,9R,11R)-6,11-diisopropil-2,2-dimetil-4,7-dioxo-3,8-dioxa-5,12-diazapentadecan-9-il)tiazol-4-carboxilato de metilo **13** en forma de un aceite incoloro. EM: (+) *m/z* 500,3 (M+1).

Una solución del compuesto **13** (0,5 g, 1,001 mmol) en *o*-xileno (3 ml) se calentó a 120 °C durante una noche. El disolvente se evaporó. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOAc al 0-100 % en hexanos para proporcionar 0,29 g de 2-((1R,3R)-3-((S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-metil-N-propilbutanamido)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **14** en forma de un sólido de color amarillo claro. EM: (+) *m/z* 500,3 (M+1).

Se añadió TFA (7,7 ml, 1,571 mmol) a una mezcla del compuesto **14** (0,785 g, 1,571 mmol) en DCM (15 ml).

Después de que la mezcla de reacción se agitara a TA durante 30 min, se concentró por evaporación del disolvente, se diluyó con EtOAc y se lavó una vez con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado. La solución acuosa se extrajo de nuevo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron para proporcionar 0,63 g de 2-((1R,3R)-3-((S)-2-amino-3-metil-N-propilbutanamido)-1-hidroxi-4-metilpentil)-tiazol-4-carboxilato de metilo 15 en forma de un sólido de color amarillo claro. EM: (+) m/z 400,3 (M+1).

Se añadió DCC (0,258 g, 1,251 mmol) a una mezcla del compuesto 15 (0,25 g, 0,626 mmol), ácido (R)-1-metilpiperidin-2-carboxílico 16 (0,11 g, 0,751 mmol, Oakwood Products) e hidrato de t-butanol (0,192 g, 1,251 mmol) en DCM (10 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a TA y se agitó a TA durante una noche. El sólido se retiró por filtración y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc y se lavó una vez con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado. La solución acuosa se extrajo de nuevo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-20 % en DCM para proporcionar 0,12 g de 2-((1R,3R)-1-hidroxi-4-metil-3-((S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carboxamido)-N-propilbutanamido)pentil)tiazol-4-carboxilato de metilo 17 en forma de un sólido de color amarillo claro. EM: (+) m/z 525,3 (M+1).

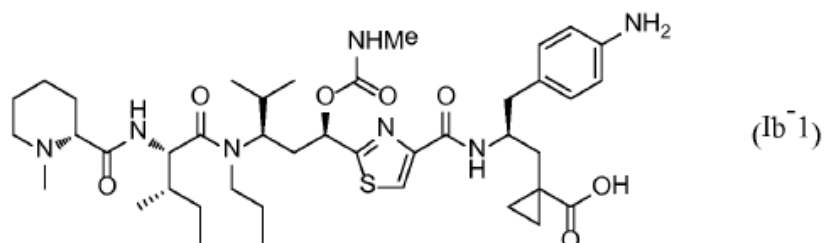
Se añadió LiOH (10,95 mg, 0,457 mmol) en agua (0,5 ml) a una solución del compuesto 17 (0,12 g, 0,229 mmol) en THF (1 ml) a TA. Después de la mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. El disolvente se retiró por evaporación. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-30 % en DCM para proporcionar 95 mg de ácido 2-((1R,3R)-1-hidroxi-4-metil-3-((S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carboxamido)-N-propilbutanamido)pentil)tiazol-4-carboxílico 18 en forma de un sólido de color blanco. EM: (+) m/z 511,3 (M+1).

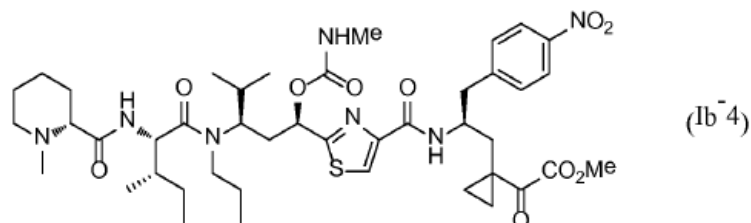
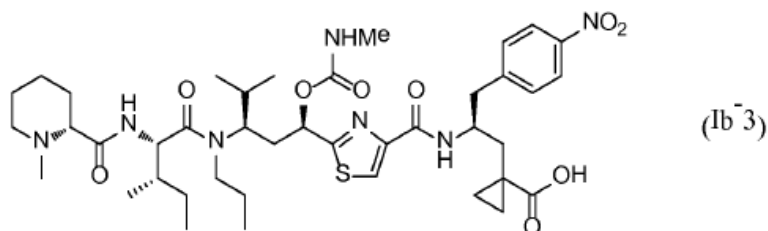
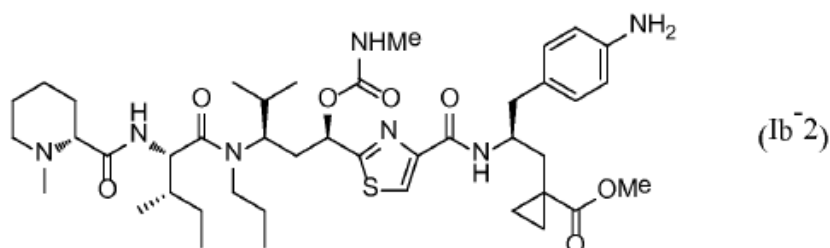
Una solución del compuesto 18 (95 mg, 0,186 mmol) en piridina (1,8 ml) se enfrió en un baño de agua enfriada con hielo y se añadió anhídrido acético (0,088 ml, 0,930 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y se agitó a TA durante una noche. Se añadió una solución 1:1 (v/v) de agua desgasificada y THF (8 ml) después de que la mezcla de reacción se enfriara en un baño de agua enfriada con hielo. Después, la mezcla de reacción se agitó a TA durante 8 h. El disolvente se evaporó. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-30 % en DCM para proporcionar 90 mg de ácido 2-((1R,3R)-1-acetoxi-4-metil-3-((S)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carboxamido)-N-propilbutanamido)pentil)tiazol-4-carboxílico 19 en forma de un sólido de color blanco. EM: (+) m/z 553,3 (M+1).

En general, siguiendo el procedimiento de la Fig. 1 y el Ejemplo 1, se usó el ácido 19 para preparar el compuesto (Ia-7), que después se convirtió al compuesto (Ia-3) (11 mg, 48 % en dos etapas). Las propiedades analíticas del compuesto (Ia-3) fueron: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ = 8,03 (s, 1H), 7,92 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,11 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,75 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 4,59 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 4,45 - 4,43 (m, 1H), 3,79 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 3,57 - 3,53 (m, 1H), 3,47 - 3,45 (m, 1H), 3,26 - 3,14 (m, 1H), 3,06 (m, 1H), 2,93 - 2,81 (m, 3H), 2,74 (s, 3H), 2,39 - 2,33 (m, 1H), 2,22 - 2,25 (m, 4H), 2,18 (s, 3H), 1,93 - 1,91 (m, 3H), 1,82 - 1,69 (m, 4H), 1,67 - 1,58 (m, 1H), 1,20 (s, 3H), 1,16 (s, 3H), 1,08 - 0,96 (m, 14H), 0,91 (d, J = 6,6 Hz, 3H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 771,3 (M + H)<sup>+</sup>.

Las propiedades analíticas del compuesto (Ia-7) fueron: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ = 8,13 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 8,04 (s, 1H), 7,48 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 5,75 (d, J = 11,8 Hz, 1H), 4,64 - 4,7 (m, 2H), 3,77 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 3,60 - 3,39 (m, 2H), 3,23 - 3,12 (m, 2H), 3,07 - 2,96 (m, 3H), 2,74 (s, 3H), 2,36 (t, J = 11,8 Hz, 1H), 2,22 - 2,24 (m, 3H), 2,18 (s, 3H), 1,93 (m, 3H), 1,79 (m, 3H), 1,83 - 1,74 (m, 2H), 1,23 (s, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,11 - 0,87 (m, 17H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 801,4 (M + H)<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 4 - Compuestos (Ib-1) a (Ib-4)





5 La síntesis de los compuestos **(Ib-1)** a **(Ib-4)** se muestra en el esquema de la **Fig. 3**.

- A una solución de 2-(4-nitrobenzil)-5-oxopirrolidin-1-carboxilato de (*R*)-*terc*-butilo **5** (740 mg, 2,31 mmol) en THF (15 ml) a -78 °C se le añadió gota a gota LiHMDS (2,31 ml, 2,31 mmol, IN tolueno). La solución de color pardo se agitó a -78 °C durante 30 min. Se añadió gota a gota una solución de 3-yodoprop-1-eno **20** (388 mg, 2,31 mmol) en 2 ml de THF. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 7 h. La reacción se detuvo añadiendo una solución ac. saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Después de calentarse hasta TA, la mezcla se extrajo con EtOAc (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron *al vacío* para dar un aceite pegajoso que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc de 0 % al 50 %/hexanos) para proporcionar 3-alil-5-(4-nitrobenzil)-2-oxopirrolidin-1-carboxilato de (3*S*,5*R*)-*terc*-butilo **21** (0,60 g, 72 %) en forma de un sólido de color castaño. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,22 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,41 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 5,74 (ddt, *J* = 17,2, 9,9, 7,0, 7,0 Hz, 1H), 5,03 - 5,12 (m, 2H), 4,36 (td, *J* = 8,6, 3,5 Hz, 1H), 3,29 (dd, *J* = 13,2, 3,5 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J* = 13,2; 9,5 Hz, 1H), 2,49 - 2,68 (m, 2H), 2,10 - 2,21 (m, 1H), 1,92 (dd, *J* = 13,2, 8,6 Hz, 1H), 1,74 (td, *J* = 12,4, 8,6 Hz, 1H), 1,60 (s, 9H). EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 743,5 (2M + Na)<sup>+</sup>.
- 20 Una solución del compuesto **21** (330 mg, 0,92 mmol) en DCM (6 ml) a -78 °C se burbujeó con una corriente de O<sub>3</sub> hasta que apareció un color azul (~3 min). La mezcla de reacción se lavó abundantemente con O<sub>2</sub> durante 5 min y después N<sub>2</sub> durante 5 min. Se añadió DMSO (0,34 ml, 4,58 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a TA y se agitó a TA durante una noche. La mezcla de reacción se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró *al vacío* para dar un aceite pegajoso que se purificó por gel de sílice cromatografía ultrarrápida (gradiente de EtOAc de 0 % al 70 %/DCM) para proporcionar 5-(4-nitrobenzil)-2-oxo-3-(2-oxoetil)pirrolidin-1-carboxilato de (3*R*,5*R*)-*terc*-butilo **22** (0,26 g, 78 %) en forma de un aceite incoloro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,76 (s, 1H), 8,16 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,40 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 4,35 (td, *J* = 8,8, 3,6 Hz, 1H), 3,25 (dd, *J* = 13,2; 3,6 Hz, 1H), 3,05 (dd, *J* = 18,8; 4,2 Hz, 1H), 2,85 - 2,97 (m, 2H), 2,52 (dd, *J* = 18,8; 8,2 Hz, 1H), 2,07 - 2,15 (m, 1H), 1,66 (td, *J* = 12,5, 8,5 Hz, 1H), 1,54 (s, 9H). EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 747,5 (2M + Na)<sup>+</sup>.
- 30 A una solución del compuesto **22** (259 mg, 0,72 mmol) en MeOH (5 ml) a 0 °C se le añadió NaBH<sub>4</sub> (27,0 mg, 0,715 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 20 h. La reacción se detuvo añadiendo ácido cítrico acuoso al 10 % y se extrajo con EtOAc (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron *al vacío*. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc de 0 % al 80 %/DCM) para proporcionar 3-(2-hidroxi-etil)-5-(4-nitrobenzil)-2-oxopirrolidin-1-carboxilato de (3*R*,5*R*)-*terc*-butilo **23** (0,16 g, 60 %) en forma de un aceite incoloro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,15 (d, *J* =

8,6 Hz, 2H), 7,39 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 4,33 (td,  $J = 8,8, 3,6$  Hz, 1H), 3,71 - 3,80 (m, 1H), 3,58 - 3,68 (m, 1H), 3,25 (dd,  $J = 13,2; 3,6$  Hz, 1H), 2,90 (s, 1H), 2,83 (dd,  $J = 13,2; 9,4$  Hz, 1H), 2,64 - 2,74 (m, 1H), 1,95 - 2,06 (m, 2H), 1,68 - 1,79 (m, 1H), 1,59 (m, 1H), 1,54 (s, 9H). EM (IEN<sup>+</sup>)  $m/z$  751,5 (2M + Na)<sup>+</sup>.

5 A una solución del compuesto **23** (156 mg, 0,43 mmol) en THF (4 ml) a TA se le añadieron cloruro de mesilo (0,043 ml, 0,58 mmol) y DIEA (0,097 ml, 0,56 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc de 0 % al 60 %/DCM) para proporcionar 3-(2-((metilsulfonil)oxi)-etil)-5-(4-nitrobenzil)-2-oxopirrolidin-1-carboxilato de (3R,5R)-*terc*-butilo **24** (0,17 g, 91 %) en forma de un aceite incoloro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,20 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 7,42 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 4,29 - 4,45 (m, 2H), 3,26 (dd,  $J = 13,0; 3,4$  Hz, 1H), 3,02 (s, 3H), 2,88 (dd,  $J = 13,2; 9,4$  Hz, 1H), 2,59 - 2,69 (m, 1H), 2,30 (ddt,  $J = 14,7, 7,0, 5,4, 5,4$  Hz, 1H), 2,13 (dd,  $J = 13,0; 8,3$  Hz, 1H), 1,67 - 1,81 (m, 3H), 1,58 (s, 9H). EM (IEN<sup>+</sup>)  $m/z$  907,5 (2M + Na)<sup>+</sup>.

15 A una solución del compuesto **24** (80 mg, 0,18 mmol) en DMF (1,0 ml) a 0 °C se le añadió NaH (14,5 mg, 0,36 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 h y a TA durante 2 h. A la mezcla de reacción se le añadieron THF, MeOH (0,5 ml cada uno) y 3 equiv. de una solución acuosa 1 N de NaOH. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h. Después de enfriar a 0 °C, el pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 3-4 con HCl ac 1 N y después se extrajo con DCM (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó en una columna HPLC preparativa de fase inversa C18 Phenomenex Luna S5 ODS 30 x 100 mm eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 10-90 % que contenía TFA al 0,05 % sobre un gradiente de 12 minutos). Se aislaron los dos compuestos siguientes:

- Ácido (S)-1-(2-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(4-nitrofenil)propil)ciclopropanocarboxílico **25** (20 mg, 30 %). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,15 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 7,37 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 4,11 (m, 1H), 2,79 - 3,03 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,30 (m, 2H), 0,86 (m, 2H), 0,76 (m, 2H). EM (IEN<sup>+</sup>)  $m/z$  751,6 (2M + Na)<sup>+</sup>.
- 1-(2-((*terc*-Butoxicarbonil)amino)-3-(4-nitrofenil)propil)ciclopropanocarboxilato de (S)-metilo **26** (20 mg, 29 %). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,15 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,36 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 4,05 (m, 1H), 2,80 - 3,02 (m, 2H), 1,82 - 1,93 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 0,74 - 0,82 (m, 2H), 0,62 - 0,71 (m, 2H). EM (IEN<sup>+</sup>)  $m/z$  379,1 (M + H)<sup>+</sup>.

30 A una solución de ácido ciclopropanocarboxílico **25** (20 mg, 0,055 mmol) en DCM (0,75 ml) se le añadió TFA (0,25 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y se concentró al vacío. El producto ácido (S)-1-(2-amino-3-(4-nitrofenil)propil)ciclopropano-carboxílico **27** se obtuvo como su sal de TFA y se usó directamente en la siguiente reacción sin purificación (21 mg, 100 %). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8,24 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 7,54 (d,  $J = 8,80$  Hz, 2H), 3,85 - 3,95 (m, 1H), 3,08 (dd,  $J = 7,2; 2,2$  Hz, 2H), 1,98 - 2,08 (m, 1H), 1,64 (dd,  $J = 15,4; 4,2$  Hz, 1H), 1,34 - 1,43 (m, 1H), 1,23 - 1,30 (m, 1H), 0,79 - 0,87 (m, 1H), 0,66 (m, 1H). EM (IEN<sup>+</sup>)  $m/z$  265,2 (M + H)<sup>+</sup>.

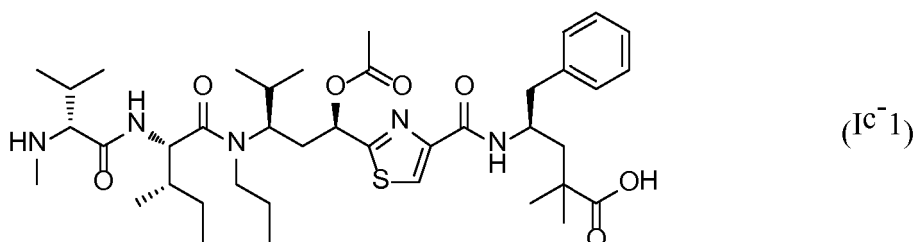
40 Se acopló el ácido **27** con el compuesto **9** para producir ácido 1-((S)-2-(2-((5R,7R,10S)-10-((S)-*sec*-butil)-7-isopropil-12-((R)-1-metilpiperidin-2-il)-3,9,12-trioxo-8-propil-4-oxa-2,8,11-triazadodecan-5-il)tiazol-4-carboxamido)-3-(4-nitrofenil)propil)ciclopropano-carboxílico (**Ib-3**), de forma general siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento. Después, el compuesto (**Ib-3**) se convirtió en ácido 1-((S)-3-(4-aminofenil)-2-(2-((5R,7R,10S)-10-((S)-*sec*-butil)-7-isopropil-12-((R)-1-metilpiperidin-2-il)-3,9,12-trioxo-8-propil-4-oxa-2,8,11-triazadodecan-5-il)tiazol-4-carboxamido)propil)ciclopropanocarboxílico (**Ib-1**) por hidrogenación como se ha descrito anteriormente (5 mg, 47 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8,03 (s, 1H), 7,32 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,11 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 4,60 - 4,73 (m, 2H), 3,75 (d,  $J = 10,1$  Hz, 1H), 3,43 (m, 2H), 2,83 - 2,97 (m, 6H), 2,74 (s, 3H), 2,70 (s, 3H), 2,12 - 2,30 (m, 3H), 1,93 (m, 3H), 1,78 (m, 2H), 1,58 (m, 4H), 1,10 - 1,27 (m, 3H), 0,91 - 1,06 (m, 18H), 0,83 - 0,90 (m, 2H), 0,75 (m, 2H). EM (IEN<sup>+</sup>)  $m/z$  798,7 (M + H)<sup>+</sup>.

50 A una solución de éster metílico **26** (20 mg, 0,053 mmol) en DCM (0,75 ml) se le añadió TFA (0,25 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y después se concentró al vacío. El producto 1-(2-amino-3-(4-nitrofenil)propil)ciclopropanocarboxilato de (S)-metilo **28** se obtuvo como su sal de TFA y se usó en la siguiente reacción sin purificación (21 mg, 100 %). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8,25 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 7,54 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 3,87 - 3,98 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,08 (dd,  $J = 7,2; 5,0$  Hz, 2H), 1,96 (dd,  $J = 15,2; 8,6$  Hz, 1H), 1,75 (dd,  $J = 15,2; 4,6$  Hz, 1H), 1,34 - 1,42 (m, 1H), 1,22 - 1,30 (m, 1H), 0,86 (ddd,  $J = 9,4, 6,8, 4,1$  Hz, 1H), 0,73 (ddd,  $J = 9,4, 6,8, 4,1$  Hz, 1H). EM (IEN<sup>+</sup>)  $m/z$  279,2 (M + H)<sup>+</sup>.

60 Se acopló el éster metílico **28** con el compuesto **9** para producir 1-((S)-2-(2-((5R,7R,10S)-10-((S)-*sec*-butil)-7-isopropil-12-((R)-1-metilpiperidin-2-il)-3,9,12-trioxo-8-propil-4-oxa-2,8,11-triazadodecan-5-il)tiazol-4-carboxamido)-3-(4-nitrofenil)propil)-ciclopropanocarboxilato de metilo (**Ib-4**), siguiendo los procedimientos en el presente documento anteriormente. Se convirtió éster metílico (**Ib-4**) en 1-((S)-3-(4-aminofenil)-2-(2-((5R,7R,10S)-10-((S)-*sec*-butil)-7-isopropil-12-((R)-1-metilpiperidin-2-il)-3,9,12-trioxo-8-propil-4-oxa-2,8,11-triazadodecan-5-il)tiazol-4-carboxamido)propil)ciclopropanocarboxilato de metilo (**Ib-2**) por hidrogenación según el ejemplo previo (9 mg, 59 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8,06 (s, 1H), 7,41 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 7,24 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 5,68 (d,  $J = 12,4$  Hz, 1H), 4,64 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 3,81 (d,  $J = 10,7$  Hz, 1H), 3,71 (t,  $J = 11,1$  Hz, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,49 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H), 3,05 - 3,20 (m, 3H), 2,91 - 2,96 (m, 3H), 2,80 (s, 3H), 2,71 (s, 3H), 2,21 (m, 1H), 1,90 - 2,07 (m, 5H), 1,75 - 1,87 (m, 4H), 1,56 - 1,69 (m, 3H), 1,14 (m, 3H), 0,96-1,04 (m, 16H), 0,88 (m, 2H), 0,71 - 0,78 (m, 2H).

EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 812,7 (M + H)<sup>+</sup>.

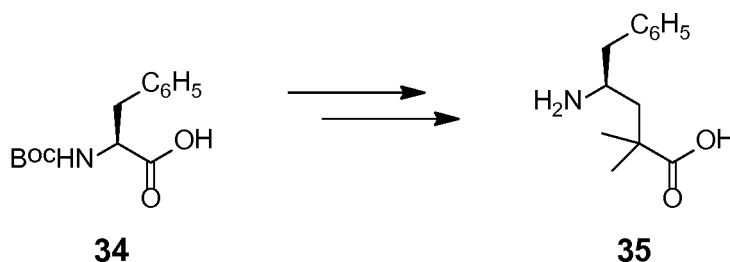
**Ejemplo 5 - Compuesto (Ic-1)**



5

La síntesis del compuesto (Ic-1) se muestra en el esquema de la Fig. 4.

10 En general siguiendo los procedimientos anteriores en el presente documento, la fenilalanina 34 protegida con Boc se convirtió en ácido (S)-4-amino-2,2-dimetil-5-fenilpentanoico 35, que se usó como precursor en este ejemplo, (0,265 g, 70 %) en forma de una sal de TFA sólida. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,62 (s a, 1H), 7,74 (s a, 2H), 7,43 - 7,09 (m, 5H), 3,47 - 3,35 (m, 1H), 2,91 - 2,70 (m, 2H), 1,81 - 1,56 (m, 2H), 1,10 - 0,95 (m, 6H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 222,1 (M+H)<sup>+</sup>.



15

20 Se preparó ácido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-metil-N-propilpentanamido)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxílico 36 de forma general siguiendo el esquema y las condiciones de la Fig. 1 de Cong et al. 2014, *mutatis mutandis*. Se disolvió una muestra del mismo (0,0555 g, 0,111 mmol) en THF (1 ml) con DMAP (0,027 g, 0,222 mmol) y después, la solución resultante se trató con anhídrido acético (0,021 ml, 0,222 mmol) a TA. Después, se añadió piridina (0,193 µl, 0,222 mmol) y la mezcla de reacción resultante se agitó después a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se inactivó con HCl 1 N y la solución se extrajo con DCM (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y el filtrado se concentró *al vacío* para proporcionar ácido 2-((6S,9R,11R)-6-((S)-*sec*-butil)-9-isopropil-2,2-dimetil-4,7,13-trioxo-8-propil-3,12-dioxa-5,8-diaza-tetradecan-11-il)tiazol-4-carboxílico 37 (0,064 g, 100 %) en forma de un sólido. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,42 (s, 1H), 7,00 - 6,78 (m, 1H), 5,62 (d, J= 11,0 Hz, 1H), 4,24 (d, J= 7,3 Hz, 1H), 4,09 - 3,94 (m, 1H), 3,01 - 2,80 (m, 2H), 2,29 - 2,11 (m, 3H), 1,93 (s a, 3H), 1,86 - 1,66 (m, 4H), 1,60 - 1,47 (m, 1H), 1,42 - 1,28 (m, 9H), 1,00 - 0,59 (m, 15H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 542,2 (M+H)<sup>+</sup>.

30 Se disolvieron el ácido 37 (0,063 g, 0,116 mmol) y HATU (0,053 g, 0,140 mmol) en DMF (1 ml) y la solución resultante se trató con DIEA (0,101 ml, 0,582 mmol) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 minutos. Una solución de DMF (1 ml) de ácido (S)-4-amino-2,2-dimetil-5-fenilpentanoico 35, sal de TFA (0,039 g, 0,116 mmol) con DIEA (0,101 ml, 0,582 mmol) se añadió al éster activado y la mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 1 h. Después, la mezcla de reacción se purificó por carga húmeda en un sistema ISCO de fase inversa C-18, eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 50-100 % y TFA al 0,1 % durante un gradiente de 13 minutos. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar ácido (S)-4-(2-((6S,9R,11R)-6-((S)-*sec*-butil)-9-isopropil-2,2-dimetil-4,7,13-trioxo-8-propil-3,12-dioxa-5,8-diazatetradecan-11-il)tiazol-4-carboxamido)-2,2-dimetil-5-fenilpentanoico 38 (0,053 g, 61 %) en forma de un sólido. EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 745,4 (M+H)<sup>+</sup>.

40 Se disolvió el ácido 38 (0,053 g, 0,071 mmol) en DCM (1,25 ml) y después, la solución resultante se trató con TFA (0,4 ml) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h, después se concentró al vacío. El residuo se purificó en una columna de fase inversa Gold ISCO de 50 g C-18, eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 10-100 % y TFA al 0,1 % durante un gradiente de 14 minutos. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar ácido (S)-4-(2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-((2S,3S)-2-amino-3-metil-N-propilpentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxamido)-2,2-dimetil-5-fenilpentanoico 39, sal de TFA (0,032 g, 67 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,17 - 8,09 (m, 1H), 7,32 - 7,06 (m, 5H), 5,72 - 5,40 (m, 1H), 4,27 (d, J= 6,6 Hz, 1H), 4,02 - 3,87 (m, 2H), 3,56 (s a, 1H), 3,20 (d, J= 11,9 Hz, 1H), 3,04 (t, J= 11,3 Hz, 1H), 2,91 - 2,72 (m, 2H), 2,42 - 2,28 (m, 2H), 2,15 - 2,09 (m, 3H), 2,00 (s a, 1H), 1,93 - 1,85 (m, 1H), 1,82 - 1,71 (m, 2H), 1,62 - 1,46 (m, 2H), 1,13 - 0,75

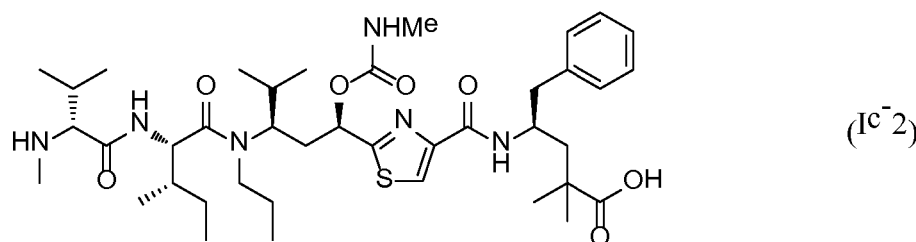
45

(m, 24H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 645,4 (M+H)<sup>+</sup>.

Se disolvieron ácido (R)-2-((*tert*-butoxicarbonil)(metil)amino)-3-metilbutanoico **40** (n.º de reg. CAS 89536-85-6, 2,93 mg, 0,013 mmol) y HATU (4,81 mg, 0,013 mmol) en DMF (0,5 ml) y después, la solución resultante se trató con DIEA (7,34 µl, 0,042 mmol) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 minutos. El ácido **39**, sal de TFA (0,008 g, 10,54 µmol) disuelta en DMF (0,5 ml) junto con DIEA (7,34 µl, 0,042 mmol) se añadieron después al éster activado y la mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por carga húmeda en una columna de fase inversa gold ISCO de 50 g C-18, eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 50-100 % con TFA al 0,1 % durante un gradiente de 13 minutos. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar ácido (S)-4-(2-((6R,9S,12R,14R)-9-((S)-*sec*-butil)-6,12-diisopropil-2,2,5-trimetil-4,7,10,16-tetraoxo-11-propil-3,15-dioxa-5,8,11-triazaheptadecan-14-il)tiazol-4-carboxamido)-2,2-dimetil-5-fenilpentanoico **41** (0,009 g, 95 %) en forma de un sólido. EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 858,4 (M+H)<sup>+</sup>.

Una solución del ácido **41** (0,008 g, 9,32 µmol) en DCM (1 ml) se trató a TA con TFA (0,3 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y se concentró al vacío. El residuo se purificó por HPLC C-18 eluyendo en una columna C18 21x100 mm con CH<sub>3</sub>CN ac. 9,5-95 % con TFA al 0,1 % durante un gradiente de 12 minutos. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar ácido (S)-4-(2-((3R,6S,9R,11R)-6-((S)-*sec*-butil)-3,9-diisopropil-4,7,13-trioxo-8-propil-12-oxa-2,5,8-triazatetradecan-11-il)tiazol-4-carboxamido)-2,2-dimetil-5-fenilpentanoico (**1c-1**) (0,005 g, 62 %) en forma de una sal de TFA. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ = 8,07 (s, 1H), 7,81 (d, J=9,1 Hz, 1H), 7,35 - 7,07 (m, 5H), 5,75 (d, J= 11,2 Hz, 1H), 4,70 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 4,45 (s a, 2H), 3,65 (d, J= 4,6 Hz, 1H), 3,19 - 3,06 (m, 1H), 2,96 - 2,65 (m, 4H), 2,52 (s, 3H), 2,39 - 2,30 (m, 1H), 2,27 - 2,04 (m, 6H), 1,94 - 1,86 (m, 2H), 1,72 - 1,54 (m, 3H), 1,32 - 0,77 (m, 31H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 758,4 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 6- Compuesto (1c-2)



El compuesto (**1c-2**) se preparó de manera análoga al compuesto (**1c-1**) usando, como un material precursor, el compuesto 60, cuya síntesis se muestra esquemáticamente en las Figs. 5a-5b.

A una solución de 2,2-dietoxiacetonitrilo **44** (50 g, 387 mmol) en metanol (2,0 l) se le añadió una solución de sulfuro de amonio (50 % ac.) (52,8 ml, 387 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. La mezcla de reacción se concentró *al vacío* para retirar los volátiles. El residuo pastoso de color pardo se disolvió en acetato de etilo y la solución orgánica se lavó con agua y salmuera. La fracción orgánica se separó y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. El filtrado se concentró *al vacío* para proporcionar un sólido de color amarillo. El sólido se trituró con éter de petróleo, se filtró y el sólido se secó a alto vacío para proporcionar 2,2-dietoxietanoamida **45** (35 g, 55,4 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (400 MHz) δ 1,27 - 1,24 (dos tripletes fusionados, 3H cada uno, J = 7,2 Hz), 3,78 - 3,61 (dos cuartetos fusionados, 2H cada uno, J = 7,2 Hz), 5,04 (s, 1H), 7,61 & 7,86 (pico a, 2H).

Una mezcla de tioamida **45** (50 g, 306 mmol) disuelta en metanol (450 ml) y tamices moleculares de 3 Å de tamaño (120 g) se calentó con agitación a 65 °C. Se añadió gota a gota bromopiruvato de metilo **46** (32,6 ml, 306 mmol) durante 15 min y la mezcla de reacción resultante se agitó a 65 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a TA y el sólido de color pardo que se formó se retiró por filtración y se descargó. El filtrado se concentró *al vacío* para proporcionar un aceite de color negro. El aceite se disolvió en DCM y se filtró a través de una capa de sílice (malla de 60-120) y el filtrado se concentró al vacío. El 2-(dietoximetil)tiazol-4-carboxilato de metilo **47** en bruto (50 g, 66,5 %, aceite), se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

Una solución del éster **47** (50 g, 204 mmol) en acetona (1,5 l) se trató gota a gota con HCl 1,5 N (1,0 l) a 50 °C. Después, la mezcla se calentó a 60 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a TA y la solución se extrajo con acetato de etilo (3x). Las capas orgánicas combinadas se separaron y la fracción orgánica se lavó con NaCl ac. saturado. La fracción orgánica se separó y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. El filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (malla de sílice de 230 - 400) con un gradiente de EtOAc al 15 - 20 % - éter de petróleo. Las fracciones apropiadas se aislaron y se concentraron *al vacío* para proporcionar 2-formiltiazol-4-carboxilato de metilo **48** (12 g., 34,4 %) en forma de un sólido de color amarillo puro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (400 MHz) δ 4,02 (s, 3H), 8,54 (d, 1H, J = 1,2 Hz), 10,07 (d, 1H, J = 1,2 Hz).

Una solución de 3-metilbutan-2-ona **49** (50 g, 580 mmol) y tetraóxido de titanio (265 g, 1160 mmol) en THF anhidro (750 ml) se agitó en una atmósfera de nitrógeno en un matraz de fondo redondo a TA. Se añadió sulfínimida de (S)-t-butilo 50 (70,4 g, 0,58 m) a la mezcla de reacción y la mezcla de reacción resultante se agitó a 70 °C durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a TA y se inactivó con NaCl ac. saturado (500 ml). La solución resultante se agitó durante 10 min y la mezcla se filtró a través de un lecho de CELITE™. El lecho se lavó a fondo con acetato de etilo y el filtrado se extrajo con acetato de etilo (2x). Los extractos orgánicos combinados se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtraron. El filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (malla de sílice de 230 - 400) con un gradiente mezcla de EtOAc al 10 - 20 % - éter de petróleo para proporcionar (R,E)-2-metil-N-(3-metilbutan-2-ilideno)propano-2-sulfinamida **51** (70 g, 63,5 %) en forma de un aceite de color amarillo. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (400 MHz) δ 1,14 - 1,11 (m, 6H), 1,23 (s, 9H), 2,31 (s, 3H), 2,57 - 2,52 (m, 1H).

Una solución de DIEA (15,8 ml, 110 mmol) en éter anhidro (200 ml) se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota n-BuLi (2 M, 55 ml, 110 mmol). La mezcla resultante se calentó a 0 °C, después se continuó agitando durante 45 min a 0 °C. La mezcla se volvió a enfriar a -78 °C y se añadió gota a gota una solución de sulfinamida **51** (10 g, 52 mmol) en éter (100 ml). La mezcla de reacción y se agitó a -78 °C durante 1 h. Se añadió trisopropóxido de clorotitanio (31,7 g, 121 mmol) y la mezcla de reacción resultante se continuó agitando a -78 °C durante 1 h. El compuesto **48** (9 g, 52 mmol) se añadió en una porción y la mezcla de reacción resultante se continuó agitando a -78 °C durante una noche. La mezcla de reacción se inactivó con ácido acético al 20 % en THF y se dejó calentar a TA. Se añadió agua (2,5 ml) y la solución resultante se filtró a través de una capa de CELITE™. El lecho se lavó a fondo con acetato de etilo. El filtrado se extrajo con acetato de etilo (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron lx con NaCl ac. saturado. La fracción orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. El filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (malla de sílice de 230 - 400) con un gradiente mezcla de acetato de etilo al 15 - 20 % - éter de petróleo para proporcionar 2-((R,E)-3-(((R)-*terc*-butilsulfmil)imino)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **52** (9,0 g, 47 %) en forma de un aceite viscoso amarillo pálido. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (400 MHz) δ 1,17 - 1,06 (m, 6H), 1,23 (s, 9H), 2,88 - 2,84 (m, 1H), 3,37 - 3,34 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 5,17 - 5,09 (m, 1H), 6,63 (d, 1H, *J* = 13,2 Hz), 8,16 - 8,13 (d, 1H, *J* = 13,2 Hz); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 361,0 (M+H)<sup>+</sup>.

Una solución del compuesto **52** (30 g, 83 mmol) en THF (300 ml) se enfrió a -78 °C. Después se añadió tetraóxido de titanio (38 g, 166 mmol) a la solución seguido de la adición gota a gota de NaBH<sub>4</sub> (12,6 g, 330 mmol). La mezcla se agitó a -78 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se inactivó con metanol (10 ml) seguido de ácido acético al 20 % en THF (100 ml) y después se dejó calentar a TA. Se añadió agua (50 ml) y la solución resultante se filtró sobre una capa de CELITE™. El lecho se lavó a fondo con acetato de etilo. El filtrado se extrajo con acetato de etilo (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron lx con NaCl ac. saturado y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente al 40-50 % de acetato de etilo en éter de petróleo. Las fracciones apropiadas se aislaron y se concentraron *al vacío* para proporcionar 2-((1R,3R)-3-((S)-1,1-dimetiletilsulfinamido)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **53** (20 g, 64 %) en forma de un sólido. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (400 MHz) δ 0,90 - 0,80 (m, 6H), 1,30 (s, 9H), 1,73 - 1,68 (m, 1H), 1,94 - 1,89 (m, 1H), 2,30 - 2,23 (m, 1H), 3,47 - 3,37 (m, 2H), 3,93 (s, 3H), 5,21 - 5,18 (m, 1H), 5,58 - 5,57 (m, 1H), 8,12 (s, 1H). EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 363,1 (M+H)<sup>+</sup>.

El compuesto **53** (3,15 g, 8,69 mmol) se disolvió en DCM (65 ml) junto con bis(4-nitrofenil)carbonato **53a** (n.º de reg. CAS 5070-13-3, 5,29 g, 17,38 mmol). Después, la solución resultante se trató con trietilamina (3,03 ml, 21,72 mmol) y después la mezcla de reacción resultante se dejó en agitación a TA durante una noche, volviéndose de color amarillo. Después, la mezcla de reacción se trató con metanamina (19,55 ml, 39,1 mmol) (2 M en THE) a TA y la mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 30 min. La suspensión de color naranja se filtró a través de un lecho de CELITE™, que se lavó con DCM. El filtrado se concentró *al vacío* y el residuo se purificó por cromatografía ISCO, eluyendo con MeOH al 0-8,5 %/DCM durante un gradiente de 20 min. Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo y la solución se lavó 4x con NaOH 1 N. La fracción orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró *al vacío* para proporcionar el compuesto **54** limpio (3,1 g, 78 %), en forma de un sólido; EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 420,3 (M+H)<sup>+</sup>.

Se disolvió carboxilato de metilo **54** (3,1 g, 7,39 mmol) en MeOH (36,9 ml) y la solución resultante se trató con HCl 4 N (1,85 ml, 7,39 mmol) en dioxano a TA se agitó durante 1 h. Después, la mezcla de reacción se concentró *al vacío* para proporcionar 2-((1R,3R)-3-amino-4-metil-1-((metilcarbamoil)oxi)pentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **55** en bruto (2,6 g, 95 %) como su sal de clorhidrato sólido. EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 316,3 (M+H)<sup>+</sup>.

A una solución a 0 °C del compuesto **55** (1,85 g, 5,85 mmol) en DCM (29,2 ml) se le añadieron tamices moleculares de 4Å seguido de propionaldehído **56** (0,422 ml, 5,85 mmol). Después de agitar a 0 °C durante 45 min, se añadió triacetoxiborohidruro sódico (1,86 g, 8,77 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se dejó calentar a TA. Después de 20 min cesó el desprendimiento de gas y la solución se extrajo después 3x con DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron *al vacío* para proporcionar 2-((1R,3R)-4-metil-1-((metilcarbamoil)oxi)-3-(propilamino)pentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **57** (2,05 g, 93 %) en forma de un sólido. EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 358,5 (M+H)<sup>+</sup>.

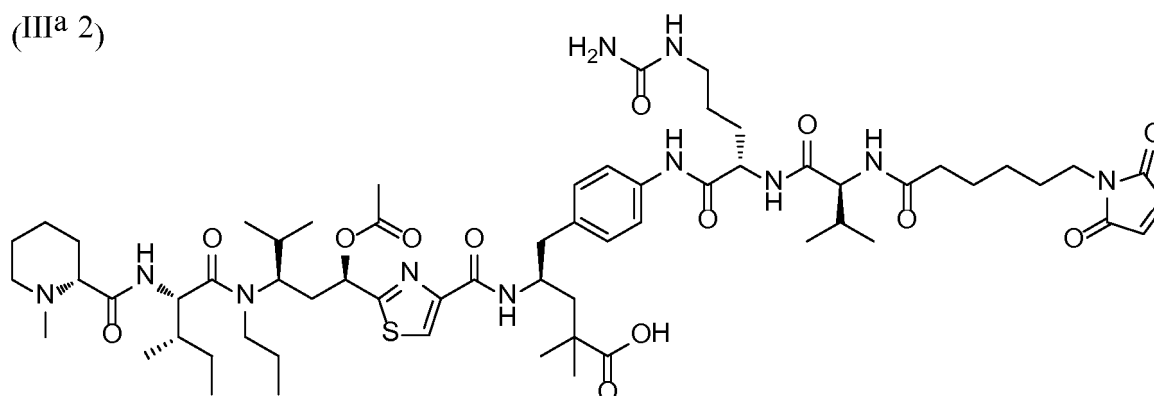
El compuesto **57** (1,00 g, 2,80 mmol) y ácido (2S,3S)-2-azido-3-metilpentanoico **58** (0,440 g, 2,80 mmol; Peltier et al.

2006) se agitaron juntos en DCM (14,0 ml). Se añadió cloruro de bis(2-oxooxazolidin-3-il)fosfínico (0,855 g, 3,36 mmol) a TA seguido de DIEA (1,46 ml, 8,39 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó después a TA durante una noche. La mezcla de reacción se inactivó con una solución acuosa 1 N de HCl y la mezcla se extrajo con DCM (3x). Después, los extractos orgánicos combinados se lavaron 3x con una solución acuosa al 10 % de NaHCO<sub>3</sub>. La fracción orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró al vacío. Se encontró que el producto sólido estaba contaminado con aproximadamente el 25 % de una impureza que se separó en una última etapa, dando 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-propilpentanamido)-4-metil-1-((metilcarbamoil)oxi)pentil)tiazol-4-carboxilato de metilo 59 (1,4 g, 76 %) en forma de un sólido. EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 497,4 (M+H)<sup>+</sup>.

10 Se disolvió éster metílico 59 (1,39 g, 2,80 mmol) en 1/1 de MeOH (7,00 ml)/THF (7,00 ml) y después la solución resultante se trató a TA con una solución acuosa 2 N de hidróxido de litio (2,80 ml, 5,60 mmol). Después, la mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró *al vacío* para retirar cualquier volátil. El residuo se trató con una solución acuosa 1 N de HCl y la mezcla se extrajo con DCM (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron *al vacío* para proporcionar ácido 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-azido-3-metil-N-propilpentanamido)-4-metil-1-((metilcarbamoil)oxi)pentil)tiazol-4-carboxílico 60, que todavía contenía la impureza (1,4 g, 76 %) en forma de un sólido. EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 483,5 (M+H)<sup>+</sup>.

El acoplamiento del ácido pentanoico 35 y ácido butanoico 40 al compuesto 60 introdujo los fragmentos Tup y Mep, respectivamente, conduciendo al compuesto (Ic-2). Los datos analíticos para el compuesto (Ic-2) fueron como siguen a continuación: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, acetonitrilo-d<sub>3</sub>) δ 7,99 - 7,85 (m, 1H), 7,42 - 7,07 (m, 5H), 5,45 (d, J= 10,1 Hz, 1H), 4,86 - 4,65 (m, 1H), 4,43 - 4,15 (m, 1H), 3,47 - 3,25 (m, 3H), 3,17 - 2,75 (m, 4H), 2,78 - 2,67 (m, 3H), 2,44 - 2,30 (m, 7H), 1,84 - 1,70 (m, 4H), 1,64 - 1,45 (m, 3H), 1,30 - 0,72 (m, 26H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 773,3 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 7- Compuesto (IIIa-2)



La Fig. 6 muestra esquemáticamente la preparación del compuesto (IIIa-2).

30 A una solución del compuesto 6 (Fig. 1 y el Ejemplo 6, 420 mg, 1,206 mmol) en MeOH (10 ml) en una atmósfera de nitrógeno se le añadió Pd/C (128 mg, 0,121 mmol, Aldrich). La reacción se puso en una atmósfera de H<sub>2</sub> (globo) y se agitó durante 3,0 h. El recipiente de reacción se lavó abundantemente con nitrógeno y se añadió CELITE™. La mezcla se filtró a través de un lecho fino de CELITE™ y se lavó con MeOH. El filtrado se concentró para dar 5-(4-aminobencil)-3,3-dimetil-2-oxopirrolidin-1-carboxilato de (S)-*terc*-butilo 61 en forma de un sólido de color amarillo claro (382 mg, 100 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,99 (d, J= 8,3 Hz, 1H), 6,66 (d, J= 8,3 Hz, 1H), 4,15 (m, 1H), 3,64 (s, 2H), 3,34 (dd, J= 13,1; 3,4 Hz, 1H), 2,53 (dd, J= 13,1; 10,0 Hz, 1H), 1,86 - 1,76 (m, 1H), 1,72 - 1,64 (m, 1H), 1,61 (s, 9H), 1,22 (s, 3H), 1,16 (s, 3H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 659,6 (2M + Na)<sup>+</sup>.

40 A una solución del compuesto 61 (382 mg, 1,20 mmol) y ácido (S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonyl)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanoico 62 (n.º de reg. CAS 557095-84-8, 596 mg, 1,20 mmol) en DMF (5 ml) a 0 °C se le añadieron HATU (593 mg, 1,560 mmol) y 2,6-dimetilpiridina (193 mg, 1,800 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1,5 h. Se añadió agua fría (50 ml). El sólido formado se recogió por filtración, se lavó con agua, y se secó al vacío para dar un sólido de color castaño que se usó para la siguiente reacción directamente. EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 797,5 (M + H)<sup>+</sup>.

45 A una solución del compuesto anterior en THF (10 ml) y DMF (5 ml) se le añadió piperidina (0,570 ml, 5,76 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La reacción se concentró al vacío. El residuo se suspendió en MeOH. El sólido de color blanco formado se retiró por filtración. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar 5-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encil)-3,3-dimetil-2-oxopirrolidin-1-carboxilato de (S)-*terc*-butilo 63 en forma de un sólido espumoso incoloro (610 mg, rendimiento del 92 % durante dos etapas). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,27 (s, 1H), 8,10 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,58 (d,



$J= 8,4$  Hz, 2H), 7,13 (d,  $J= 8,4$  Hz, 2H), 5,25 (s a, 1H), 4,82 (td,  $J= 9,0, 4,3$  Hz, 1H), 4,61 (s a, 2H), 4,25 - 4,14 (m, 1H), 3,54 (dd,  $J= 14,3; 6,8$  Hz, 1H), 3,40 (dd,  $J= 13,1; 3,3$  Hz, 1H), 3,32 (d,  $J= 4,0$  Hz, 1H), 3,24 (dd,  $J= 14,3; 5,7$  Hz, 1H), 2,61 (dd,  $J= 13,1; 9,8$  Hz, 1H), 2,31 (td,  $J= 6,8, 4,0$  Hz, 1H), 2,01 (dd,  $J= 13,8; 4,7$  Hz, 1H), 1,84 - 1,75 (m, 2H), 1,74 - 1,63 (m, 5H), 1,61 (s, 9H), 1,21 (s, 3H), 1,15 (s, 3H), 1,03 (d,  $J= 7,0$  Hz, 3H), 0,88 (d,  $J= 7,0$  Hz, 3H). EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 575,5 (M + H)<sup>+</sup>.

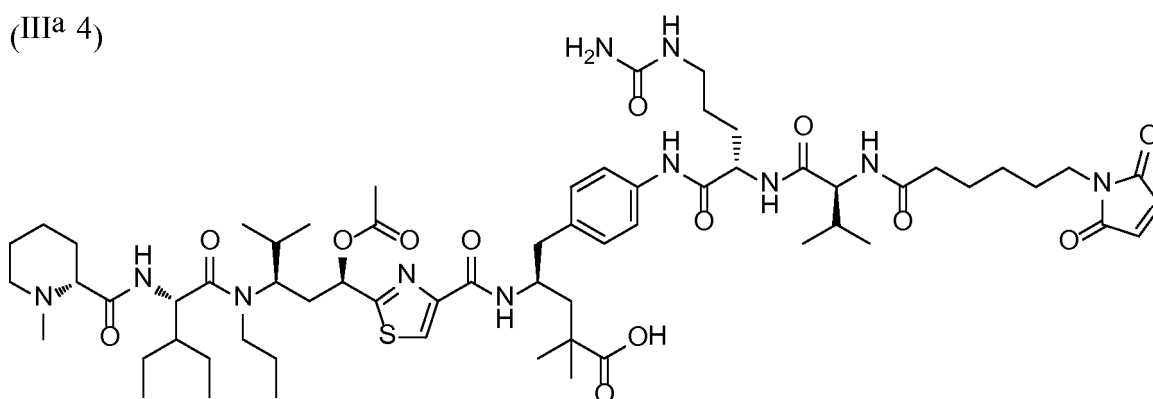
A una solución del compuesto **63** (610 mg, 1,06 mmol) en THF (5 ml) y MeOH (5 ml) se le añadió hidróxido de litio, 1 M en agua (63,5 mg, 2,65 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se acidificó a pH 2-3 con HCl 1 N y se concentró con un rotavapor para retirar los disolventes orgánicos. El residuo se liofilizó hasta la sequedad para dar ácido (S)-5-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)fenil)-4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2,2-dimetilpentanoico **64** en forma de un sólido de color castaño (593 mg, 94 %). EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 593,6 (M + H)<sup>+</sup>.

A una solución del ácido **64** (592 mg, 1,00 mmol) en THF (2 ml) se le añadieron 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5- dioxopirrolidin-1-ilo **65** (Cheng *et al.* 2013, 339 mg, 1,10 mmol) y DIEA (0,524 ml, 3,00 mmol). Se añadió DMF (0,5 ml) para solubilizar la mezcla de reacción. La reacción se agitó a TA durante 5 h y se diluyó con una solución acuosa 0,5 N fría de HCl (10 ml). El precipitado formado se recogió por filtración para dar el producto en bruto (510 mg, 65 %). EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 786,7 (M + H)<sup>+</sup>.

A una solución del producto anterior (370 mg, 0,471 mmol) en DCM (1,5 ml) se le añadió TFA (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y se concentró en un rotavapor. El residuo se disolvió en CH<sub>3</sub>CN/agua y se purificó por HPLC preparativa (columna HPLC prep. de fase inversa C18 Phenomenex Luna S5 ODS 21 x 100 mm eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 10-90 % que contenía TFA al 0,05 % durante un gradiente de 12 minutos) para dar ácido (S)-4-amino-5-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)fenil)-2,2-dimetilpentanoico **66** en forma de un sólido de color blanco (240 mg, 64 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 9,83$  (s, 1H), 8,25 (d,  $J= 7,3$  Hz, 1H), 7,98 (d,  $J= 7,8$  Hz, 1H), 7,61 (dd,  $J= 8,4; 1,8$  Hz, 2H), 7,24 (d,  $J= 8,4$  Hz, 2H), 6,81 (s, 2H), 4,59 - 4,46 (m, 1H), 4,22 - 4,11 (m, 2H), 3,50 (t,  $J= 7,1$  Hz, 3H), 3,25 - 3,09 (m, 2H), 2,89 (dd,  $J= 12,0; 7,4$  Hz, 2H), 2,30 (t,  $J= 7,4$  Hz, 2H), 2,15 - 2,04 (m, 1H), 1,99 - 1,87 (m, 2H), 1,80 - 1,56 (m, 8H), 1,38 - 1,29 (m, 8H), 1,23 (s, 3H), 1,09 (s, 3H), 0,99 (d,  $J= 6,7$  Hz, 6H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 686,6 (M + H)<sup>+</sup>.

A una solución de ácido tiazol 10 (Ejemplo 2, 36,6 mg, 0,054 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadieron HATU (20,44 mg, 0,054 mmol) y DIEA (0,028 ml, 0,161 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 20 min, y después se añadió a una solución del compuesto **66** (43 mg, 0,054 mmol) en 0,3 ml de DMF. La mezcla resultante se agitó a TA durante 1,0 h y se purificó por HPLC preparativa (columna HPLC prep. de fase inversa C18 Phenomenex Luna S5 ODS 21 x 100 mm eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 10-90 % que contenía TFA al 0,05 % durante un gradiente de 12 minutos) para dar el compuesto (**IIIa-2**) en forma de un sólido de color blanco (47 mg, 64 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 9,75$  (s, 1H), 8,81 (d,  $J= 8,3$  Hz, 1H), 8,24 (d,  $J= 7,1$  Hz, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,98 (d,  $J= 7,7$  Hz, 1H), 7,90 (s a, 1H), 7,50 (d,  $J= 8,4$  Hz, 2H), 7,18 (d,  $J= 8,4$  Hz, 2H), 6,81 (s, 2H), 5,71 (d,  $J= 11,1$  Hz, 1H), 4,69 - 4,59 (m, 1H), 4,48 - 4,42 (m, 1H), 4,28 - 4,16 (m, 1H), 3,91 (d,  $J= 11,1$  Hz, 1H), 3,50 (t,  $J= 7,1$  Hz, 2H), 3,25 - 3,07 (m, 5H), 2,91 - 2,78 (m, 3H), 2,68 (s, 3H), 2,29 (t,  $J= 7,4$  Hz, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,01 - 1,86 (m, 7H), 1,81 - 1,54 (m, 14H), 1,37 - 1,30 (m, 5H), 1,23 (s, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,08 - 0,88 (m, 20H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 1234,8 (M + H)<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 8 - Compuesto (**IIIa-4**)



La síntesis del compuesto (**IIIa-4**) se describe esquemáticamente mediante las **Figs. 7a** y **7b** en combinación.

Se añadió DCC (0,755 g, 3,66 mmol) a una mezcla del compuesto **11** (1 g, 3,33 mmol), ácido (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-etilpentanoico **70** (0,898 g, 3,66 mmol) e hidrato de *t*-butanol (0,510 g, 3,33 mmol) en DCM (15 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y se agitó a TA durante una noche. El sólido se

retiró por filtración y el filtrado se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-10 % en DCM para proporcionar 1,14 g de 2-((6S,9R,11R)-11-isopropil-2,2-dimetil-4,7-dioxo-6-(pentan-3-il)-3,8-dioxa-5,12-diazapentadecan-9-il)tiazol-4-carboxilato de metilo **71** en forma de un aceite incoloro. EM: (+) m/z 528,3 (M+1).

5 Una solución del compuesto **71** (0,9 g, 1,705 mmol) en o-xileno (5,1 ml) se calentó a 120 °C durante una noche. El disolvente se evaporó. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de EtOAc al 0-100 % en hexanos para proporcionar 0,44 g de 2-((1R,3R)-3-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-etil-N-propilpentanamido)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **72** en forma de un sólido de color amarillo claro. EM: (+) m/z 528,3 (M+1).

15 Se añadió TFA (3 ml, 0,834 mmol) a una solución del compuesto **72** (0,44 g, 0,834 mmol) en DCM (6 ml). Después de que la mezcla de reacción se agitara a TA durante 30 min, se concentró por la retirada del disolvente, se diluyó con EtOAc y se lavó una vez con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado. La solución acuosa se extrajo de nuevo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se concentraron para proporcionar 0,357 g de 2-((1R,3R)-3-((S)-2-amino-3-etil-N-propilpentanamido)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **73** en forma de una espuma de color blanco. EM: (+) m/z 428,3 (M+1).

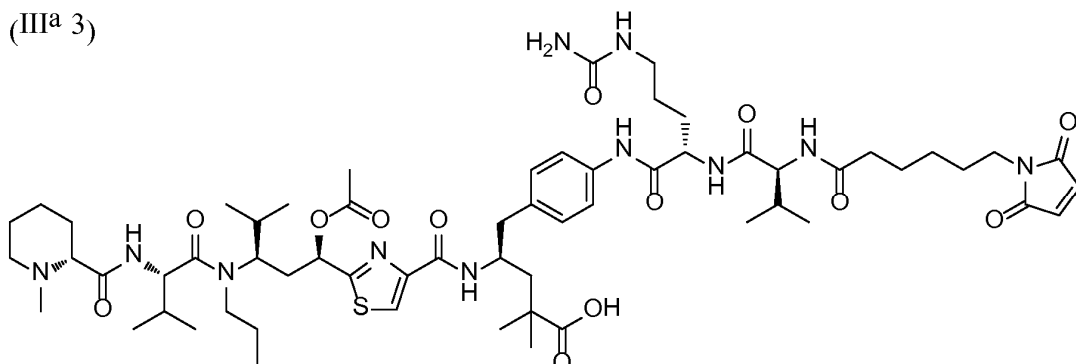
20 Se añadió DIEA (0,098 ml, 0,561 mmol) a una solución del compuesto **73** (0,24 g, 0,561 mmol) y 1-metilpiperidin-2-carboxilato de (R)-perfluorofenilo **74** (0,868 g, 2,81 mmol) en DMF (3 ml) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h. Después, se añadió EtOAc (30 ml) y la solución orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y salmuera, se secó, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-10 % en DCM para proporcionar 0,178 g de 2-((1R,3R)-3-((S)-3-etil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carboxamido)-N-propilpentanamido)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo **75** en forma de un aceite de color amarillo claro. EM: (+) m/z 553,3 (M+1).

30 Se añadió LiOH (0,031 g, 1,291 mmol) en agua (0,5 ml) a una solución del compuesto **75** (0,1784 g, 0,323 mmol) en THF (1 ml) a ta. Después de la mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h, el disolvente se evaporó. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-30 % en DCM para proporcionar 120 mg de ácido 2-((1R,3R)-3-((S)-3-etil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carboxamido)-N-propilpentanamido)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxílico **76** en forma de un sólido de color blanco. EM: (+) m/z 539,3 (M+1).

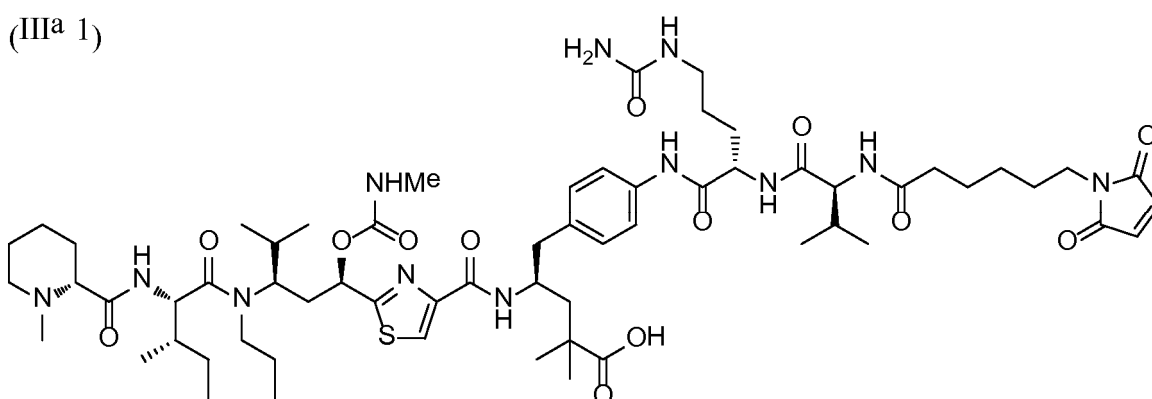
35 Una solución del compuesto **76** (0,121 g, 0,223 mmol) en piridina (1,8 ml) se enfrió en un baño de agua enfriada con hielo y se añadió anhídrido acético (0,105 ml, 1,114 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y se agitó a TA durante una noche. Se añadió una solución 1:1 (v/v) de agua desgasificada y THF (8 ml) después de que la mezcla de reacción se enfriara en un baño de agua enfriada con hielo. Después, la mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. El disolvente se evaporó. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo a partir de gel de sílice con un gradiente de MeOH al 0-30 % en DCM para proporcionar 100 mg de ácido 2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-((S)-3-etil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carboxamido)-N-propilpentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxílico **77** en forma de un sólido de color blanco. EM: (+) m/z 581,3 (M+1).

45 Se añadió DIEA (4,17 µl, 0,024 mmol) a una solución del compuesto **77** (13,89 mg, 0,024 mmol) y HATU (9,09 mg, 0,024 mmol) en DMF (0,5 ml). El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 8-9. Después de que la mezcla de reacción se agitara a TA durante 10 min, se añadieron el compuesto **66** (16,4 mg, 0,024 mmol) en DMF (1 ml) y DIEA (4,17 µl, 0,024 mmol). El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 8-9. Después de que la mezcla de reacción se agitara a TA durante 20 min, la reacción se detuvo mediante la adición de 10 ml 1:1 (v/v) de una mezcla de agua que contenía TFA al 0,1 % y acetonitrilo. El compuesto de producto (**IIa-4**) se purificó por HPLC preparativa. EM: (+) m/z 1248,7 (M+1).

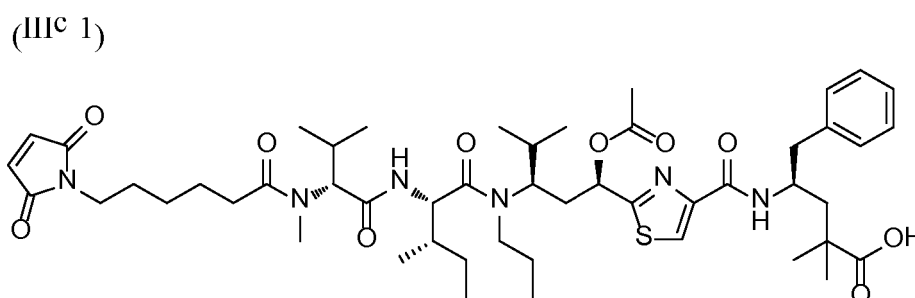
50 El compuesto (**Ia-4**) puede prepararse a partir del compuesto (**IIa-4**) mediante la retirada del enlazador, por ejemplo mediante la escisión con catepsina B.

**Ejemplo 9 - Compuesto (IIIa-3)**

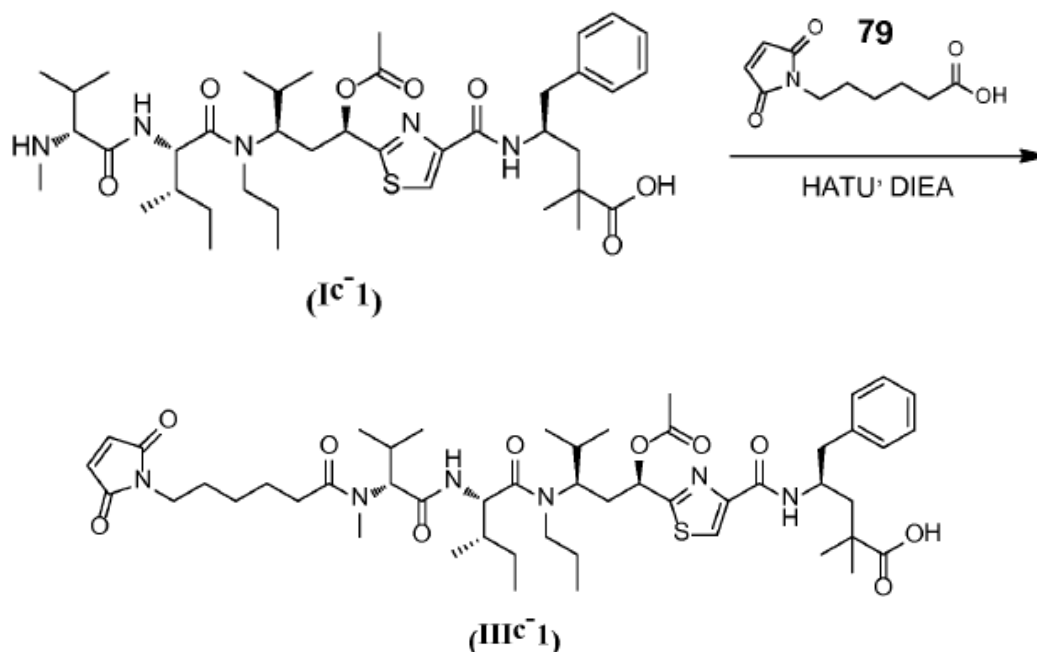
- 5 Siguiendo los procedimientos descritos para el compuesto IIIa-2, se usó el compuesto 19 (15 mg, 0,022 mmol) como un precursor para la síntesis del compuesto (IIIa-3) (16 mg, 51 %): RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ = 9,73 (s, 1H), 8,21 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,96 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,88 (s a, 1H), 7,48 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,16 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 5,76 - 5,64 (m, 1H), 4,63 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,44 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 4,18 (t, *J* = 1,1 Hz, 1H), 3,91 - 3,88 (m, 1H), 3,63 - 3,58 (m, 2H), 3,51 - 3,44 (m, 3H), 3,21 - 3,08 (m, 4H), 2,85 - 2,76 (m, 3H), 2,67 (s, 3H), 2,34 - 2,25 (m, 3H), 2,17 (s, 4H), 2,00 - 1,83 (m, 6H), 1,75 (m, 3H), 1,60 (m, 10H), 1,37 - 1,25 (m, 4H), 1,22 (s, 3H), 1,20 (s, 3H), 1,09 - 0,86 (m, 23H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 1220,4 (M + H)<sup>+</sup>.
- 10

**Ejemplo 10- Compuesto (IIIa-1)**

- 15 Siguiendo los procedimientos descritos para el compuesto (IIIa-2), el compuesto 9 (20 mg, 0,034 mmol) se usó como un precursor para la síntesis del compuesto (IIIa-1) (13 mg, 28 %): RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,85 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 9,21 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,02 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7,79 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 7,66 (s a, 1H), 7,49 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7,41 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7,00 (s, 2H), 6,00 (s, 1H), 5,56 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 5,42 (s, 1H), 4,51 (t, *J* = 8 Hz, 1H), 4,38-4,21 (m, 2H), 4,19 (t, *J* = 8 Hz, 1H), 3,85 - 3,79 (m, 1H), 3,08 - 2,91 (m, 5H), 2,72 - 2,56 (m, 8H), 2,17 - 2,08 (m, 5H), 1,98-1,90 (m, 5H), 1,82 - 1,42 (m, 16H), 1,21-1,17 (m, 3H), 1,08 (d, *J* = 4 Hz, 6H), 0,96 - 0,75 (m, 21H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 1250,1 (M+H)<sup>+</sup>.
- 20

**25 Ejemplo 11 - Compuesto (IIIc-1)**

Se preparó el compuesto de enlace a análogo (**IIIc-1**) a partir del análogo (**Ic-1**) mediante el acoplamiento mediado con HATU con el ácido 79:



5

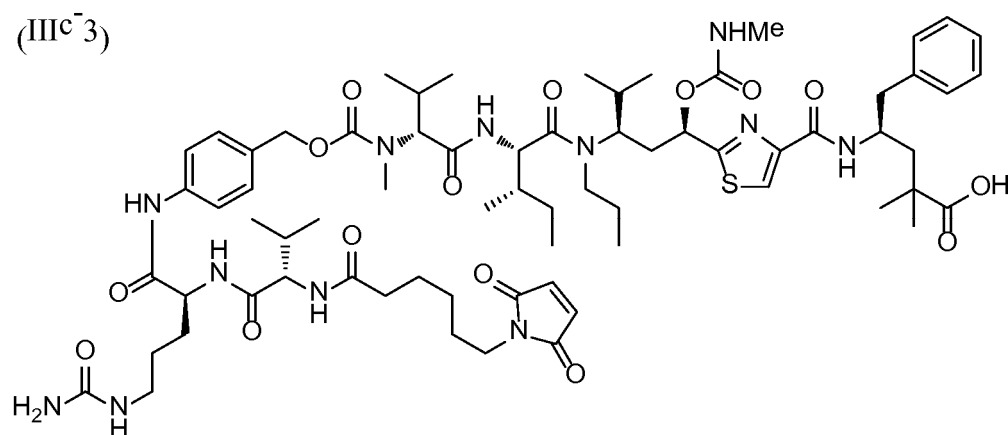
Se disolvieron HATU (0,012 g, 0,024 mmol) y ácido 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoico **79** (n.º de reg. CAS 55750-53-3, 4,97 mg, 0,024 mmol) en DMF (0,5 ml) a TA y después, la solución resultante se trató con DIEA (0,015 ml, 0,086 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 45 min. Después, se añadieron una solución del compuesto (**Ic-1**), HCl (0,017 g, 0,021 mmol) y DIEA (0,015 ml, 0,086 mmol) y la mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por carga húmeda en una columna de fase inversa Gold ISCO C-18 de 50 gramos, eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 40-100 % con TFA al 0,1 % durante un gradiente de 12 minutos. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar un enlace a análogo (**IIIc-1**) (0,008 g, 38 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, acetonitrilo-d<sub>3</sub>) δ 8,02 - 7,87 (m, 1H), 7,40 - 7,13 (m, 5H), 6,84 - 6,61 (m, 2H), 5,77 - 5,58 (m, 1H), 4,67 - 4,53 (m, 2H), 4,46 - 4,28 (m, 2H), 3,51 - 3,24 (m, 2H), 3,10 - 2,52 (m, 7H), 2,31 - 2,08 (m, 9H), 1,92 - 1,83 (m, 1H), 1,74 - 1,49 (m, 6H), 1,38 - 1,25 (m, 2H), 1,21 - 1,02 (m, 10H), 1,00 - 0,66 (m, 21H); EM (IEN<sup>+</sup>) m/z 952,0 (M+H)<sup>+</sup>.

10

15

#### Ejemplo 12 - Compuesto (**IIIc-3**)

20



Las Figs. 8a y 8b muestran, en combinación, un esquema para hacer el compuesto (**IIIc-2**).

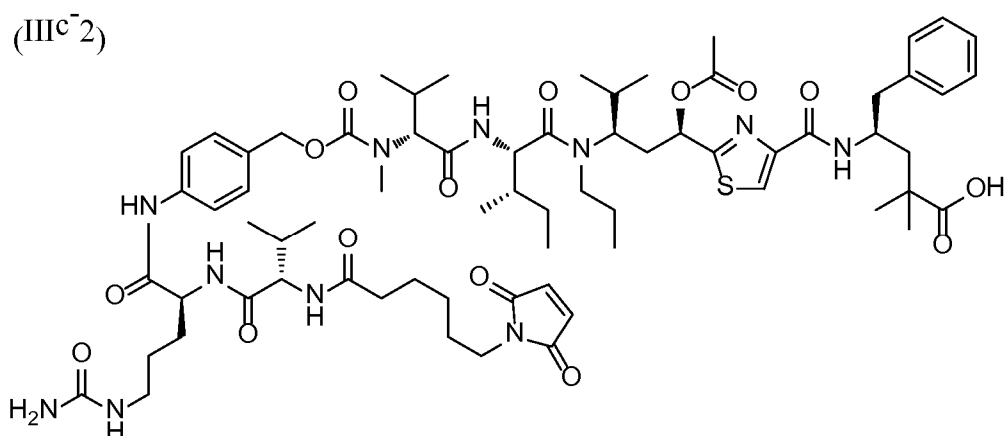
25 Se disolvieron ácido (*R*)-2-((*tert*-butoxicarbonil)(metil)amino)-3-metilbutanoico **80** (1 g, 4,32 mmol), fenilmetanol **81** (0,447 ml, 4,32 mmol), 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-ol (0,647 g, 4,76 mmol) y N1-((etilimino)metileno)-N3,N3-dimetilpropano-1,3-diamina (0,738 g, 4,76 mmol) en DMF (3 ml) y después, la solución resultante se trató con DIEA

- (3,01 ml, 17,29 mmol) a TA. La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 48 h. La mezcla de reacción en bruto se cargó húmeda en una columna de fase inversa gold ISCO de 50 g C-18, eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 40-100 % con TFA al 0,1 % TFA durante un gradiente de 13 min. Las fracciones apropiadas se aislaron y se inactivaron con NaCl ac. La solución se extrajo con DCM (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y el filtrado se concentró *al vacío* para proporcionar 2-((*terc*-butoxicarbonil)-(metil)amino)-3-metilbutanoato de (*R*)-bencilo **82** (0,63 g, 45 %) en forma de un aceite. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 7,35 (s, 5H), 5,17 (s a, 2H), 4,52 (d, *J*= 10,6 Hz, 1H), 4,16 (d, *J*= 10,6 Hz, 1H), 2,92 - 2,69 (m, 3H), 2,20 (s a, 1H), 1,45 (d, *J*= 14,3 Hz, 9H), 0,97 (d, *J*= 6,6 Hz, 3H), 0,90 (d, *J*=6,4 Hz, 3H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 322,1 (M+H)<sup>+</sup>.
- 10 El compuesto **82** (0,63 g, 1,960 mmol) se trató con HCl 4 N (4,90 ml, 19,60 mmol) en dioxano (4,9 ml) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y después se concentró *al vacío*. Además, el sólido se secó a alto vacío para proporcionar 3-metil-2-(metilamino)butanoato de (*R*)-bencilo **83** (0,50 g, 99 %) en forma de una sal de HCl sólida. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 7,48 - 7,27 (m, 5H), 5,44 - 5,17 (m, 2H), 3,97 (d, *J*= 4,0 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,30 (td, *J*= 7,0, 4,1 Hz, 1H), 1,11 - 0,81 (m, 6H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 222,1 (M+H)<sup>+</sup>.
- 15 Se disolvió ((*S*)-1-(((*S*)-1-(4-(hidroximetil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9*H*-fluoren-9-il)metilo **84** (0,5 g, 0,831 mmol) en DMF (5 ml) y se añadió el compuesto 53a (0,506 g, 1,662 mmol), seguido de DIEA (0,23 ml, 1,320 mmol) a TA. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a TA. La CL/EM no mostró material de partida. Después, la mezcla de reacción se trató con 30 ml de Et<sub>2</sub>O y se agitó a TA durante 30 min. El precipitado que se formó, se filtró y se lavó con Et<sub>2</sub>O adicional. El sólido se secó a alto vacío para proporcionar ((*S*)-3-metil-1-(((*S*)-1-(4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)-fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9*H*-fluoren-9-il)metilo **85** (0,533 g, 84 %) en forma de un sólido de color amarillento. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,12 (s, 1H), 8,37 - 8,22 (m, 2H), 8,12 (d, *J*=1,5 Hz, 1H), 7,88 (d, *J*= 7,5 Hz, 2H), 7,76 - 7,50 (m, 5H), 7,44 - 7,15 (m, 7H), 5,96 (t, *J*= 5,5 Hz, 1H), 5,39 (s, 2H), 5,24 (s, 2H), 4,49 - 4,39 (m, 1H), 4,34 - 4,10 (m, 3H), 3,93 (dd, *J*= 8,8, 7,3 Hz, 1H), 3,13 - 2,82 (m, 2H), 2,05 - 1,88 (m, 1H), 1,75 - 1,53 (m, 2H), 1,50 - 1,28 (m, 2H), 0,87 (dd, *J*=11,1, 6,7 Hz, 6H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 767,3 (M+H)<sup>+</sup>.
- 20 El compuesto **85** (0,11 g, 0,143 mmol) se disolvió en DMF (1 ml) y después, la solución resultante se trató con el compuesto **83** (clorhidrato, 0,11 g, 0,427 mmol), 1*H*-benzo[d][1,2,3]triazol-1-ol (0,058 g, 0,430 mmol) y después con 2,6-dimetilpiridina (0,117 ml, 1,004 mmol) a TA. La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 12 h. La mezcla de reacción en bruto se cargó húmeda en una columna de fase inversa gold ISCO C-18 eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 50-100 % con TFA al 0,1 % durante un gradiente de 13 minutos. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar 2-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)-3-metilbutanoato de (*R*)-bencilo **86** (0,08 g, 65 %) en forma de un sólido. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,10 (d, *J*= 7,5 Hz, 1H), 7,88 (d, *J*= 7,5 Hz, 3H), 7,73 (t, *J*=7,9 Hz, 3H), 7,60 - 7,51 (m, 3H), 7,43 - 7,11 (m, 9H), 5,95 (s a, 1H), 5,39 (s a, 1H), 5,16 - 4,86 (m, 4H), 4,50 - 4,12 (m, 5H), 3,93 (dd, *J*= 8,9, 6,9 Hz, 1H), 3,08 - 2,88 (m, 2H), 2,84 - 2,72 (m, 3H), 2,15 (s a, 1H), 2,05 - 1,93 (m, 1H), 1,73 - 1,54 (m, 2H), 1,46 - 1,24 (m, 2H), 0,98 - 0,67 (m, 12H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 849,6 (M+H)<sup>+</sup>.
- 30 El compuesto **86** (0,075 g, 0,088 mmol) y Pd al 10 %/C se trató con MeOH (2 ml). Después, la mezcla heterogénea se trató con trietilsilano (0,141 ml, 0,883 mmol) a TA. Una vez que cesó el desprendimiento de gas (5 min) la reacción se completó. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de CELITE™ y el filtrado se concentró *al vacío*. Además, el sólido se secó a alto vacío para proporcionar ácido (*R*)-2-(((4-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)-bencil)oxi)carbonil)(metil)amino)-3-metilbutanoico **87** (0,060 g, 85 %) en forma de un sólido; EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 759,4 (M+H)<sup>+</sup>.
- 35 El compuesto **87** (0,06 g, 0,079 mmol) y HATU (0,030 g, 0,079 mmol) se disolvieron en 2,6-lutidina (0,037 ml, 0,316 mmol) a TA. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a TA. Después, se añadió una solución del ácido **88** (0,052 g, 0,079 mmol) y 2,6-lutidina (0,037 ml, 0,316 mmol) en DMF (1 ml) y la mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 1 h. (El compuesto **88** puede prepararse acoplando los compuestos 35 y 60 y después reduciendo el grupo azida con trifenilfosfina.) La reacción en bruto se cargó húmeda en una columna de fase inversa gold ISCO C-18 de 50 g, eluyendo con CH<sub>3</sub>CN ac. al 50-100 % con TFA al 0,1 % durante un gradiente de 12 minutos. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar ácido (*S*)-4-(2-(((5*R*,8*S*,11*R*,13*R*)-1-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)fenil)-8-((*S*)-sec-butil)-5,11-diisopropil-4-metil-3,6,9,15-tetraoxo-10-propil-2,14-dioxa-4,7,10,16-tetraazaheptadecan-13-il)tiazol-4-carboxamido)-2,2-dimetil-5-fenilpentanoico **89** (0,038 g, 34 %) en forma de un sólido. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,09 - 9,92 (m, 1H), 8,36 (s a, 1H), 8,08 (s a, 2H), 7,88 (s, 5H), 7,61 - 6,96 (m, 10H), 5,96 (d, *J*=5,1 Hz, 1H), 5,65 - 5,49 (m, 1H), 5,38 (s a, 2H), 4,98 (s a, 2H), 4,59 - 4,09 (m, 9H), 3,93 - 3,81 (m, 1H), 3,10 - 2,94 (m, 2H), 2,87 - 2,68 (m, 4H), 2,57 (d, *J*= 4,6 Hz, 4H), 2,32 (d, *J*= 1,8 Hz, 3H), 2,16 - 1,80 (m, 6H), 1,74 - 1,11 (m, 11H), 1,06 - 0,95 (m, 5H), 0,92 - 0,56 (m, 27H); EM (IEN<sup>+</sup>) *m/z* 1400,2 (M+H)<sup>+</sup>.
- 50 El compuesto **89** (0,038 g, 0,027 mmol) se disolvió en DMF (1 ml) con piperidina (0,2 ml, 2,025 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 1 h y se purificó por carga húmeda en una columna de fase inversa gold ISCO C-18 de 50 g, eluyendo con acetronilo ac. al 10-100 % con TFA al 0,1 % durante un gradiente de 12 min. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar ácido (*S*)-4-(2-(((5*R*,8*S*,11*R*,13*R*)-1-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)fenil)-8-((*S*)-sec-butil)-5,11-diisopropil-4-metil-
- 55
- 60

3,6,9,15-tetraoxo-10-propil-2,14-dioxa-4,7,10,16-tetraazaheptadecan-13-il)tiazol-4-carboxamido)-2,2-dimetil-5-fenilpentanoico **90** (0,027 g, 76 %) en forma de una sal de TFA sólida. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,12 - 7,97 (m, 1H), 7,58 (d,  $J=8,4$  Hz, 2H), 7,42 - 7,02 (m, 7H), 6,10 - 5,94 (m, 1H), 5,59 - 5,39 (m, 2H), 4,98 (d,  $J=9,5$  Hz, 2H), 4,58 - 4,11 (m, 6H), 2,99 (s a, 2H), 2,82 - 2,71 (m, 5H), 2,66 - 2,53 (m, 6H), 2,37 - 2,24 (m, 1H), 2,14 - 1,90 (m, 3H), 1,75 - 1,33 (m, 6H), 1,28 - 0,34 (m, 37H); EM (IEN $^+$ )  $m/z$  1178,5 (M+H) $^+$ .

El compuesto **79** (4,71 mg, 0,022 mmol) y HATU (8,47 mg, 0,022 mmol) se disolvieron en DMF (0,5 ml). La solución resultante se trató con DIEA (0,013 ml, 0,074 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 minutos. Se añadió una solución de DMF (0,5 ml) de la sal de TFA del compuesto **90** (0,024 g, 0,019 mmol) y DIEA (0,013 ml, 0,074 mmol) y después la mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por carga húmeda en una columna de fase inversa gold ISCO C-18 de 50 g, eluyendo con  $\text{CH}_3\text{CN}$  ac. al 30-100 % con TFA al 0,1 % durante un gradiente de 12 minutos. Las fracciones apropiadas se aislaron y se secaron por congelación para proporcionar el compuesto (**IIIc-3**) (0,012 g, 45 %) en forma de un sólido. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, acetonitrilo- $d_3$ )  $\delta$  8,94 (s, 1H), 7,92 (d,  $J=7,0$  Hz, 1H), 7,66 (d,  $J=7,5$  Hz, 2H), 7,44 - 7,07 (m, 9H), 6,78 - 6,61 (m, 2H), 5,63 (d,  $J=11,2$  Hz, 1H), 4,96 (s a, 2H), 4,60 (s a, 1H), 4,49 (s a, 1H), 4,38 (s a, 1H), 4,21 - 4,01 (m, 3H), 3,55 - 3,38 (m, 3H), 3,30 - 3,18 (m, 1H), 3,11 - 2,95 (m, 3H), 2,92 - 2,61 (m, 9H), 2,57 - 2,05 (m, 7H), 1,84 - 1,39 (m, 12H), 1,34 - 1,17 (m, 4H), 1,08 (s a, 3H), 0,98 - 0,50 (m, 33H); EM (IEN $^+$ )  $m/z$  1371,9 (M+H) $^+$ .

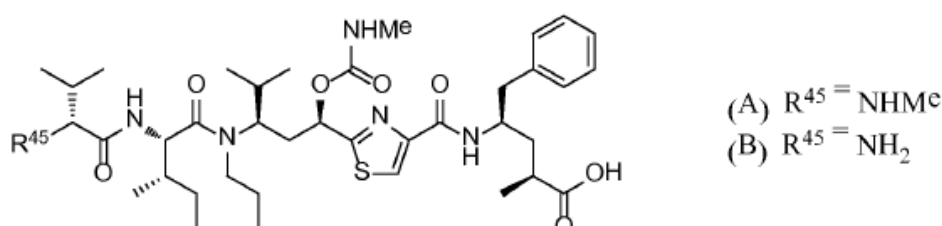
### Ejemplo 13 - Compuesto (IIIc-2)

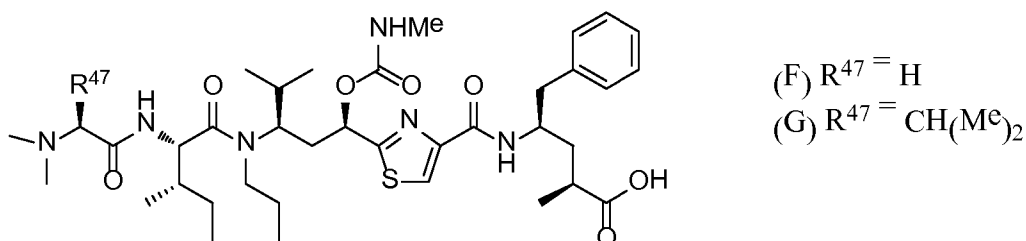
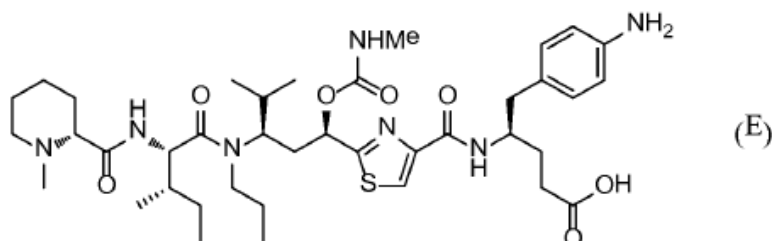
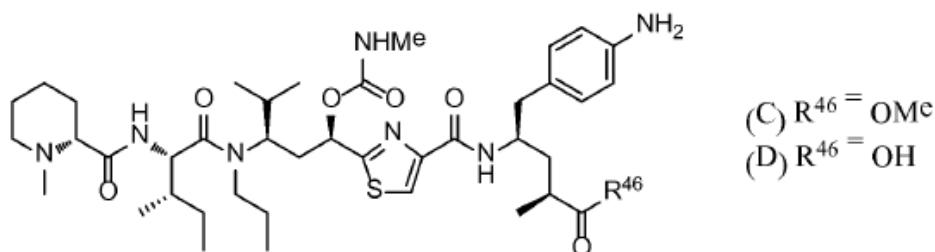


Se preparó el compuesto de enlace a análogo (**IIIc-2**) a partir del compuesto **87** del ejemplo previo y el compuesto **39**, generalmente siguiendo el mismo procedimiento del ejemplo previo. Las propiedades analíticas del compuesto (**IIIc-2**) fueron: RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, acetonitrilo- $d_3$ )  $\delta$  8,93 (s a, 1H), 8,00 - 7,88 (m, 1H), 7,76 - 7,56 (m, 1H), 7,41 - 7,05 (m, 9H), 6,68 (d,  $J=7,3$  Hz, 2H), 5,76 (d,  $J=11,2$  Hz, 1H), 4,96 (s a, 2H), 4,61 (s a, 1H), 4,50 (s a, 1H), 4,38 (s a, 1H), 4,20 - 3,97 (m, 3H), 3,59 (s a, 1H), 3,43 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H), 3,29 - 3,18 (m, 1H), 3,13 - 3,03 (m, 1H), 2,96 - 2,84 (m, 2H), 2,80 (s a, 4H), 2,54 (s a, 3H), 2,33 - 2,17 (m, 2H), 2,10 - 2,09 (m, 1H), 2,01 - 1,44 (m, 20H), 1,35 - 1,01 (m, 10H), 0,98 - 0,55 (m, 27H); EM (IEN $^+$ )  $m/z$  1375,5 (M+H) $^+$ .

### Ejemplo 14 Actividad biológica de compuestos

La actividad citotóxica de los compuestos de la presente invención se muestra en la Tabla II. Las líneas celulares de cáncer probadas fueron: H226 (cáncer de pulmón humano); N87 (cáncer gástrico humano), OVCAR3 (cáncer de ovarios humano), HCT116 (cáncer de colon humano), HCT116/VM46 (sublínea HCT116 con resistencia a múltiples fármacos, incluyendo paclitaxel) y ACR (cáncer de mama humano, resistente a múltiples fármacos). La Tabla II también incluye datos comparativos contra los compuestos de referencia (A)-(G) no conforme a la presente invención:





- 5 La capacidad de los compuestos de ensayo para inhibir la proliferación celular se midió mediante un ensayo de luminiscencia de ATP o un ensayo de proliferación celular MTS. Estos dos métodos producen resultados comparables. En algunos casos, se utilizaron ambos métodos.

10 Este es un procedimiento general para un ensayo de luminiscencia de ATP: Las células se siembran a  $1 \times 10^3$  células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 3 horas para los ensayos ATP CellTiterGlo™, respectivamente. Se añaden diluciones en serie (1:3) de los compuestos a los pocillos. Las placas se dejan incubar durante 72 horas. Se usa un kit de viabilidad celular CellTiterGlo™ de Promega para medir el contenido de ATP de las células tratadas con compuestos de prueba siguiendo las instrucciones del fabricante. Una disminución en el contenido de ATP es una medida de disminución en la viabilidad celular. El valor de la  $CE_{50}$ , la concentración a la que un agente reduce la viabilidad celular en un 50 % del efecto máximo, se determina mediante el software PRISM™, versión 5.0 (software GraphPad, La Jolla, CA, Estados Unidos).

20 La siguiente es una descripción del ensayo de proliferación celular MTS: El kit de proliferación celular no radiactivo acuoso CellTiter 96 de Promega (Madison, WI) se usa para determinar el número de células viables en el ensayo de proliferación celular. Las células tumorales se colocan en placas a ciertas densidades de siembra en placas Matrix de 384 pocillos de fondo transparente, negras y estériles a 40  $\mu\text{l}$  por pocillo y se incuban durante la noche a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 % antes del ensayo. Al día siguiente, se usa un conjunto de placas celulares (placas T0) para determinar la densidad celular a tiempo cero, y se añade 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio a 4  $\mu\text{l}$ /pocillo en placas T0, seguido de incubación a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 % durante tres horas. Este reactivo de tetrazolio es degradado por las células hepáticas para formar un producto de formazán que es soluble en solución acuosa. La absorbancia a 490 nm se mide en un lector Envision (Perkin Elmer, Boston, MA). El mismo día, los compuestos se añaden a las placas celulares restantes (placas T72) y se incuban a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 %. Después de 72 horas, se añaden 4  $\mu\text{l}$  de reactivos MTS en esas placas celulares. Las placas se incuban adicionalmente a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 % durante tres horas y los valores de absorbancia a A490 se midieron en un lector Envision.

30

| Compuesto | Línea celular de cáncer: $CE_{50}$ (nM) |             |              |        |             |     |
|-----------|---|-------------|--------------|--------|-------------|-----|
|           | H226                                    | N87         | OVCAR3       | HCT116 | HCT116/VM46 | ADR |
| (Ia-1)    | 0,089                                   | 0,03 a 0,20 | 0,016 a 0,04 |        |             |     |
| (Ia-2)    | 0,33 a 1,1                              | 0,65 a 1,0  | 0,07 a 0,1   | 0,58   | 1,22        | 9,5 |
| (Ia-3)    | 0,086                                   | 0,16        | 0,019        | 0,13   | 0,19        |     |
| (Ib-1)    | 0,63                                    | 1,7         | 0,07         |        |             |     |

(continuación)

| Compuesto | Línea celular de cáncer: CE <sub>50</sub> (nM) |      |        |        |             |     |
|-----------|--|------|--------|--------|-------------|-----|
|           | H226   | N87  | OVCAR3 | HCT116 | HCT116/VM46 | ADR |
| (Ib-2)    | 0,4  | 4,4  | 0,15   |        |             |     |
| (Ic-1)    | 0,038  | 0,20 | 0,012  | 0,064  | 0,51        |     |
| (Ic-2))   | 0,31   | 0,37 | 0,04   | 0,26   | 7,5         |     |
| (A)       | 2,4  | 3,2  | 0,46   |        |             |     |
| (B)       | 85   | 106  | 57     | 200    | >250        |     |
| (C)       | 3,3  |      |        |        |             | 86  |
| (D)       | 11   | 10   | 1,0    |        |             | 33  |
| (E)       | 28   |      |        |        |             | 189 |
| (F)       | 78   |      |        |        |             |     |
| (G)       | 27   |      |        |        |             | 383 |

**Ejemplo 15- Actividad biológica de los conjugados**

- 5 Los compuestos análogo-enlazador (IIIa-1)-(IIIa-4) y (IIIc-1)-(IIIc-3) se conjugaron con un anticuerpo monoclonal humano anti-CD70 y se probaron para determinar su actividad contra las células de cáncer renal 786-0, usando un ensayo con timidina <sup>3</sup>H (Cong *et al.* 2014). Los resultados se proporcionan en la Tabla III.

| Conjugado     | DAR | Cl <sub>50</sub> (nM) |
|---------------|-----|-----------------------|
| (IIIa-1)-CD70 | 2   | 0,34                  |
| (IIIa-2)-CD70 | 1,8 | 0,21                  |
| (IIIa-3)-CD70 | 3,3 | 0,20                  |
| (IIIa-4)-CD70 | 3,1 | 0,23                  |
| (IIIc-2)-CD70 | 2,1 | 0,64                  |
| (IIIc-3)-CD70 | 2,4 | 1,5                   |

- 10 Los compuestos análogo-enlazador (IIIa-1)-(IIIa-4) y (IIIc-1)-(IIIc-3) se conjugaron con un anticuerpo monoclonal humano anti-mesotelina y se probaron para determinar su actividad contra las células de cáncer gástrico N87, usando un ensayo con timidina <sup>3</sup>H (Cong *et al.* 2014). Los resultados se proporcionan en la Tabla IV.

| Conjugado     | DAR | Cl <sub>50</sub> (nM) |
|---------------|-----|-----------------------|
| (IIIa-1)-CD70 | 3,5 | 0,14                  |
| (IIIa-2)-CD70 | 2,2 | 0,24                  |
| (IIIa-3)-CD70 | 2,8 | 0,10                  |
| (IIIa-4)-CD70 | 3,1 | 0,25                  |
| (IIIc-2)-CD70 | 2,3 | 6                     |
| (IIIc-3)-CD70 | 2,4 | 5,7                   |

- 15 El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

**REFERENCIAS**

- 20 A continuación se proporcionan citas completas de las referencias citadas en forma abreviada por el primer autor (o inventor) y la fecha anterior en esta memoria descriptiva.

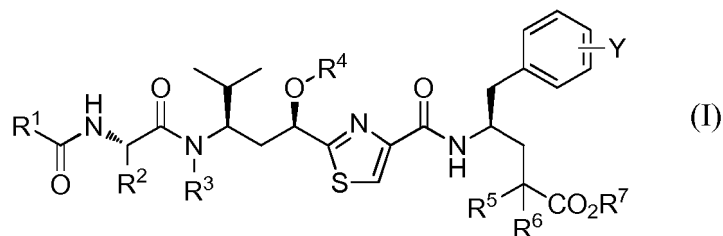
- Abe et al., documento WO 9H21712 (1997).  
 Boyd et al., documento US 2008/0279868 A1 (2008).  
 Boyd et al., documento US 7,691,962 B2 (2010).  
 25 Balasubramanian et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 2996.  
 Balasubramanian et al., *J. Med. Chem.* 2009, 52 (2), 238.  
 Chai et al., *Chem. & Biol.* 2010, 17(3), 296.  
 Chai et al., documento US 2011/0245295 A1 (2011).  
 Cheng et al., documento US 8,394,922 B2 (2013).  
 30 Coccia et al., documento US 2010/0150950 (2010).  
 Cong et al., documento US 2014/0227295 A1 (2014).  
 Davis et al., documento US 2008/0176958 A1 (2008).  
 Do mling, DE 10 2004 030 227 A1 (2006).  
 Do mling et al., documento US 2005/0239713 A1 (2005) [2005a],  
 35 Do mling et al., documento US 2005/0249740 A1 (2005) [2005b],  
 Do mling et al., *Mol. Diversity* 2005, 9, 141 [2005c].



- Do mling et al., *Ang. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 7235.  
Ellman et al., documento US 8,476,451 B2 (2013).  
Hamel et al., *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* 2002, 2, 19.  
5 Hoefle et al., DE 100 08 089 A1 (2001).  
Hoefle et al., *Pure Appl. Chem.* 2003, 75 (2-3), 167.  
Hoefle et al., documento US 2006/0128754 A1 (2006) [2006a].  
Hoefle et al., documento US 2006/0217360 A1 (2006) [2006b].  
Jackson et al., documento US 2013/0224228 A1 (2013).  
Kaur et al., *Biochem. J.* 2006, 396, 235.  
10 Khalil et al., *ChemBioChem* 2006, 7, 678.  
Leamon et al., *Cancer Res.* 2008, 68 (23), 9839.  
Leamon et al., documento US 2010/0323973 A1 (2010).  
Leamon et al., documento US 2013/0116915 A1 (2013).  
Leung et al., documento US 2002/0169125 A1 (2002).  
15 Low et al., documento US 2010/0324008 A1 (2010).  
Lundquist et al., *Org. Lett.* 2001, 3, 781.  
Mammen et al., documento US 2013/0323271 A1 (2013).  
Miao et al., documento WO 2013/173393 A1 (2013).  
Neri et al., *ChemMedChem* 2006, 1, 175.  
20 Pando et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 7692.  
Patterson et al., *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 9534.  
Patterson et al., *J. Org. Chem.* 2008, 73, 4362.  
Peltier et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 16018.  
Raghavan et al., *J. Med. Chem.* 2008, 51, 1530.  
25 Reddy et al., *Mol. Pharmaceutics* 2009, 6 (S), 1518.  
Reichenbach et al. WO 98/13375 A1 (1998).  
Richter, documento US 2012/0129779 A1 (2012) [2012a]  
Richter, documento US 2012/0252738 A1 (2012) [2012b].  
Richter, documento US 2012/0252739 A1 (2012) [2012c].  
30 Sani et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 3526.  
Sasse et al., *J. Antibiotics* 2000, 53 (9), 879.  
Sasse et al., *Nature Chem. Biol.* 2007, 3 (2), 87.  
Schluep et al., *Clin. Cancer Res.* 2009, 15 (1), 181.  
Schrama et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 147.  
35 Shankar et al., *SYNLETT* 2009, 8, 1341-1345.  
Shankar et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11(14), 2273.  
Shibue et al., *Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 3845.  
Shibue et al., *Chemistry Eur. J.*, 2010, 16(38), 11678.  
Shibue et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 21, 431.  
40 Sreejith et al., *SYNLETT* 2011, n.º 12, 1673.  
Steinmetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 4888.  
Terrett et al., documento US 8,268,970 B2 (2012).  
Terrette et al., documento US 2010/0209432 A1 (2010).  
Ullrich et al., *Angew. Chemie Int. Ed.* 2009, 48, 4422.  
45 Vlahov et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18 (16), 4558 [2008a].  
Vlahov et al., documento US 2008/0248052 A1 (2008) [2008b].  
Vlahov et al., documento US 2010/0240701 A1 (2010) [2010a].  
Vlahov et al., documento US 2010/0048490 A1 (2010) [2010b].  
Vlahov et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 6778.  
50 Vlahov et al., documento US 2014/0107316 A1 (2014) [2014a].  
Vlahov et al., WO 2014/078484 A1 (2014) [2014b].  
Wang et al., *Chem. Biol. Drug. Des.* 2007, 70, 75.  
Wessjohann et al., documento US 2013/0217638 A1 (2013).  
Wipf et al., *Org. Lett.* 2004, 6 (22), 4057.  
55 Wipf et al., *Org. Lett.* 2007, 9 (8), 1605.  
Wipf et al., documento US 2010/0047841 A1 (2010).  
Zanda et al., documento US 8,580,820 B2 (2013).  
Zhao et al., documento WO 2014/009774 A1 (2014) [2014a].  
60 Zhao et al., documento WO 2014/080251 A1 (2014) [2014b].

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de tubulisina que tiene una estructura representada por la fórmula (I)

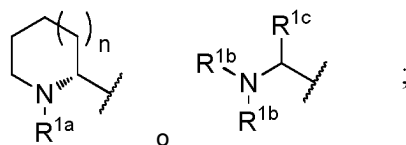


5

en donde

R<sup>1</sup> es

10



en donde

15

R<sup>1a</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, CO(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), CO(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) o CO(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>);  
 cada R<sup>1b</sup> es independientemente H o alquilo C<sub>1-3</sub>;  
 R<sup>1c</sup> es H, Me o CH(Me)<sub>2</sub>; y  
 n es 0, 1 o 2;

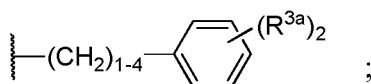
20

R<sup>2</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, arilo sin sustituir o sustituido, heteroarilo sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, cicloalifático sin sustituir o sustituido, heterocicloalifático sin sustituir o sustituido, arilalquilo sin sustituir o sustituido o alquilarilo sin sustituir o sustituido;

25

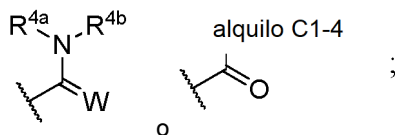
R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sin sustituir o sustituido, arilo sin sustituir o sustituido, heteroarilo sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>OC(=O)(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, C(=O)(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) sin sustituir o sustituido, cicloalifático sin sustituir o sustituido, heterocicloalifático sin sustituir o sustituido, arilalquilo sin sustituir o sustituido, alquilarilo sin sustituir o sustituido, o

35



40

en donde cada R<sup>3a</sup> es independientemente H, NH<sub>2</sub>, NHMe, Cl, F, Me, Et o CN;  
 R<sup>4</sup> es



45

en donde

R<sup>4a</sup> y R<sup>4b</sup> son independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>(cicloalquilo C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; y W es O o S;

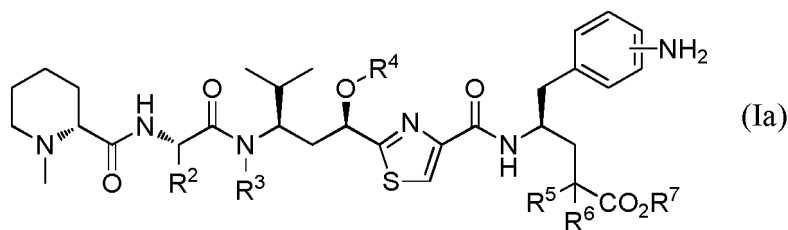
R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo;

R<sup>7</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y

Y es H, OH, Cl, F, CN, Me, Et, NO<sub>2</sub> o NH<sub>2</sub>;

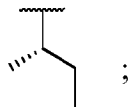
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. Un análogo de tubulisina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ia):



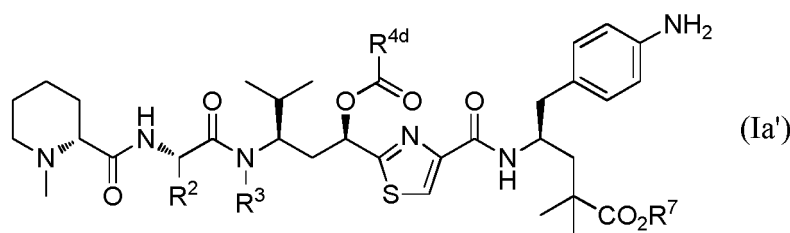
en donde

R<sup>2</sup> es Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



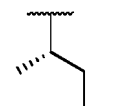
R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>; y R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son como se definen en la reivindicación 1.

3. Un análogo de tubulisina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ia')



en donde

R<sup>2</sup> es CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o

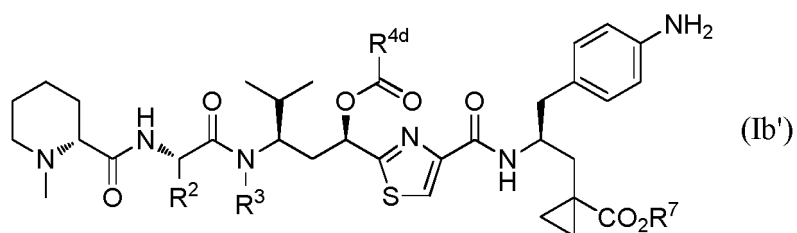


R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-5;

R<sup>4d</sup> es Me o NHMe; y

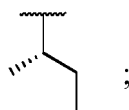
R<sup>7</sup> es H, Me o Et.

4. Un análogo de tubulisina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ib')



en donde

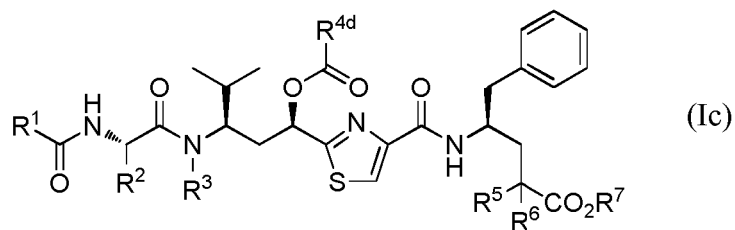
5  $R^2$  es  $\text{CH}(\text{Me})_2$ ,  $\text{CH}(\text{Et})_2$  o



10  $R^3$  es alquilo  $\text{C}_{1-5}$ ;  
 $R^{4d}$  es Me o NHMe; y  
 $R^7$  es H, Me o Et.

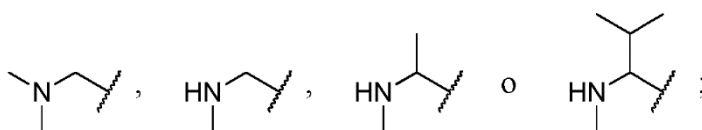
5. Un análogo de tubulisina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ic)

15

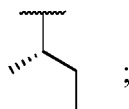


en donde

20  $R^1$  es



25  $R^2$  es  $\text{CH}(\text{Me})_2$ ,  $\text{CH}(\text{Et})_2$  o

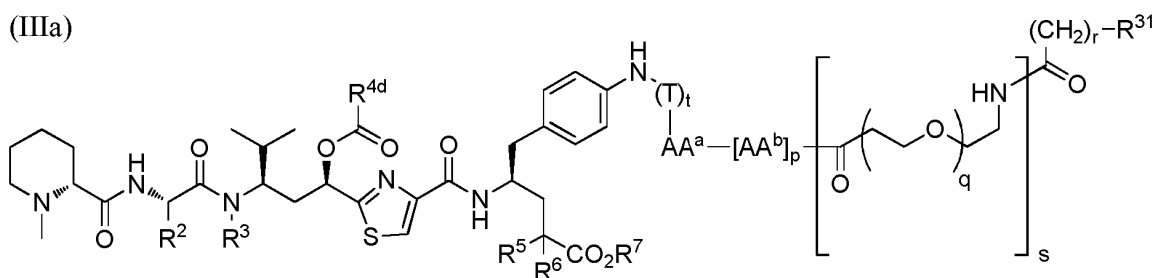


30  $R^3$  es alquilo  $\text{C}_{1-5}$ ;  
 $R^{4d}$  es Me o NHMe;  
 $R^5$  y  $R^6$  son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo; y  $R^7$  es H, Me o Et.

6. Un análogo de tubulisina de acuerdo con la reivindicación 4, en donde  $R^5$  y  $R^6$  son cada uno Me.

35 7. Un compuesto de enlace a análogo de tubulisina que tiene una estructura representada por la fórmula (IIIa):

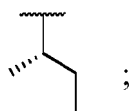
(IIIa)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;  
en donde

5

R<sup>2</sup> es Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



10

R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;

R<sup>4d</sup> es Me o NHMe;

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo;

15

R<sup>7</sup> es H, Me o Et;

T es un grupo autoinmolador;

t es 0 o 1;

20

AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

p es 1, 2, 3 o 4;

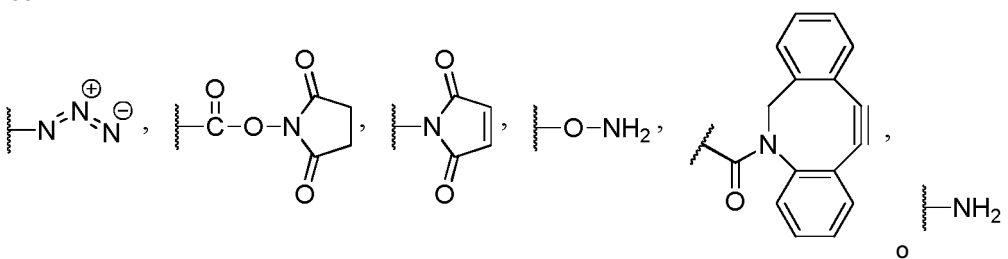
q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

25

r es 1, 2, 3, 4 o 5;

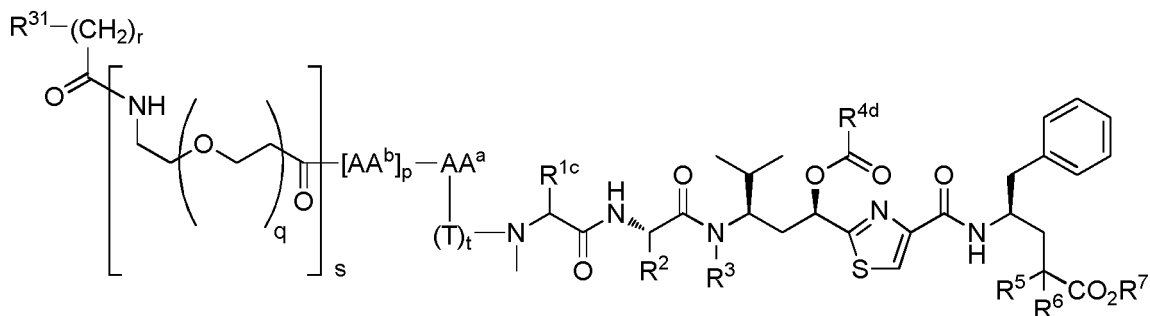
s es 0 o 1; y

R<sup>31</sup> es



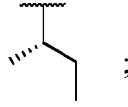
30

8. Un compuesto de enlace a análogo de tubulisina que tiene una estructura representada por la fórmula (IIIc):

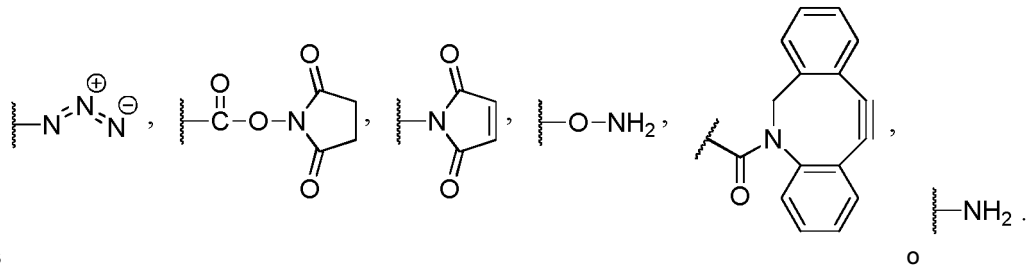


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 en donde

5  $R^{1c}$  es H, Me o  $CH(Me)_2$ ;  
 $R^2$  es Me, Et,  $CH_2CH_2CH_3$ ,  $CH(Me)_2$ ,  $CH(Et)_2$  o

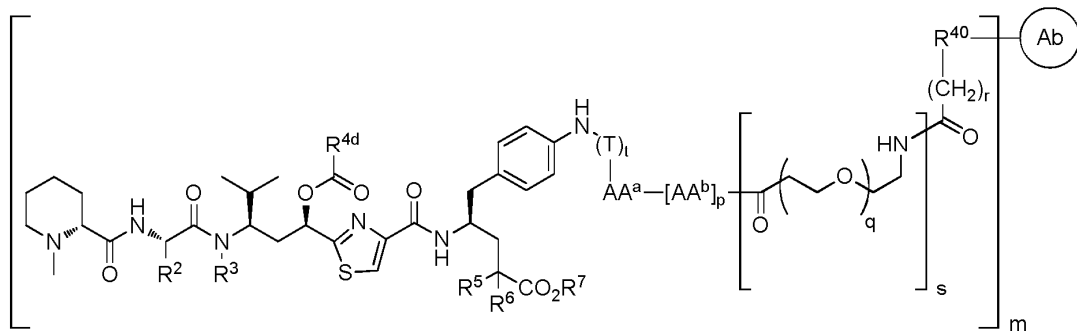


10  $R^3$  es H, alquilo  $C_1-C_5$ , alquenido  $C_1-C_5$ , alquinilo  $C_1-C_5$ ,  $CH_2OC(=O)$ alquilo  $C_1-C_5$ ,  $CH_2OC(=O)$ alquenido  $C_1-C_5$   
 o  $CH_2OC(=O)$ alquinilo  $C_1-C_5$ ;  
 $R^{4d}$  es Me o NHMe;  
 $R^5$  y  $R^6$  son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de  
 ciclopropilo;  
 $R^7$  es H, Me o Et;  
 15 C es un grupo autoinmolador;  
 c es 0 o 1;  
 $AA^a$  y cada  $AA^b$  se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina,  $\beta$ -alanina, ácido  
 $\gamma$ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido  
 20 glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina,  
 fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;  
 p es 1, 2, 3 o 4;  
 q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;  
 r es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 25 s es 0 o 1; y



9. Un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene una estructura representada por la fórmula (IIa):

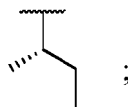
(IIa)



30

en donde

35  $R^2$  es Me, Et,  $CH_2CH_2CH_3$ ,  $CH(Me)_2$ ,  $CH(Et)_2$  o



R<sup>3</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquino C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;

R<sup>4d</sup> es Me o NHMe;

5 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo;

R<sup>7</sup> es H, Me o Et;

T es un grupo autoinmolador;

t es 0 o 1;

10 AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

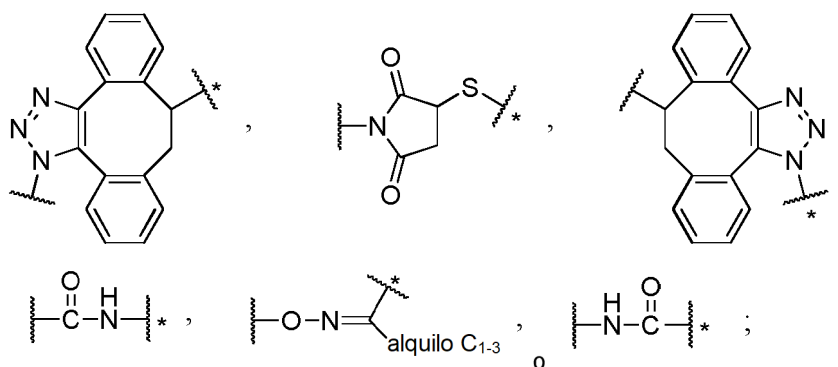
p es 1, 2, 3 o 4;

15 q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

r es 1, 2, 3, 4 o 5;

s es 0 o 1;

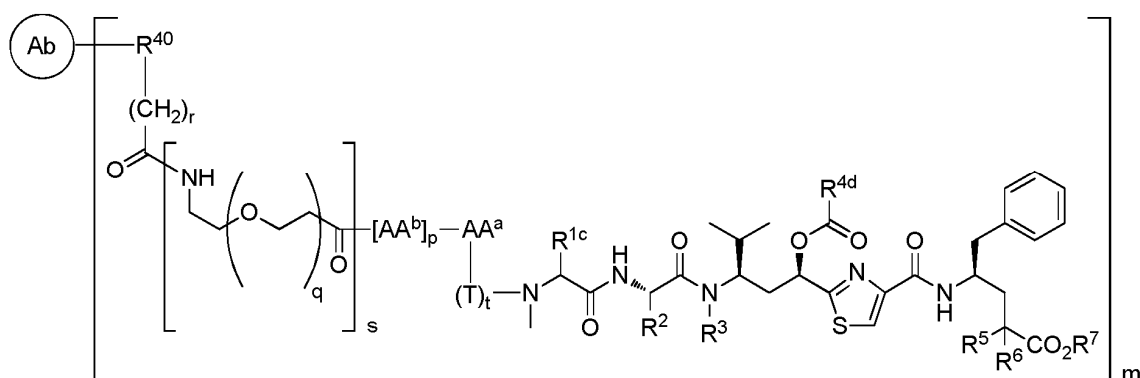
Ab es un anticuerpo;



25 donde la valencia abierta de R<sup>40</sup> que está unido a Ab se indica con un asterisco (\*); y m es 1, 2, 3 o 4.

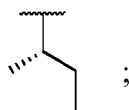
10. Un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene una estructura representada por la fórmula (IIc):

(IIc)

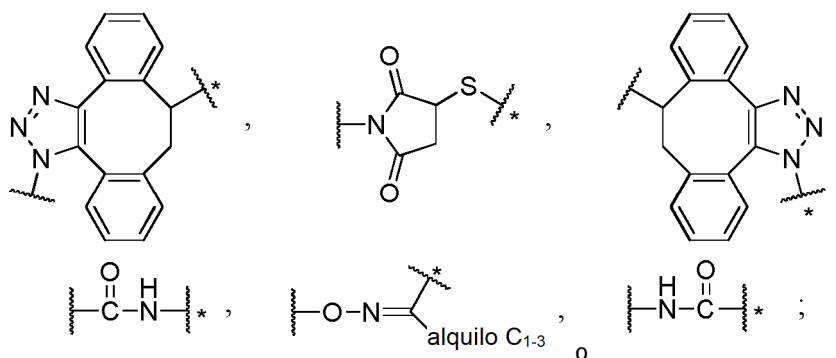


30 en donde

R<sup>2</sup> es Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(Me)<sub>2</sub>, CH(Et)<sub>2</sub> o



- 5  $R^3$  es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OC(=O)alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o CH<sub>2</sub>OC(=O)alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;  
 $R^{4d}$  es Me o NHMe;  
 $R^5$  y  $R^6$  son cada uno Me o se combinan con el carbono al que están unidos para formar un anillo de ciclopropilo;  
 $R^7$  es H, Me o Et;  
 T es un grupo autoinmolador;  
 10 t es 0 o 1;  
 AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;  
 15 p es 1, 2, 3 o 4;  
 q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;  
 r es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 s es 0 o 1;  
 20 Ab es un anticuerpo;  
 $R^{40}$  es

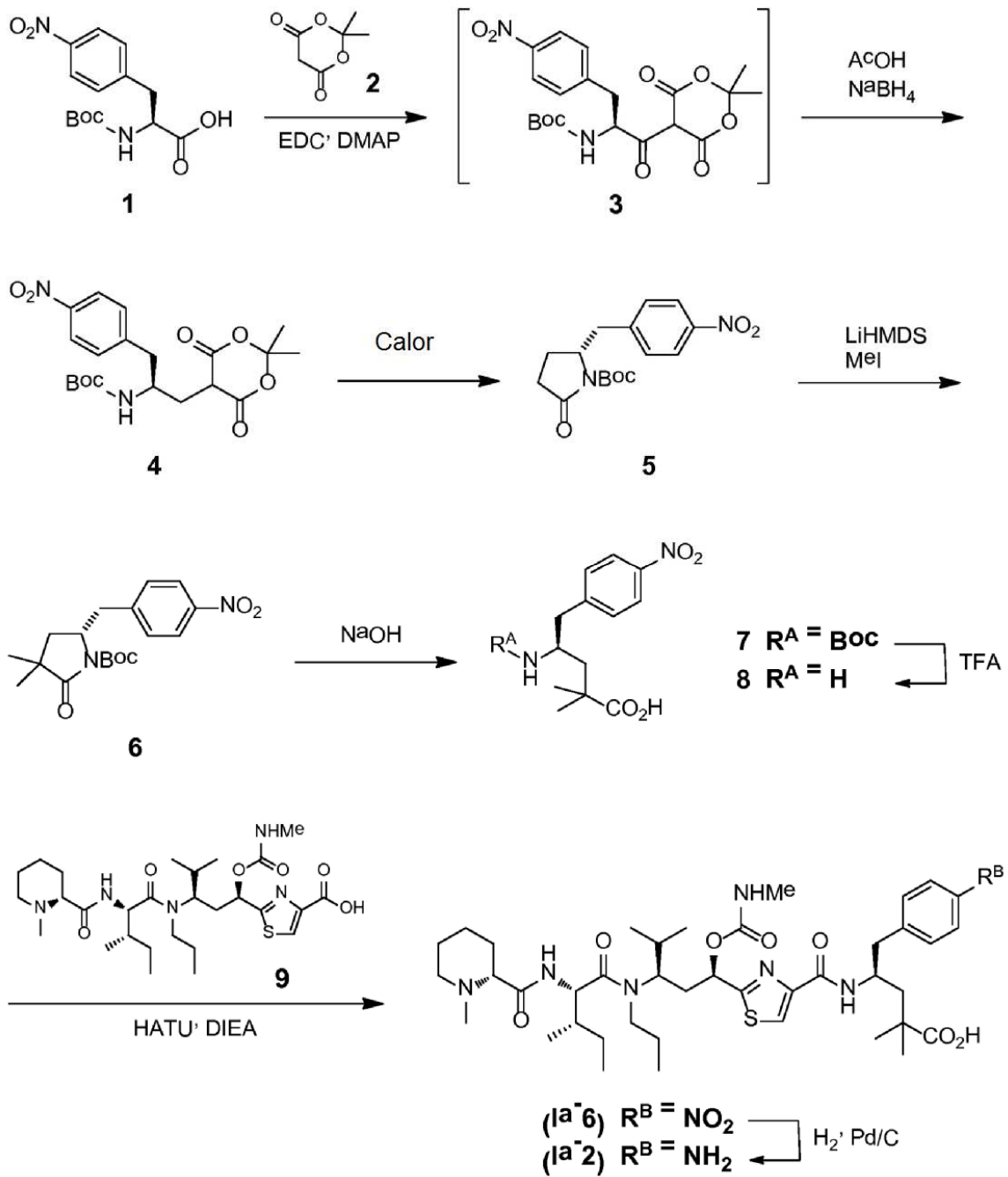


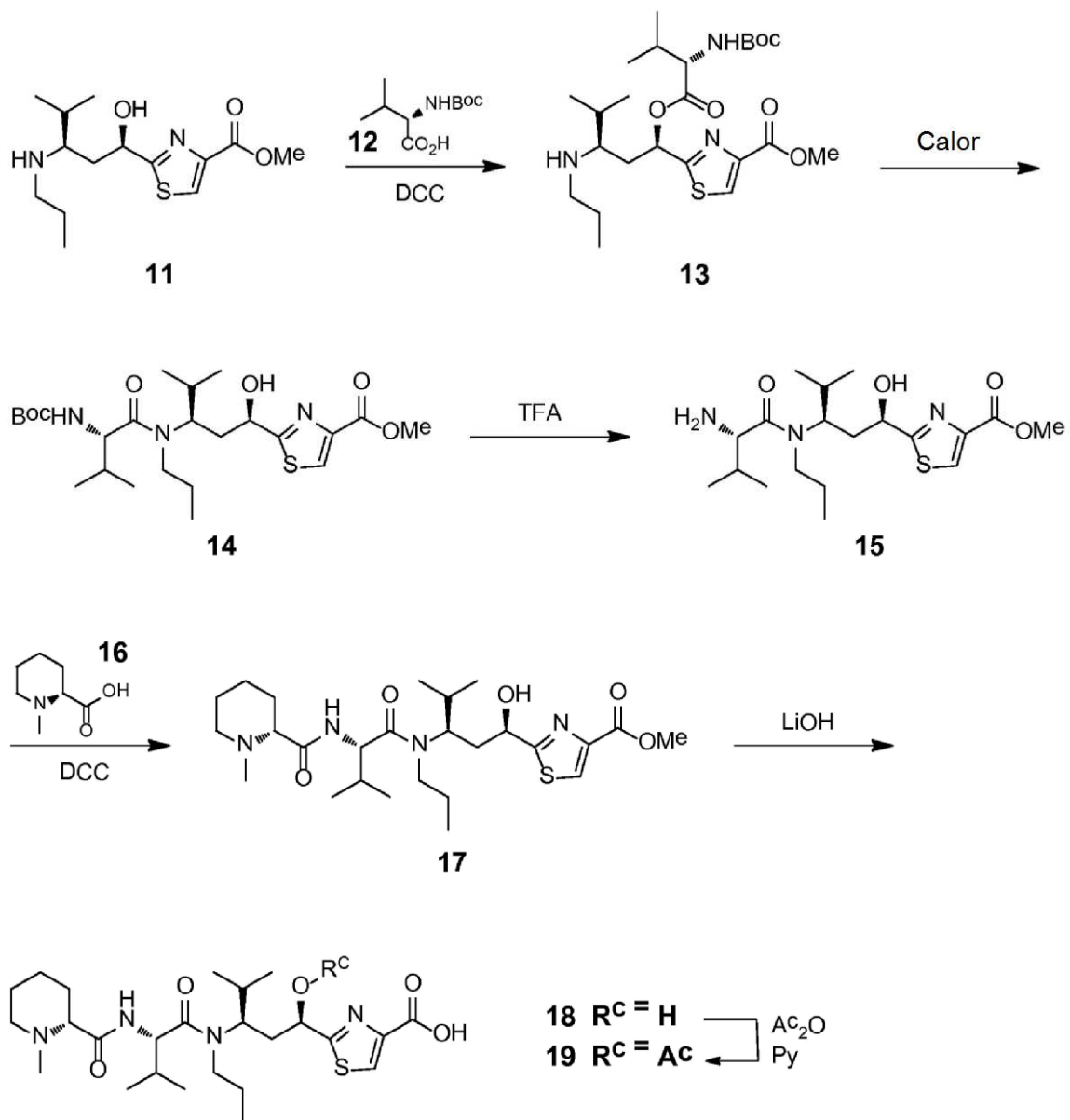
- 25 donde la valencia abierta de  $R^{40}$  que está unido a Ab se indica con un asterisco (\*); y  
 m es 1, 2, 3 o 4.

11. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 para su uso en un método para tratar el cáncer.
- 30 12. El conjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el cáncer es cáncer renal o gástrico.

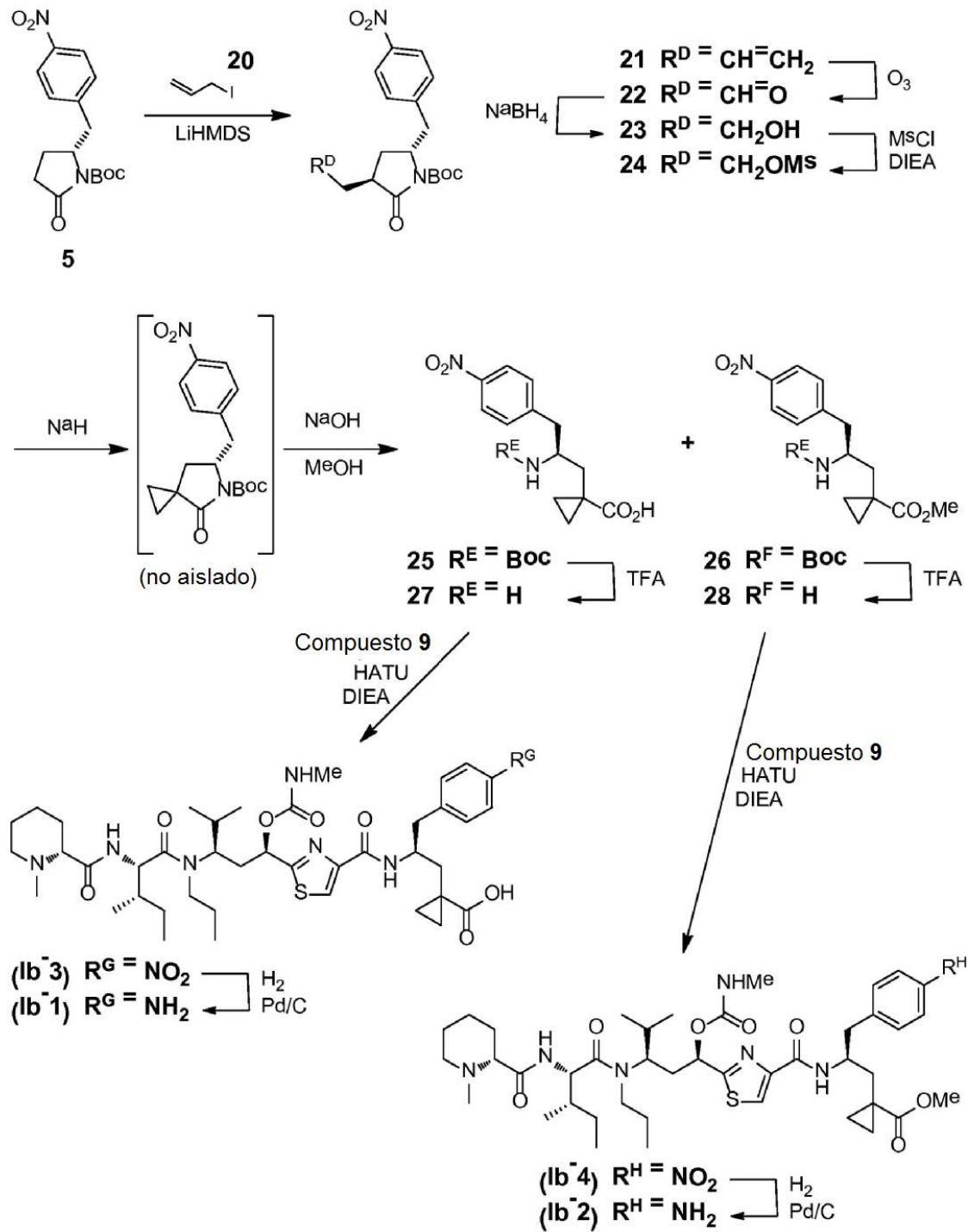


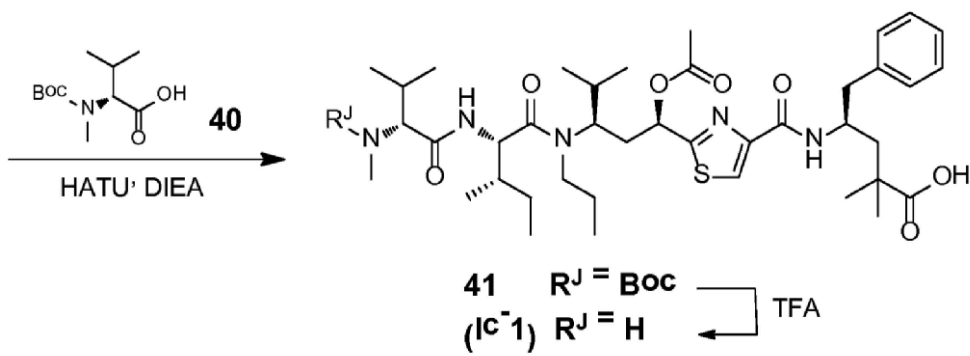
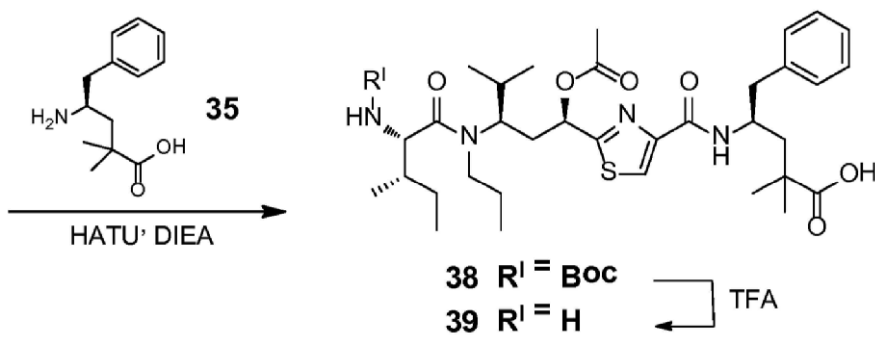
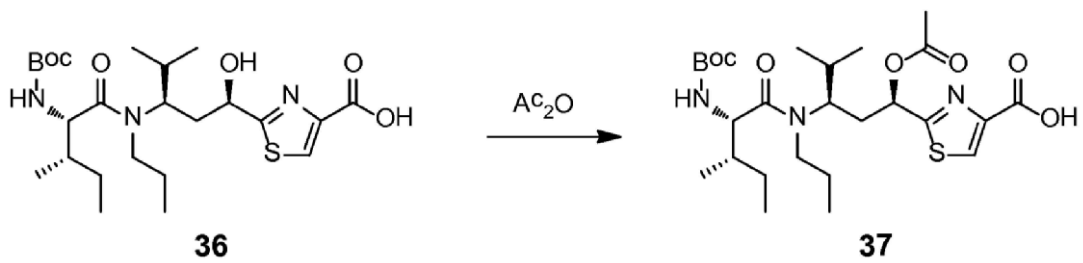
**Fig. 1**

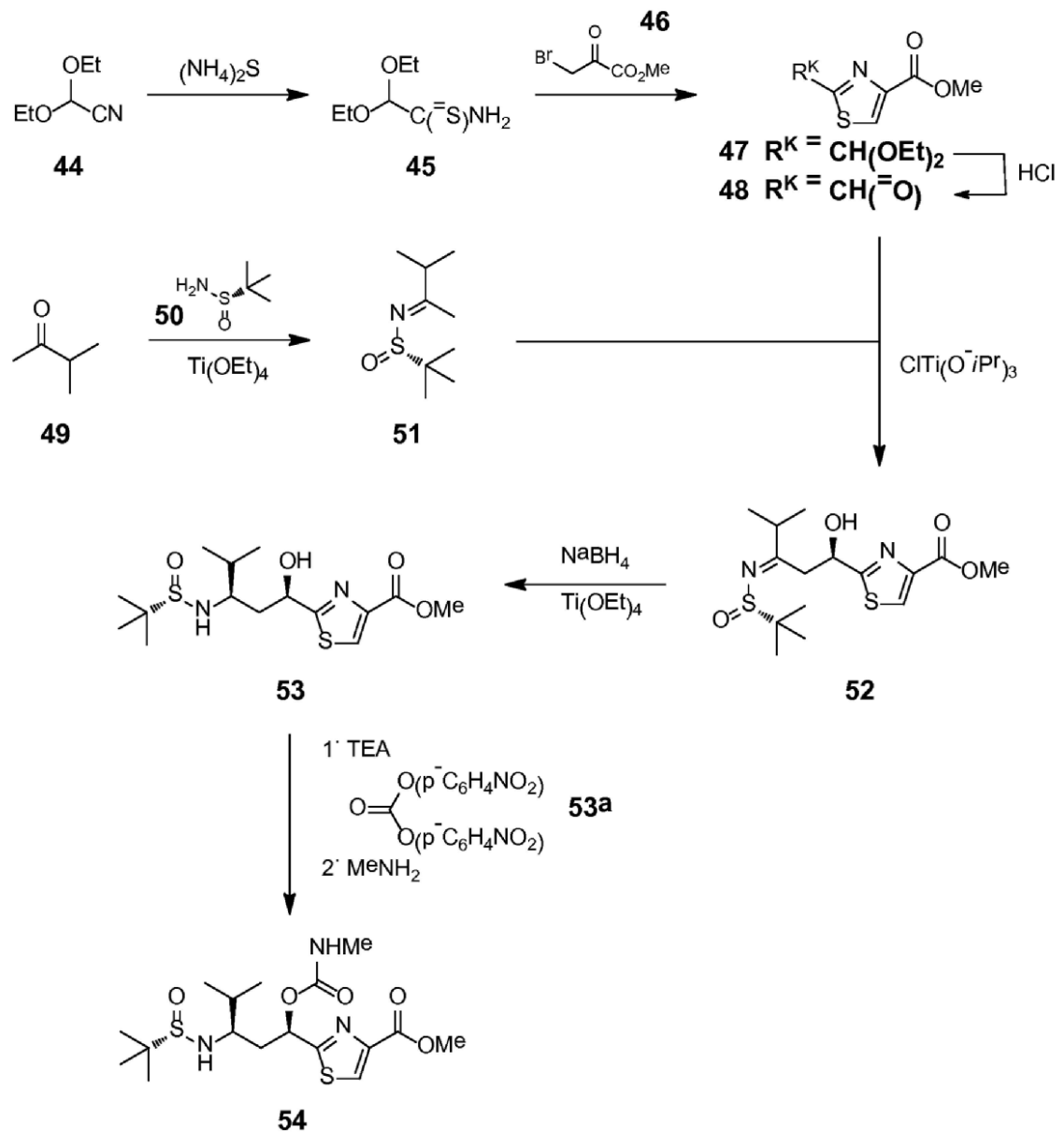


**Fig. 2**

**Fig. 3**



**Fig. 4**

**Fig. 5a**

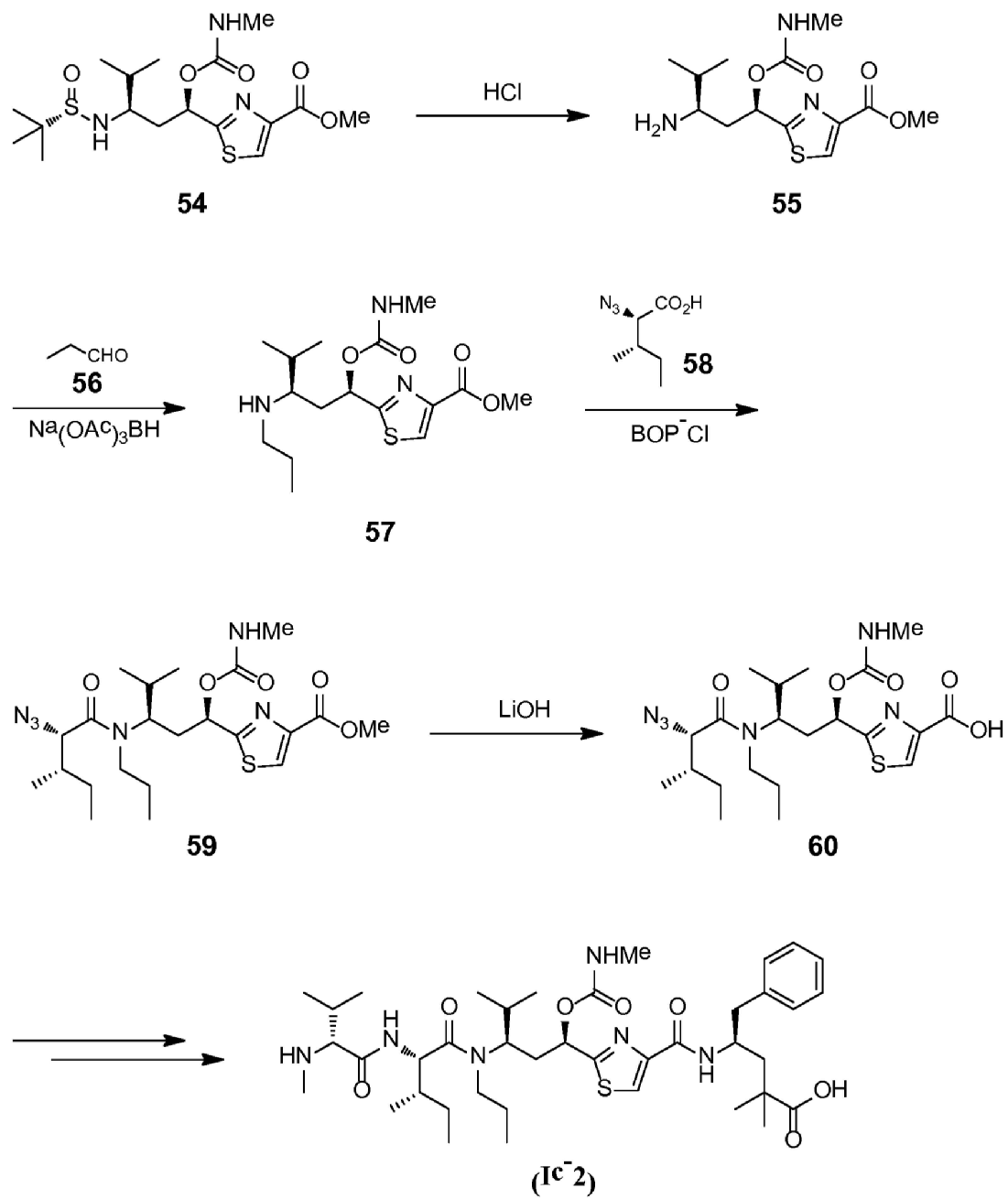
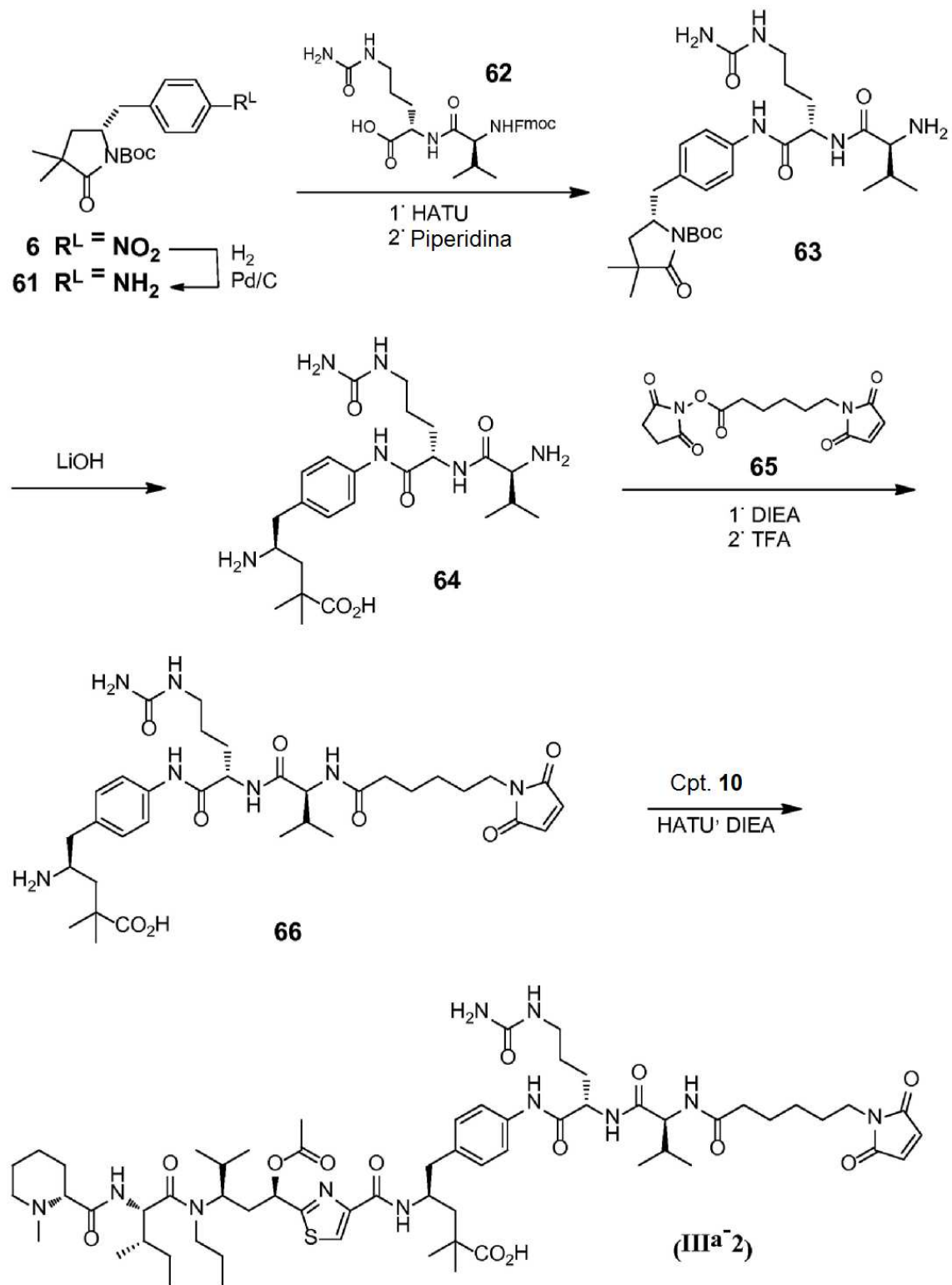
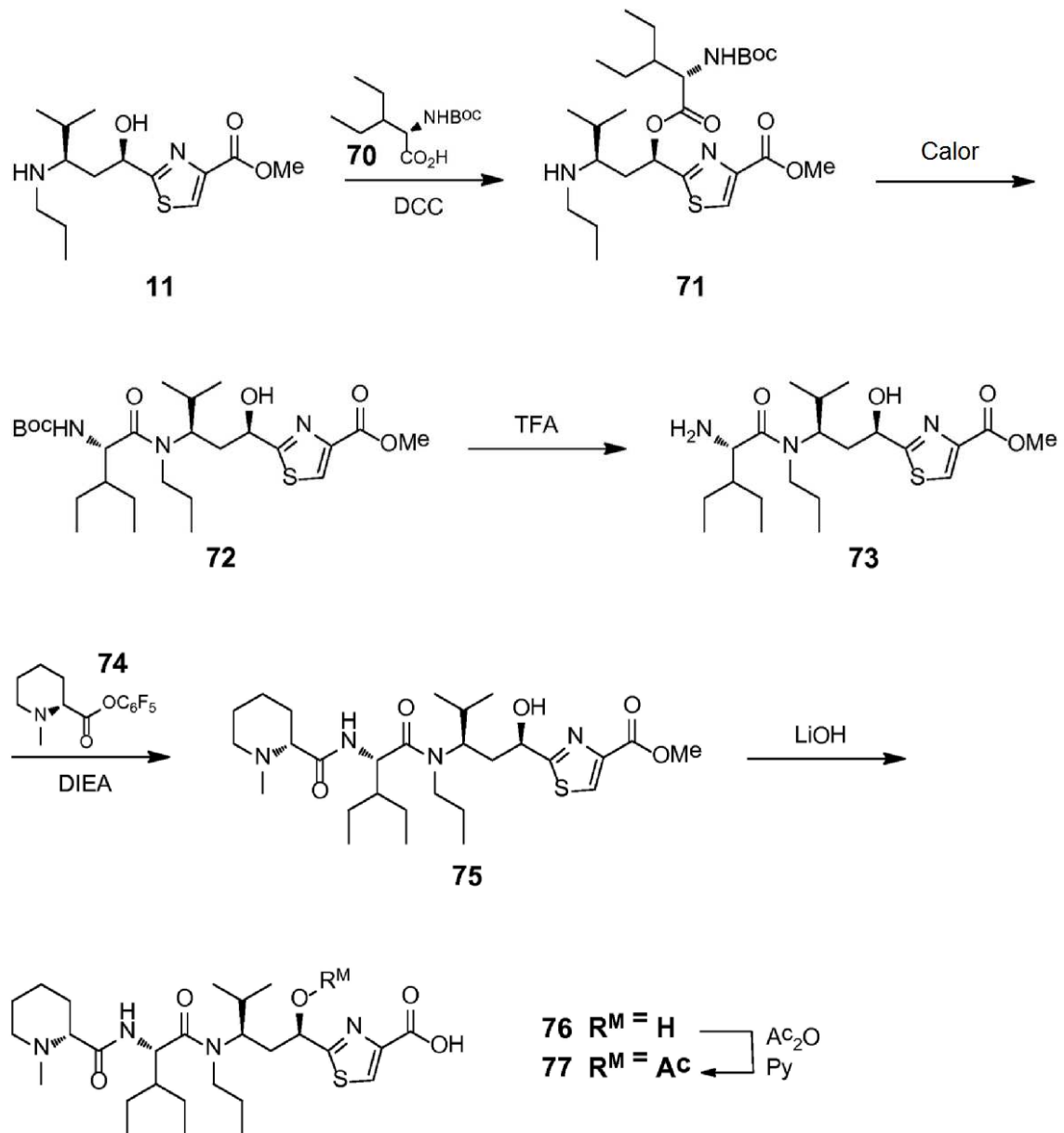
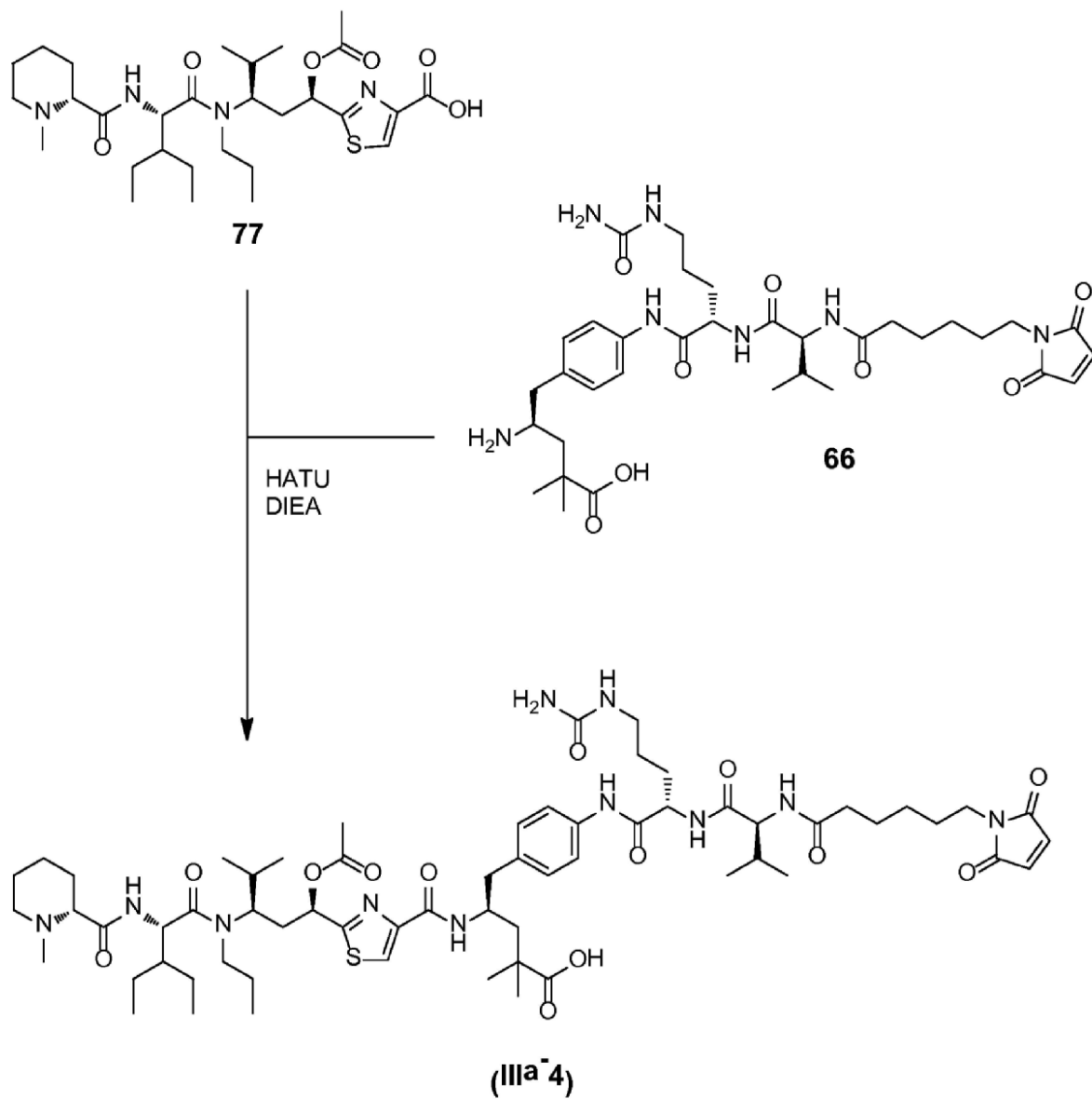
**Fig. 5b**

Fig. 6

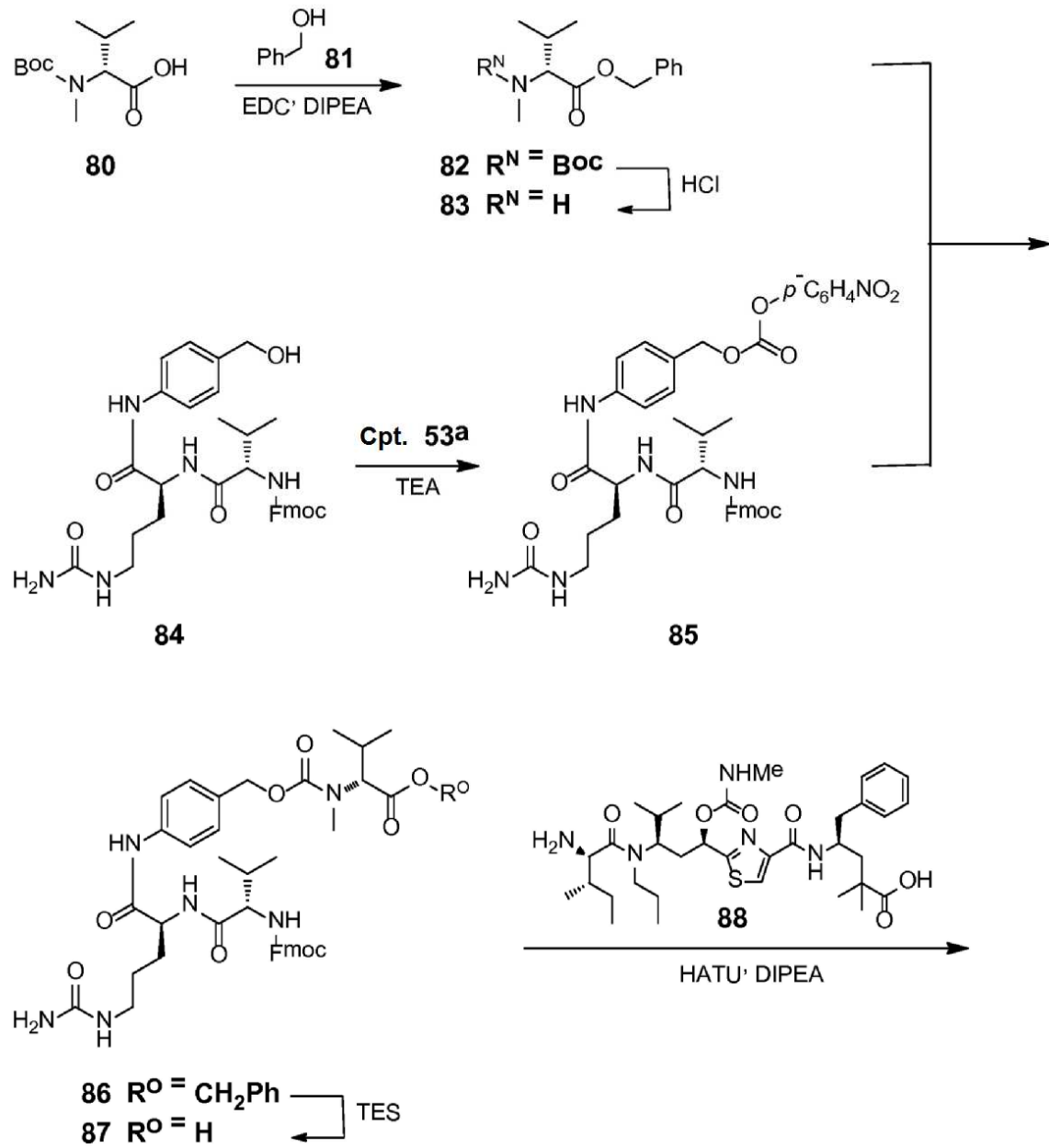


**Fig. 7a**



**Fig. 7b**

**Fig. 8a**



**Fig. 8b**