

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 878**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2017** **PCT/EP2017/075896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2018** **WO18069375**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2017** **E 17780446 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3525826**

54 Título: **Conectores autoinmolativos no lineales y conjugados de los mismos**

30 Prioridad:

11.10.2016 EP 16193337

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

28.04.2021

73 Titular/es:

BYONDIS B.V. (100.0%)

Microweg 22

6545 CM Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

ELGERSMA, RONALD CHRISTIAAN;

HUIJBREGTS, TIJL y

COUMANS, RUDY GERARDUS ELISABETH

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 821 878 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

Conectores autoinmolativos no lineales y conjugados de los mismos

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 [0001] La presente invención se refiere a compuestos conector-fármaco (LD) y conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un conector autoinmolativo no lineal escindible o transformable.

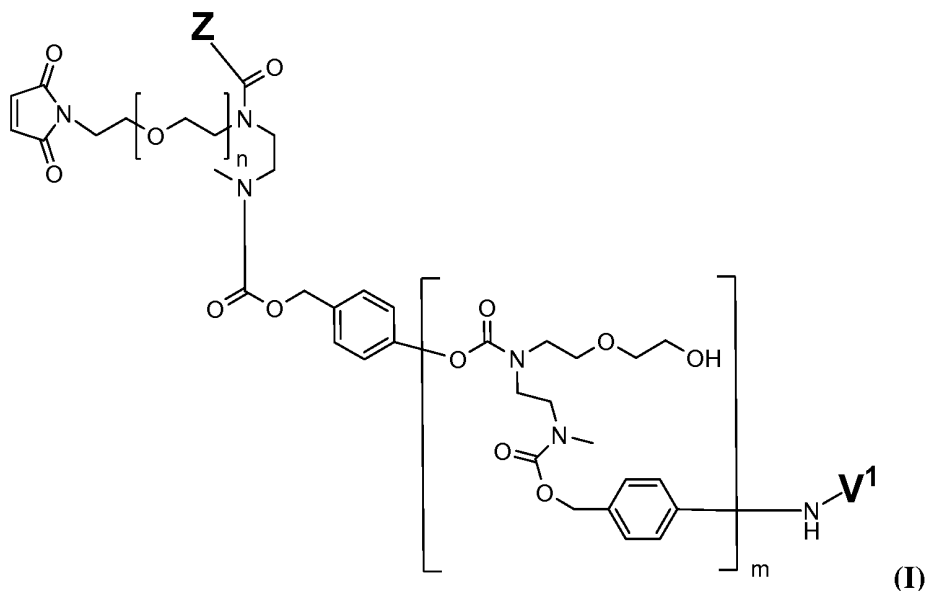
ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

- [0002] Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) son una clase emergente de tratamientos dirigidos, donde se combinan la especificidad de los anticuerpos y la potencia de las moléculas citotóxicas.
- 10 [0003] Además de la selección de la diana y el anticuerpo, los fármacos y los conectores han sido el foco del desarrollo de los ADC. Como resultado de ello, se han conjugado anticuerpos con una variedad de fármacos citotóxicos a través de conectores escindibles o no escindibles.
- [0004] Ejemplos de los ADC ya aprobados para el tratamiento de pacientes humanos son Mylotarg™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth) que comprende un anticuerpo anti-CD33 humanizado conjugado a través de un conector escindible hidrolizable por ácido a una caliqueamicina, que fue aprobado en el 2000 por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda; Adcetris™ (brentuximab vedotina, Seattle Genetics), un ADC que comprende un anticuerpo quimérico para CD30 conjugado a través de un conector escindible mediante enzimas con la monometil auristatina E (MMAE), que fue aprobado en 2011 por la FDA para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y el linfoma de células grandes anaplásicas; y Kadcyra™ (T-DM1, ado-trastuzumab emtansina o trastuzumab emtansina, Roche), un ADC donde un anticuerpo anti-HER2 humanizado está conjugado a través de un conector de tioéter no escindible con la mertansina (un derivado de la maitansina, también conocido como DM1), que fue aprobado por la FDA en febrero de 2013 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para HER2 que recibieron un tratamiento previo con trastuzumab y un taxano.
- 25 [0005] En comparación con los ADC con un conector escindible químicamente, los conectores escindibles mediante enzimas pueden conseguir un mejor control de la liberación del fármaco. Sin embargo, la mayor hidrofobicidad asociada de algunos conectores escindibles mediante enzimas puede conducir a la agregación del ADC, particularmente con fármacos fuertemente hidrofóbicos. Además, los ADC que son más hidrofóbicos se eliminan más rápidamente de la circulación en los modelos animales. Esta eliminación más rápida sugiere un inconveniente farmacocinético (PK) para tales ADC.
- 30 [0006] Como se describe en la WO2014/124316 (Novartis) y la WO2015/177360 (Synthon Biopharmaceuticals), la hidrofobicidad de un ADC se puede disminuir conjugando conectores-fármacos (hidrofóbicos) a residuos de cisteína modificados en ubicaciones específicas en las partes Fab y/o Fc tanto de las cadenas ligeras como pesadas de los anticuerpos. Cuando está conjugado con estos residuos de cisteína, el conector-fármaco está protegido del medio acuoso hidrófilo que rodea al anticuerpo, haciendo que el ADC sea menos hidrofóbico.
- 35 [0007] Alternativamente, la hidrofobicidad de un conector-fármaco y el ADC resultante se puede disminuir eligiendo un conector apropiado. Por ejemplo, Seattle Genetics en la WO2015/123679 usó un conector que comprende solo aminoácidos hidrófilos para mantener una hidrofiliidad del conjugado similar a la del anticuerpo no conjugado. En un enfoque alternativo, los grupos hidrosolubles tales como los polímeros de polietilenglicol se han incluido en conectores, por ejemplo, entre el fármaco y el sitio de unión de un anticuerpo, como en la WO2014/100762 (Bioalliance y Abgenomics) o en una posición paralela, como en la WO2015/057699 (Seattle Genetics). Un tercer enfoque para minimizar la hidrofobicidad ha sido añadir fármaco-polímeros a un anticuerpo, donde cada polímero contiene un gran número de fármacos, como en la WO2012/171020 (Mersana). Sin embargo, la adición de grupos de solubilización grandes aumenta la complejidad de fabricación de tales conjugados.
- 40 [0008] A pesar de los enfoques descritos anteriormente para reducir la hidrofobicidad de los conectores-fármacos y/o los ADC, hay una necesidad de nuevas estrategias para reducir dicha hidrofobicidad de los ADC con el objetivo de reducir (adicionalmente) la agregación del ADC y de superar los inconvenientes PK asociados.
- 45

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

[0009] La presente invención se refiere a compuestos conector-fármaco (LD) y conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un conector autoinmolativo no lineal, que es escindible o transformable bajo condiciones apropiadas y que reduce la hidrofobicidad del conjugado anticuerpo-fármaco.

5 [0010] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto conector-fármaco con la fórmula (I)



o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, donde

V¹ es una fracción escindible condicionalmente o transformable condicionalmente, que se puede escindir o transformar mediante un proceso químico, fotoquímico, físico, biológico o enzimático;

10 **Z** es un fármaco citotóxico que comprende un grupo hidroxilo fenólico a través del cual **Z** se une al conector, preferiblemente, **Z** es un derivado de duocarmicina o de dímero CBI, más preferiblemente **Z** es un derivado de duocarmicina;
 n es 0, 1, 2 o 3; y
 m es 0 o 1.

15 [0011] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende el compuesto conector-fármaco con la fórmula (I).

[0012] Otros aspectos de la presente invención incluyen composiciones farmacéuticas del compuesto conector-fármaco o el conjugado anticuerpo-fármaco y su uso como un medicamento, particularmente en el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias hematológicas humanos.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013]

Figura 1. Fórmulas estructurales de compuestos conector-fármaco.

Figura 2. Hidrofobicidad relativa de los ADC que comprenden conectores-fármacos no lineales de la invención frente a los ADC de comparación que comprenden vc-seco-DUBA lineal (compuesto conector-fármaco 1).

25 Figura 3A. Hidrofobicidad relativa de los ADC anti-PSMA de tipo salvaje y con cisteínas modificadas que comprenden conectores-fármacos no lineales de la invención frente a ADC anti-PSMA de comparación que comprenden vc-seco-DUBA lineal (compuesto conector-fármaco 1).

Figura 3B. Hidrofobicidad relativa de ADC anti-PSMA con cisteínas modificadas que comprenden conectores-fármacos no lineales de la invención o vc-seco-DUBA lineal (compuesto conector-fármaco 1) frente a un ADC de tipo salvaje anti-PSMA no modificado (PSMA) de comparación que comprende dichos conectores-fármacos.

Figura 3C. Delta en la hidrofobicidad relativa de ADC anti-PSMA de tipo salvaje y con cisteínas modificadas que comprenden conectores-fármacos no lineales de la invención o vc-seco-DUBA lineal (compuesto conector-fármaco 1) frente a un ADC de tipo salvaje anti-PSMA no modificado (PSMA) de comparación que comprende vc-seco-DUBA lineal (compuesto conector-fármaco 1).

Figura 4. Cromatograma HIC de ADC anti-PSMA con cisteínas modificadas que comprenden conectores-fármacos no lineales de la invención.

Figura 5. Eficacia *in vivo* de xenoinjerto de la línea celular LNCaP-C4.2 en ratones: ADC anti-PSMA con cisteínas modificadas (VH S41C) que comprenden los compuestos conector-fármaco 4, 7 u 8 frente al control de vehículo y el ADC anti-PSMA con cisteína modificada (VH S41C) de comparación que comprende vc-seco-DUBA lineal (compuesto conector-fármaco 1) después de una única inyección de 2 mg/kg (figura 5A) o 5 mg/kg (figura 5B) cada una.

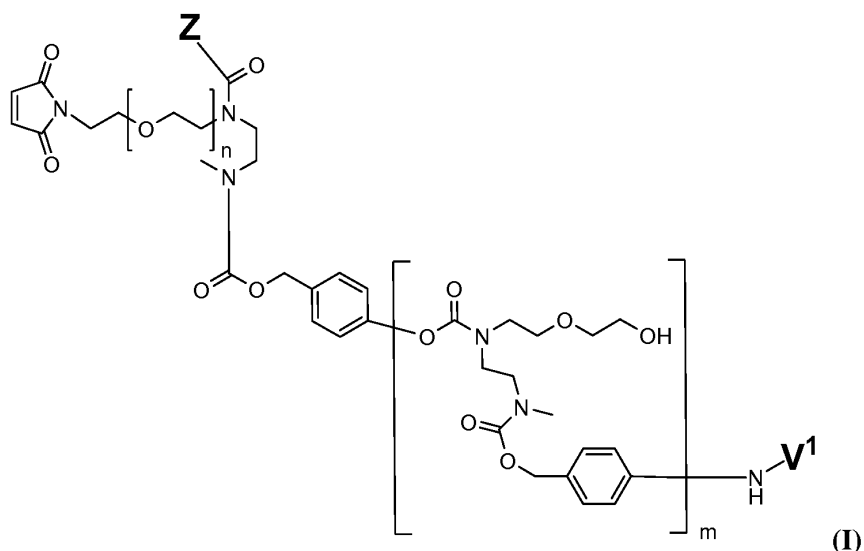
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

[0014] Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) están emergiendo como una nueva clase de tratamientos anticancerosos que combinan la eficacia de los tratamientos de molécula pequeña con la capacidad de dirección de los anticuerpos. Combinando estos dos componentes en una única entidad molecular nueva, se pueden administrar fármacos de molécula pequeña altamente citotóxicos a tejidos diana cancerosos, aumentando así la eficacia a la vez que se reducen los efectos secundarios tóxicos sistémicos potenciales de la molécula pequeña.

[0015] Los anticuerpos se han conjugado con una variedad de fármacos citotóxicos, incluidas moléculas pequeñas que se unen al ADN (por ejemplo antraciclinas), alquilan o se entrecruzan con el ADN (por ejemplo duocarmicinas o dímeros de CBI o pirrolobenzodiazepina, respectivamente), causan roturas de las cadenas de ADN (por ejemplo caliqueamicinas) o alteran los microtúbulos (por ejemplo maitansinoides, auristatinas y tubulisinan).

[0016] Los fármacos se pueden unir a un anticuerpo a través de compuestos específicos que conectan la cadena lateral de un residuo de aminoácido de un anticuerpo, por ejemplo la cadena lateral de un residuo de cisteína o lisina, y el fármaco. Este compuesto de conexión, es decir, conector, puede ser escindible, de modo que la liberación del fármaco se puede temporizar para que ocurra en una ubicación predeterminada, por ejemplo dentro de un lisosoma de una célula cancerosa, reduciendo así los efectos tóxicos sistémicos del fármaco.

[0017] La presente invención se refiere a un compuesto conector-fármaco, es decir, un conector-fármaco, con la fórmula (I) que comprende un conector autoinmolativo no lineal



o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

V¹ es una fracción escindible condicionalmente o transformable condicionalmente.

Z es un fármaco citotóxico que comprende un grupo hidroxilo fenólico a través del cual Z se une al conector.

[0018] Cada m y n son independientemente 0 o un número entero positivo.

[0019] La fracción de maleimida se usa para la conjugación del conector-fármaco con un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

[0020] Un conector autoinmolativo se puede definir como una fracción química o bioquímica bifuncional que es capaz de conectar de manera covalente dos fracciones químicas separadas en una molécula tripartita normalmente estable. Puede liberar de la molécula tripartita una de las fracciones químicas separadas por medio de, por ejemplo, una escisión enzimática; y tras dicha escisión enzimática, puede escindirse de forma espontánea del resto de la molécula para liberar la otra de las fracciones químicas separadas. Un conector se considera no lineal cuando el sitio para la escisión (enzimática) no está entre la primera fracción química y el sitio de unión de la segunda fracción química, a diferencia de un conector lineal.

[0021] La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que determinadas combinaciones de conectores y fármacos citotóxicos se pueden usar para preparar ADC que tienen una hidrofobicidad similar a la del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno no conjugado (desnudo). Diseñando conjugados para obtener una hidrofobicidad similar a la del anticuerpo no conjugado, se pueden mantener determinadas características deseables del anticuerpo desnudo, tal como un perfil farmacocinético favorable *in vivo*, incluidas la eliminación *in vivo* reducida y/o la exposición aumentada de la(s) célula(s) diana. Ventajosamente, tales conjugados se pueden diseñar para tener una hidrofobicidad similar a la del anticuerpo desnudo sin la necesidad de incluir grupos de solubilización adicionales, tal como polietilenglicol u otros polímeros hidrosolubles.

[0022] El conector autoinmolativo no lineal en el compuesto con la fórmula (I) está diseñado para reducir la hidrofobicidad de los ADC. Los presentes inventores han descubierto que, disminuyendo el número de átomos en el conector entre el fármaco citotóxico y el sitio de unión del anticuerpo, la hidrofobicidad del ADC también se reduce proporcionalmente.

[0023] Sin desear quedar limitado por ninguna teoría, los presentes inventores piensan que, a través de una disposición en el conector de la invención que conduzca a una distancia más corta entre el fármaco hidrofóbico y el anticuerpo, el fármaco está protegido por el anticuerpo del medio acuoso hidrófilo que rodea al anticuerpo, haciendo que el ADC sea menos hidrofóbico.

[0024] El conector permite la liberación eficiente del fármaco citotóxico en o dentro de las células diana, lo suficiente para inducir citotoxicidad o un efecto citostático. Típicamente, los conectores están diseñados para la liberación eficiente del fármaco una vez el conjugado ha sido interiorizado por las células diana.

[0025] V^1 es una fracción escindible condicionalmente o transformable condicionalmente que se puede escindir o transformar mediante un proceso químico, fotoquímico, físico, biológico o enzimático. En otras palabras, está diseñada para ser transformada y/o escindida mediante un proceso químico, fotoquímico, físico, biológico o enzimático después de ser llevada a o bajo una cierta condición. Esta condición puede ser, por ejemplo, poner un compuesto de la invención en un medio acuoso, lo que lleva a la hidrólisis de V^1 , o poner un compuesto de la invención en un entorno que contenga una enzima que reconoce y escinde V^1 o poner un compuesto de la invención bajo condiciones reductoras, lo que lleva a la reducción y/o la eliminación de V^1 , o poner un compuesto de la invención bajo condiciones oxidantes, lo que lleva a la oxidación y/o la eliminación de V^1 , o poner un compuesto de la invención en contacto con radiación, por ejemplo, luz UV, lo que lleva a la transformación y/o la escisión, o poner un compuesto de la invención en contacto con calor, lo que lleva a la transformación y/o la escisión, o poner un compuesto de la invención bajo presión reducida, lo que lleva a la transformación, por ejemplo, una retrocicloaddición, y/o la escisión, o poner un compuesto de la invención bajo presión elevada o alta, lo que lleva a la transformación y/o la escisión. Esta condición se puede cumplir después de administrar un compuesto de esta invención a un mamífero, por ejemplo un humano.

[0026] Preferiblemente, V^1 es una fracción escindible condicionalmente. Más preferiblemente, V^1 es una fracción escindible mediante enzimas.

[0027] Sitios de reconocimiento adecuados para la liberación del fármaco por escisión son aquellos que permiten la separación eficiente del fármaco del conector. Preferiblemente, el sitio de reconocimiento es un sitio de escisión peptídico. Ejemplos de sitios de escisión peptídicos incluyen aquellos reconocidos por proteasas intracelulares, tales como los presentes en los lisosomas.

[0028] En una forma de realización, V^1 es un péptido.

[0029] En una forma de realización preferida, V^1 es un di-, tri- o tetrapéptido, es decir, un péptido compuesto por dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, reconocible y escindible por una enzima proteolítica (proteasa), por ejemplo plasmina, una cathepsina, cathepsina B, antígeno prostático específico (PSA), activador del plasminógeno

de tipo uroquinasa (u-PA) o un miembro de la familia de las metaloproteinasas de la matriz, presente en la proximidad o dentro de las células diana, por ejemplo células tumorales. Péptidos adecuados para **V**¹ incluyen, sin limitación, alanil-fenil-alanil-lisina, valil-leucil-lisina, alanil-leucil-lisina, valil-fenil-alanil-lisina, valil-triptofanil-lisina, alanil-triptofanil-lisina, alanil-fenil-alanil-citrulina, valil-leucil-citrulina, alanil-leucil-citrulina, valil-fenil-alanil-citrulina, valil-triptofanil-citrulina, alanil-triptofanil-citrulina, fenil-alanil-lisina, valil-lisina, valilalanina, glicil-fenil-alanil-lisina, alanil-lisina, valilcitrulina, fenil-alanil-citrulina, isoleucil-citrulina, triptofanil-lisina, triptofanilcitrulina, fenil-alanil-arginina, fenil-alanil-alanina, alanil-leucil-alanil-leucina, alanil-arginil-arginina, leucil-lisina y leucilcitrulina. Preferiblemente, **V**¹ se selecciona de entre valilalanina, valil-lisina, valilcitrulina, fenil-alanil-lisina y alanil-fenil-alanil-lisina. Más preferiblemente, **V**¹ se selecciona de entre valilcitrulina y valilalanina.

[0030] **V**¹ se une al conector no lineal a través de su lado C-terminal, dejando el lado N-terminal expuesto. Opcionalmente, el lado N-terminal de **V**¹ está cubierto por un grupo de bloqueo de amina. Ejemplos adecuados de grupos de bloqueo de amina incluyen alquilo C₁-C₆, acilo C₁-C₈, (alcoxi)carbonilo (por ejemplo, t-butoxicarbonilo, conocido como Boc), (aril alcoxi)carbonilo (por ejemplo, benciloxycarbonilo o carbobencilo, conocido como Cbz) y 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, conocido como Fmoc).

[0031] En una forma de realización, el lado N-terminal de **V**¹ está cubierto por un grupo hidrosoluble, tal como un oligómero lineal de polietilenglicol (PEG). Preferiblemente, el oligómero lineal de PEG contiene de 1 a 20 fracciones de etilenglicol, más preferiblemente de 3 a 10, aún más preferiblemente de 5 a 7.

[0032] **Z** es un fármaco citotóxico que comprende un grupo hidroxilo fenólico a través del cual **Z** se une al conector. Preferiblemente, **Z** es un derivado de duocarmicina o de dímero CBI. Más preferiblemente, **Z** es un derivado de duocarmicina.

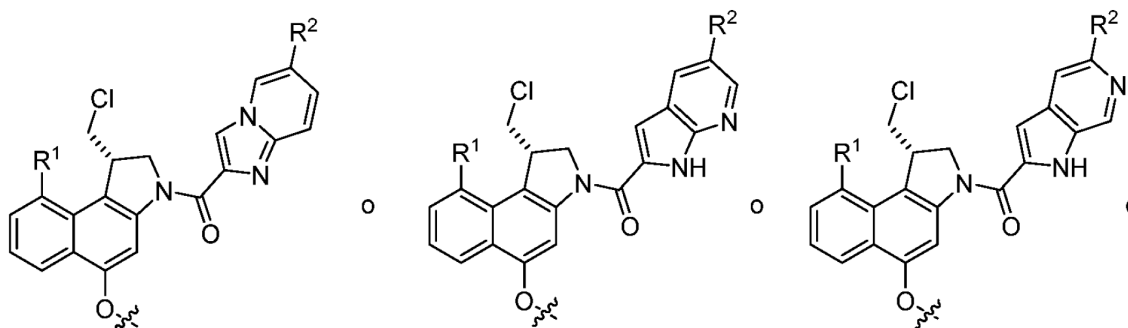
[0033] Las duocarmicinas, una clase de toxinas relacionadas estructuralmente aisladas por primera vez de un caldo de cultivo de la especie *Streptomyces*, son miembros de una familia de antibióticos antitumorales que incluyen la duocarmicina A, la duocarmicina SA y CC-1065.

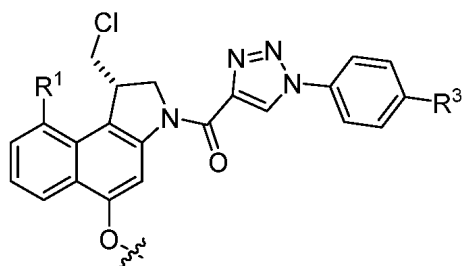
[0034] Las duocarmicinas se unen al surco menor del ADN y causan posteriormente la alquilación irreversible del ADN. Esto altera la arquitectura del ácido nucleico, lo que lleva finalmente a la muerte de las células tumorales.

[0035] La WO2010/062171 divulga una serie de análogos novedosos del agente alquilante de ADN CC-1065. Estos derivados de duocarmicina son adecuados para el uso conforme a la presente invención. La síntesis química de varios de estos fármacos se describe en los ejemplos 1-22 de la WO2010/062171.

[0036] Los dímeros de CBI (dímeros de 1,2,9,9a-tetrahidrociclopropa[c]benc[e]indol-4-ona) son también parte del grupo de los antibióticos altamente tóxicos originados a partir de CC-1065, pero, mientras que las duocarmicinas causan la alquilación del ADN, los dímeros de CBI relacionados estructuralmente causan la reticulación intercatenaria del ADN, conduciendo así a la muerte celular.

[0037] En una forma de realización de la presente invención, **Z** es





donde R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de entre H, OH, SH, NH_2 , N_3 , NO_2 , NO, CF_3 , CN, $C(O)NH_2$, $C(O)H$, $C(O)OH$, halógeno, R^a , SR^a , $S(O)R^a$, $S(O)_2R^a$, $S(O)OR^a$, $S(O)_2OR^a$, $OS(O)R^a$, $OS(O)_2R^a$, $OS(O)OR^a$, $OS(O)_2OR^a$, OR^a , NHR^a , $N(R^a)R^b$, $^+N(R^a)(R^b)R^c$, $P(O)(OR^a)(OR^b)$, $OP(O)(OR^a)(OR^b)$, $SiR^aR^bR^c$, $C(O)R^a$, $C(O)OR^a$, $C(O)N(R^a)R^b$, $OC(O)R^a$, $OC(O)OR^a$, $OC(O)N(R^a)R^b$, $N(R^a)C(O)R^b$, $N(R^a)C(O)OR^b$, $N(R^a)C(O)N(R^b)R^c$ y un grupo hidrosoluble, donde R^a , R^b y R^c se seleccionan independientemente de entre H y $(CH_2CH_2O)_{aa}CH_2CH_2X^1R^{a1}$, alquilo C_{1-15} , heteroalquilo C_{1-15} , cicloalquilo C_{3-15} , heterocicloalquilo C_{1-15} , arilo C_{5-15} o heteroarilo C_{1-15} opcionalmente sustituidos, donde aa se selecciona de 1 a 1000, X^1 se selecciona de entre O, S y NR^{b1} , y R^{b1} y R^{a1} se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C_{1-3} , donde uno o más de los sustituyentes opcionales en R^a , R^b y/o R^c son opcionalmente un grupo hidrosoluble, donde dos o más de R^a , R^b y R^c están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos.

[0038] El término "grupo hidrosoluble" se refiere a un grupo funcional que se disuelve bien en ambientes acuosos y que imparte una mejor solubilidad en agua al compuesto al que está unido. Ejemplos de grupos hidrosolubles incluyen, pero de forma no limitativa, polialcoholes, sacáridos de cadena lineal o cíclicos, aminas y poliaminas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias, grupos sulfato, grupos sulfonato, grupos sulfinato, grupos carboxilato, grupos fosfato, grupos fosfonato, grupos fosfinato, grupos ascorbato, glicoles, incluidos los polietilenglicoles, y poliéteres. Grupos hidrosolubles preferidos son aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, carboxilatos, fosfonatos, fosfatos, sulfonatos, sulfatos, $-(CH_2CH_2O)_{yy}CH_2CH_2X^2R^{yy}$, $-(CH_2CH_2O)_{yy}CH_2CH_2X^2-$, $-X^2(CH_2CH_2O)_{yy}CH_2CH_2-$, glicol, oligoetilenglicol y polietilenglicol, donde yy se selecciona de 1 a 1000, X^2 se selecciona de entre O, S y NR^{zz} , y R^{zz} y R^{yy} se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C_{1-3} .

[0039] El término "sustituido", cuando se usa como un adjetivo de "alquilo", "heteroalquilo", "cicloalquilo", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo" o similar, indica que dicho "alquilo", "heteroalquilo", "cicloalquilo", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo" o grupo similar contiene uno o más sustituyentes (introducidos mediante la sustitución de hidrógeno). Los sustituyentes ejemplares incluyen, pero de forma no limitativa, OH, =O, =S, = NR^d , =N- OR^d , SH, NH_2 , NO_2 , NO, N_3 , CF_3 , CN, OCN, SCN, NCO, NCS, $C(O)NH_2$, $C(O)H$, $C(O)OH$, halógeno, R^d , SR^d , $S(O)R^d$, $S(O)OR^d$, $S(O)_2R^d$, $S(O)_2OR^d$, $OS(O)R^d$, $OS(O)OR^d$, $OS(O)_2R^d$, $OS(O)_2OR^d$, $S(O)N(R^d)R^e$, $OS(O)N(R^d)R^e$, $S(O)_2N(R^d)R^e$, $OS(O)_2N(R^d)R^e$, $OP(O)(OR^d)(OR^e)$, $P(O)(OR^d)(OR^e)$, OR^d , NHR^d , $N(R^d)R^e$, $^+N(R^d)(R^e)R^f$, $Si(R^d)(R^e)(R^f)$, $C(O)R^d$, $C(O)OR^d$, $C(O)N(R^d)R^e$, $OC(O)R^d$, $OC(O)OR^d$, $OC(O)N(R^d)R^e$, $N(R^d)C(O)R^e$, $N(R^d)C(O)OR^e$, $N(R^d)C(O)N(R^e)R^f$, un grupo hidrosoluble y los derivados tio de estos sustituyentes y las formas protonadas, cargadas y desprotonadas de cualquiera de estos sustituyentes, donde R^d , R^e y R^f se seleccionan independientemente de entre H y $-(CH_2CH_2O)_{yy}CH_2CH_2X^2R^{yy}$, alquilo C_{1-15} , heteroalquilo C_{1-15} , cicloalquilo C_{3-15} , heterocicloalquilo C_{1-15} , arilo C_{5-15} o heteroarilo C_{1-15} opcionalmente sustituidos, o una combinación de los mismos, donde yy se selecciona de 1 a 1000, X^2 se selecciona independientemente de entre O, S y NR^{zz} , y R^{zz} y R^{yy} se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C_{1-3} , dos o más de R^d , R^e y R^f están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos. Cuando hay más de un sustituyente, cada sustituyente se selecciona independientemente. Dos o más sustituyentes pueden conectarse entre sí por sustitución de uno o más átomos de hidrógeno en cada uno de los sustituyentes por uno o más enlaces de conexión, que pueden ser enlaces simples, dobles o triples, o, si son posibles las estructuras de resonancia, el orden de enlace de dichos enlaces puede ser diferente en dos o más de estas estructuras de resonancia. Dos sustituyentes pueden así unirse con la formación de uno o más anillos.

[0040] Cuando los sustituyentes pueden estar "opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos", esto significa que los sustituyentes se pueden conectar entre sí a través de la sustitución de uno o más átomos de hidrógeno en cada uno de los sustituyentes por uno o más enlaces de conexión.

[0041] El término "arilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente aromático carbocíclico que comprende de 5 a 24 átomos de carbono de anillo, que puede ser cargado o sin carga y que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero de forma no limitativa, fenilo, naftilo y antracenilo.

[0042] El término "heteroarilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente aromático heterocíclico que comprende de 1 a 24 átomos de carbono de anillo y al menos un heteroátomo de anillo, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio o fósforo, donde el nitrógeno y el azufre pueden opcionalmente estar oxidados y el nitrógeno puede opcionalmente estar cuaternizado, lo que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados. Los heteroátomos pueden estar conectados directamente entre sí. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero de forma no limitativa, piridinilo, pirimidilo, furanilo, pirrolilo, triazolilo, pirazolilo, pirazinilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, tienilo, indolilo, benzofuranilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, indazolilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, quinoxalinilo, isoquinolilo y quinolilo. En una forma de realización, un grupo heteroarilo comprende de 1 a 4 heteroátomos. Debe observarse que "grupo heteroarilo C₁" denota que solo hay un carbono presente en el sistema de anillos del grupo heteroaromático (así, los átomos de carbono en los sustituyentes opcionales no se cuentan). Un ejemplo de dicho grupo heteroaromático es un grupo tetrazolilo.

[0043] Los grupos "arilo" y "heteroarilo" abarcan también sistemas de anillos donde uno o más anillos no aromáticos están fusionados a un anillo o sistema de anillos de arilo o heteroarilo.

[0044] El término "alquilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero de forma no limitativa, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, octilo, decilo, isopropilo, sec-butilo, isobutilo, *tert*-butilo, isopentilo, 2-metilbutilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo y 1-butenilo.

[0045] El término "heteroalquilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, donde al menos un átomo de carbono se sustituye por un heteroátomo, por ejemplo, por oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio o fósforo, donde el nitrógeno y el azufre pueden opcionalmente estar oxidados y el nitrógeno puede opcionalmente estar cuaternizado. Los heteroátomos pueden estar conectados directamente entre sí. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, *n*-butiloxi, *tert*-butiloxi, metiloximetilo, etiloximetilo, metiloxietilo, etiloxietilo, metilaminometilo, dimetilaminometilo, metilaminoetilo, dimetilaminoetilo, metiltiometilo, etiltiometilo, etiltioetilo y metiltioetilo.

[0046] El término "cicloalquilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente hidrocarbilo cíclico no aromático saturado o insaturado, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 1,3-ciclohexadienilo, decalinilo y 1,4-ciclohexadienilo.

[0047] El término "heterocicloalquilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente hidrocarbilo cíclico no aromático saturado o insaturado, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados, donde al menos un carbono en uno de los anillos se sustituye por un heteroátomo, por ejemplo, por oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio o fósforo, donde el nitrógeno y el azufre pueden opcionalmente estar oxidados y el nitrógeno puede opcionalmente estar cuaternizado. Los heteroátomos pueden estar conectados directamente entre sí. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, tetrahidrofuranilo, pirrolidinilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, decahidroquinolinilo, piperazinilo, oxazolidinilo y morfolinilo. Debe observarse que "grupo heterocicloalquilo C₁" denota que solo hay un carbono presente en el sistema de anillos del heterocicloalcano (así, los átomos de carbono en los sustituyentes opcionales no se cuentan). Un ejemplo de dicho grupo es un grupo dioxiranilo.

[0048] El término "acilo" como se utiliza en este caso se refiere a un grupo con una configuración recta, ramificada o cíclica o una combinación de las mismas, unido a la estructura precursora a través de una funcionalidad de carbonilo. Dichos grupos pueden ser saturados o insaturados, alifáticos o aromáticos y carbocíclicos o heterocíclicos. Los ejemplos de un grupo acilo C₁-C₈ incluyen acetilo, benzoilo, nicotinoilo, propionilo, isobutirilo, oxalilo y similares.

[0049] El número de átomos de carbono que puede contener un "alquilo", "heteroalquilo", "cicloalquilo", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", "acilo" y similares, se indica mediante una designación posterior a dichos términos, es decir, alquilo C₁₋₁₀ significa que dicho alquilo puede contener de uno a diez carbonos (los átomos de carbono en los sustituyentes opcionales unidos a este alquilo no se cuentan).

[0050] El término "carbociclo" en este caso se refiere a una fracción cicloalcano o areno saturada o insaturada, donde los términos "cicloalcano" y "areno" se definen como fracciones precursoras de los sustituyentes "cicloalquilo" y "arilo", respectivamente, tal y como se ha definido anteriormente.

[0051] El término "heterociclo" en este caso se refiere a una fracción heterocicloalcano o heteroareno saturada o insaturada, donde los términos "heterocicloalcano" y "heteroareno" se definen como fracciones precursoras de los sustituyentes "heterocicloalquilo" y "heteroarilo", respectivamente, tal y como se ha definido anteriormente.

[0052] La extensión "-ileno" a diferencia de "-il", por ejemplo en "alquileno" a diferencia de "alquilo", indica que dicho, por ejemplo, "alquileno" es una fracción bivalente (o multivalente) conectada a una o más fracciones diferentes a través de al menos uno o más enlaces dobles o dos o más enlaces simples, a diferencia de un grupo monovalente conectado a una fracción a través de un enlace simple en dicho, por ejemplo, "alquilo". El término "alquileno", por lo tanto, se refiere a una fracción hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada; el término "heteroalquileno" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada, donde al menos un carbono se sustituye por un heteroátomo; el término "arileno" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción aromática carbocíclica, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados; el término "heteroarileno" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción aromática carbocíclica, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados, donde al menos un carbono en uno de los anillos se sustituye por un heteroátomo; el término "cicloalquileno" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción hidrocarbilo cíclica no aromática saturada o insaturada, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados; el término "heterocicloalquileno" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción hidrocarbilo cíclica no aromática saturada o insaturada, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados, donde al menos un carbono en uno de los anillos se sustituye por un heteroátomo. Las fracciones bivalentes ejemplares incluyen aquellos ejemplos dados para los grupos monovalentes anteriormente donde se elimina un átomo de hidrógeno.

[0053] El prefijo "poli" en "polialquileno", "poliheteroalquileno", "poliarileno", "poliheteroarileno", "policicloalquileno", "poliheterocicloalquileno", y similares, indica que dos o más de dichas fracciones "-ileno", por ejemplo, fracciones alquileno, están unidas para formar una fracción ramificada o no ramificada multivalente que contiene dos o más sitios de unión para fracciones adyacentes. De forma similar, el prefijo "oligo" en, por ejemplo, oligoetilenglicol indica que dos o más fracciones de etilenglicol están unidas para formar una fracción ramificada o no ramificada multivalente. La diferencia entre los prefijos "oligo" y "poli" es que el prefijo "oligo" se usa más frecuentemente para indicar un número relativamente pequeño de unidades de repetición, mientras el prefijo "poli" normalmente se refiere a un número relativamente grande de unidades de repetición.

[0054] Cada m y n son independientemente 0 o un número entero positivo. Preferiblemente, n es 0, 1, 2 o 3, y m es 0 o 1. Más preferiblemente, n es 0, 1, 2 o 3, y m es 0.

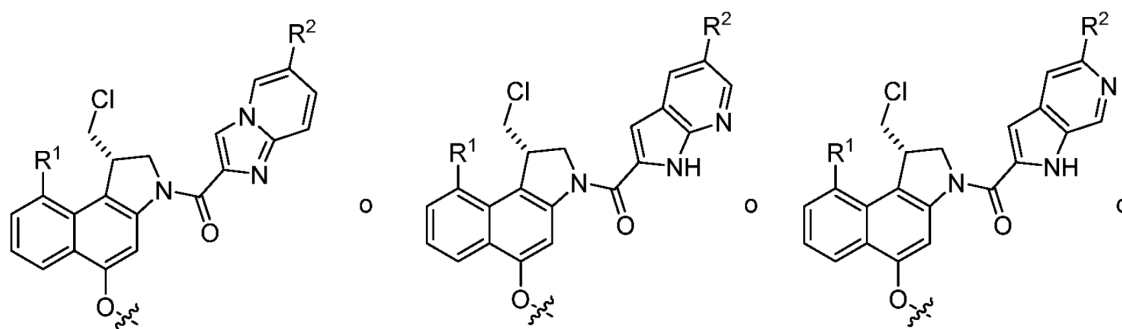
[0055] En una forma de realización, la invención se refiere a un compuesto conector-fármaco con la fórmula (I) o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, donde

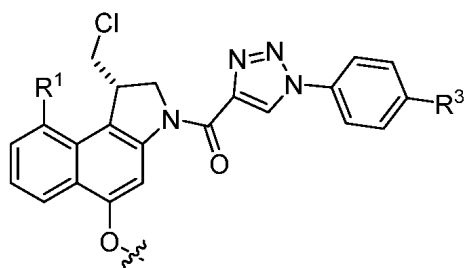
V¹ es una fracción escindible condicionalmente o transformable condicionalmente, que se puede escindir o transformar mediante un proceso químico, fotoquímico, físico, biológico o enzimático;

Z es un fármaco citotóxico que comprende un grupo hidroxilo fenólico a través del cual **Z** se une al conector, preferiblemente, **Z** es un derivado de duocarmicina o de dímero CBI, más preferiblemente **Z** es un derivado de duocarmicina;

n es 0, 1, 2 o 3; y
m es 0 o 1.

[0056] En una forma de realización, **Z** es

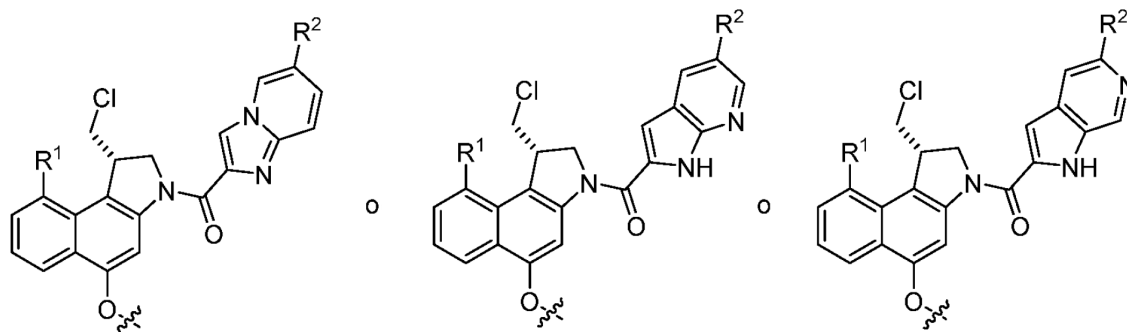




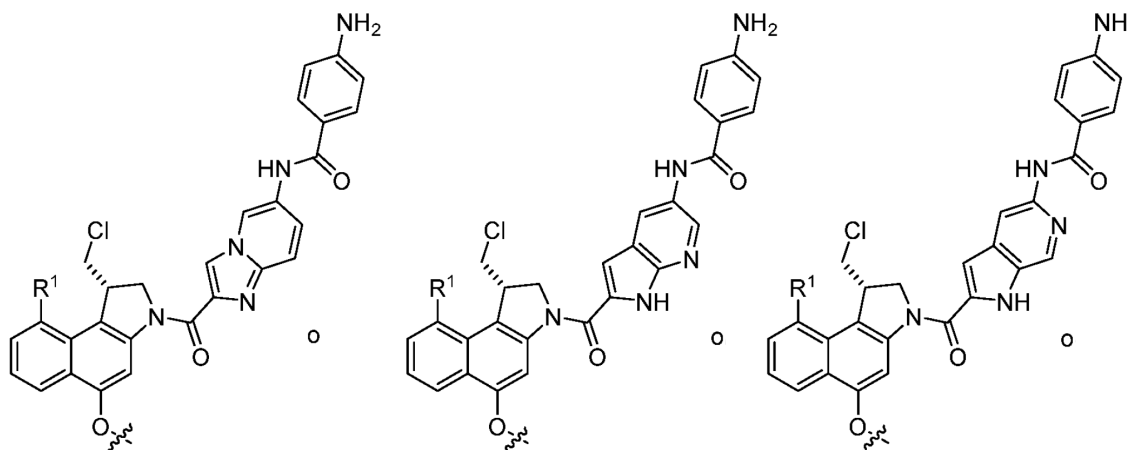
donde R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de entre H, OH, SH, NH_2 , N_3 , NO_2 , NO, CF_3 , CN, $C(O)NH_2$, $C(O)H$, $C(O)OH$, halógeno, R^a , SR^a , $S(O)R^a$, $S(O)_2R^a$, $S(O)OR^a$, $S(O)_2OR^a$, $OS(O)R^a$, $OS(O)_2R^a$, $OS(O)OR^a$, $OS(O)_2OR^a$, OR^a , NHR^a , $N(R^a)R^b$, $^+N(R^a)(R^b)R^c$, $P(O)(OR^a)(OR^b)$, $OP(O)(OR^a)(OR^b)$, $SiR^aR^bR^c$, $C(O)R^a$, $C(O)OR^a$, $C(O)N(R^a)R^b$, $OC(O)R^a$, $OC(O)OR^a$, $OC(O)N(R^a)R^b$, $N(R^a)C(O)R^b$, $N(R^a)C(O)OR^b$, $N(R^a)C(O)N(R^b)R^c$ y un grupo hidrosoluble, donde

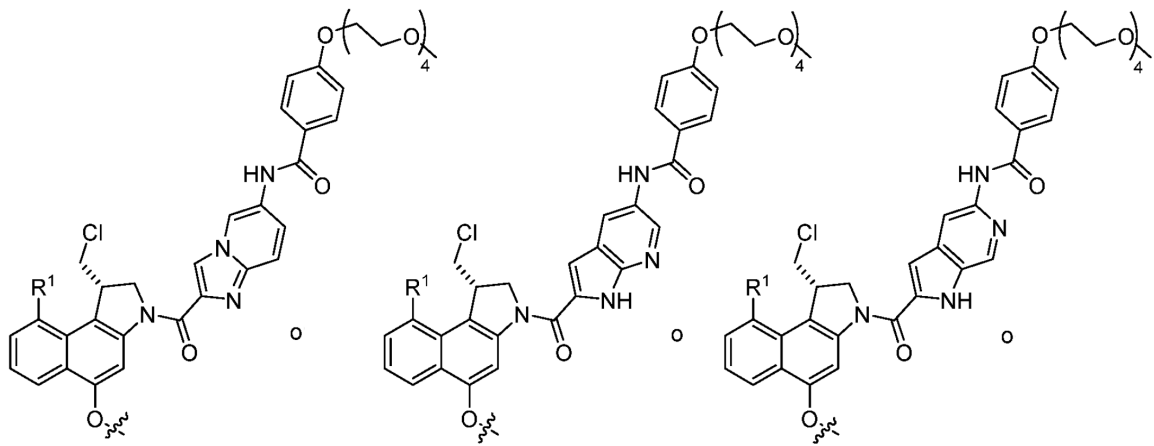
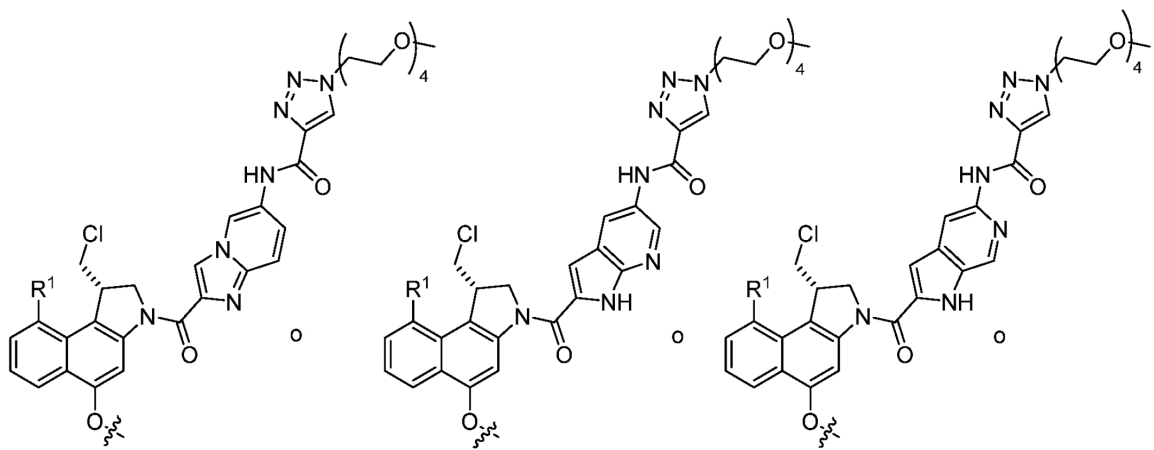
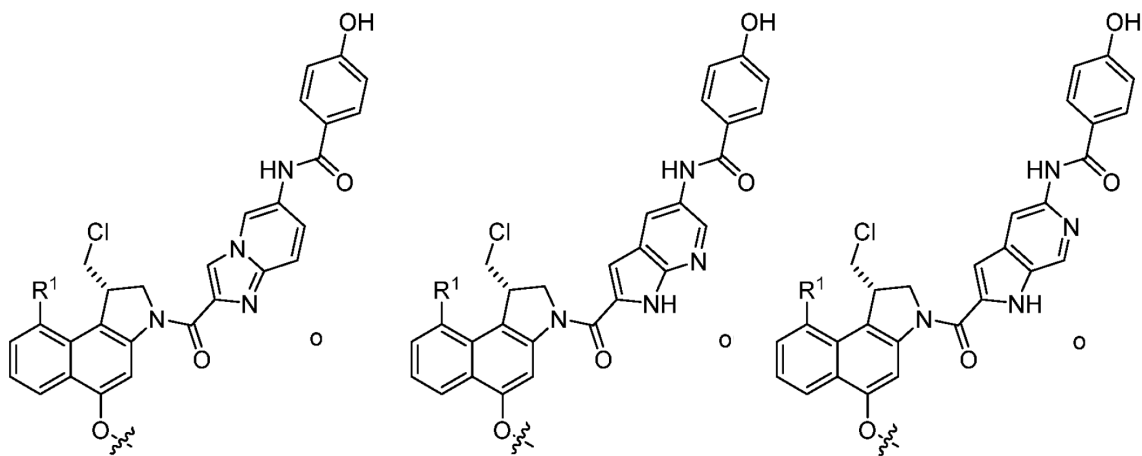
R^a , R^b y R^c se seleccionan independientemente de entre H y $(CH_2CH_2O)_{aa}CH_2CH_2X^1R^{a1}$, alquilo C_{1-15} , heteroalquilo C_{1-15} , cicloalquilo C_{3-15} , heterocicloalquilo C_{1-15} , arilo C_{5-15} o heteroarilo C_{1-15} opcionalmente sustituidos, donde aa se selecciona de 1 a 1000, X^1 se selecciona de entre O, S y NR^{b1} , y R^{a1} y R^{b1} se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C_{1-3} , donde uno o más de los sustituyentes opcionales en R^a , R^b y/o R^c son opcionalmente un grupo hidrosoluble, donde dos o más de R^a , R^b y R^c están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos.

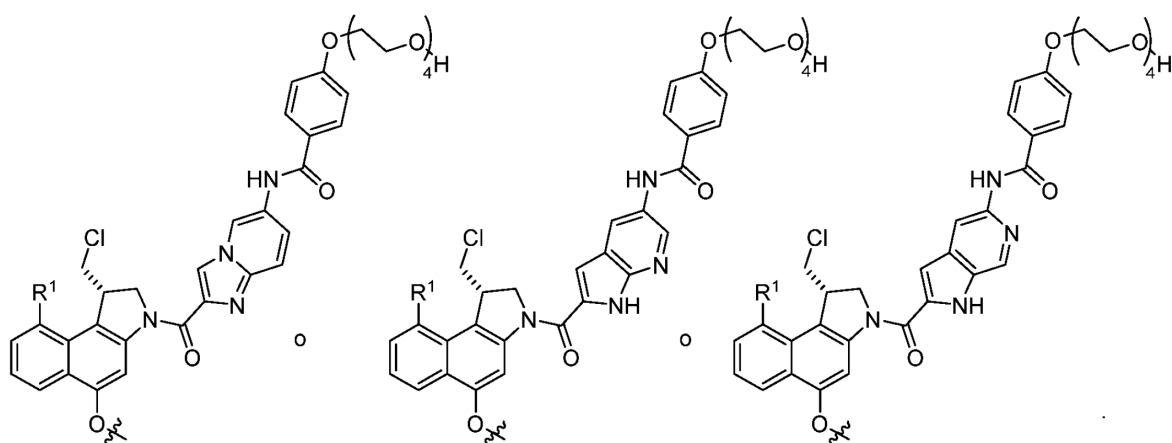
[0057] En una forma de realización, **Z** es



[0058] En una forma de realización preferida, **Z** es

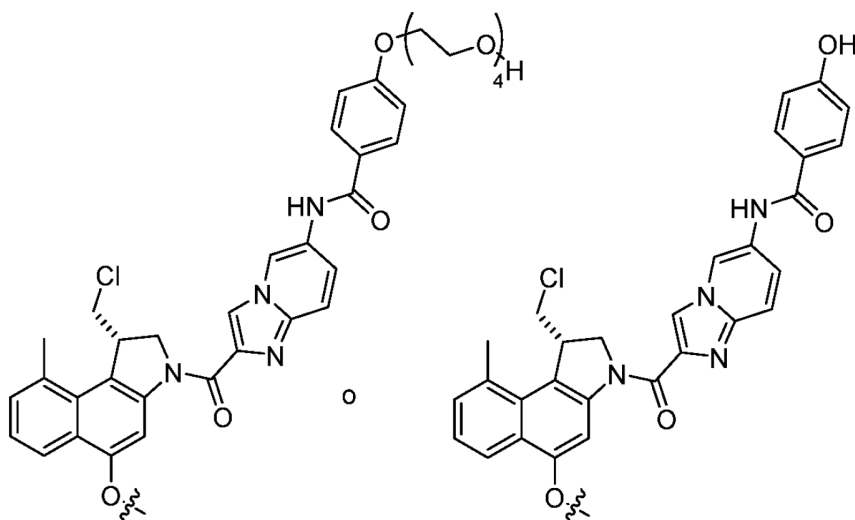




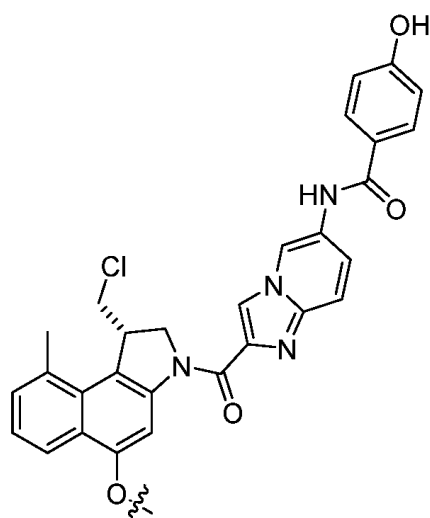


[0059] En una forma de realización, R^1 se selecciona de entre H, metilo y metoxi. Preferiblemente, R^1 es metilo.

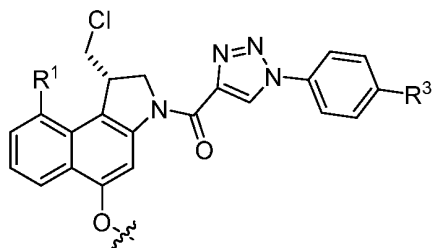
[0060] En una forma de realización más preferida, **Z** es



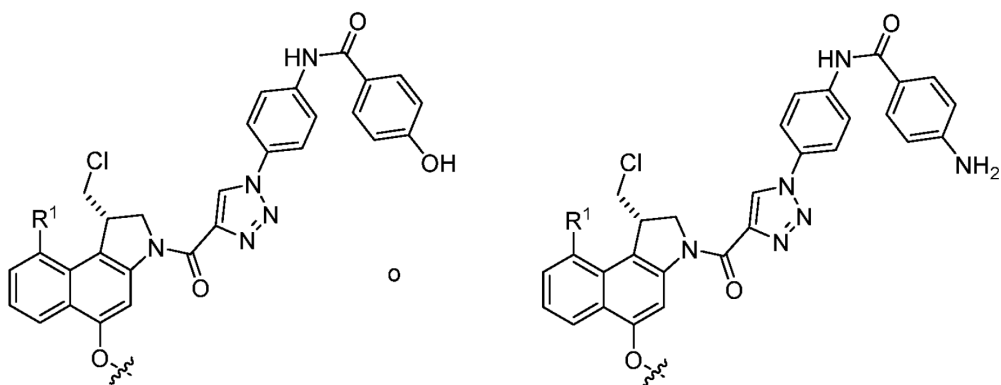
5 [0061] En una forma de realización particularmente preferida, **Z** es



[0062] En otra forma de realización, **Z** es

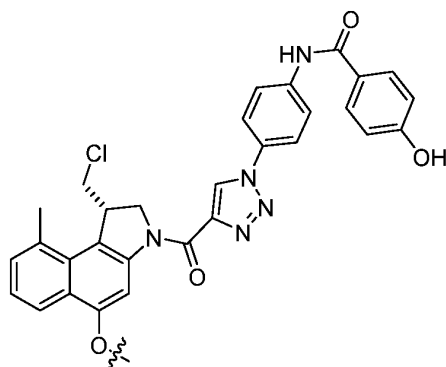


[0063] En una forma de realización preferida, **Z** es

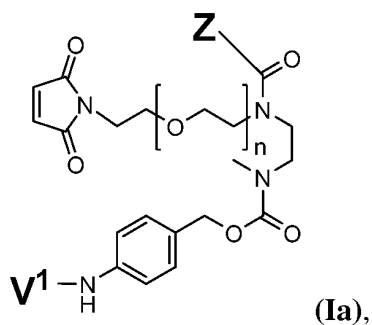


5 [0064] En una forma de realización, R¹ se selecciona de entre H, metilo y metoxi. Preferiblemente, R¹ es metilo.

[0065] En una forma de realización más preferida, **Z** es

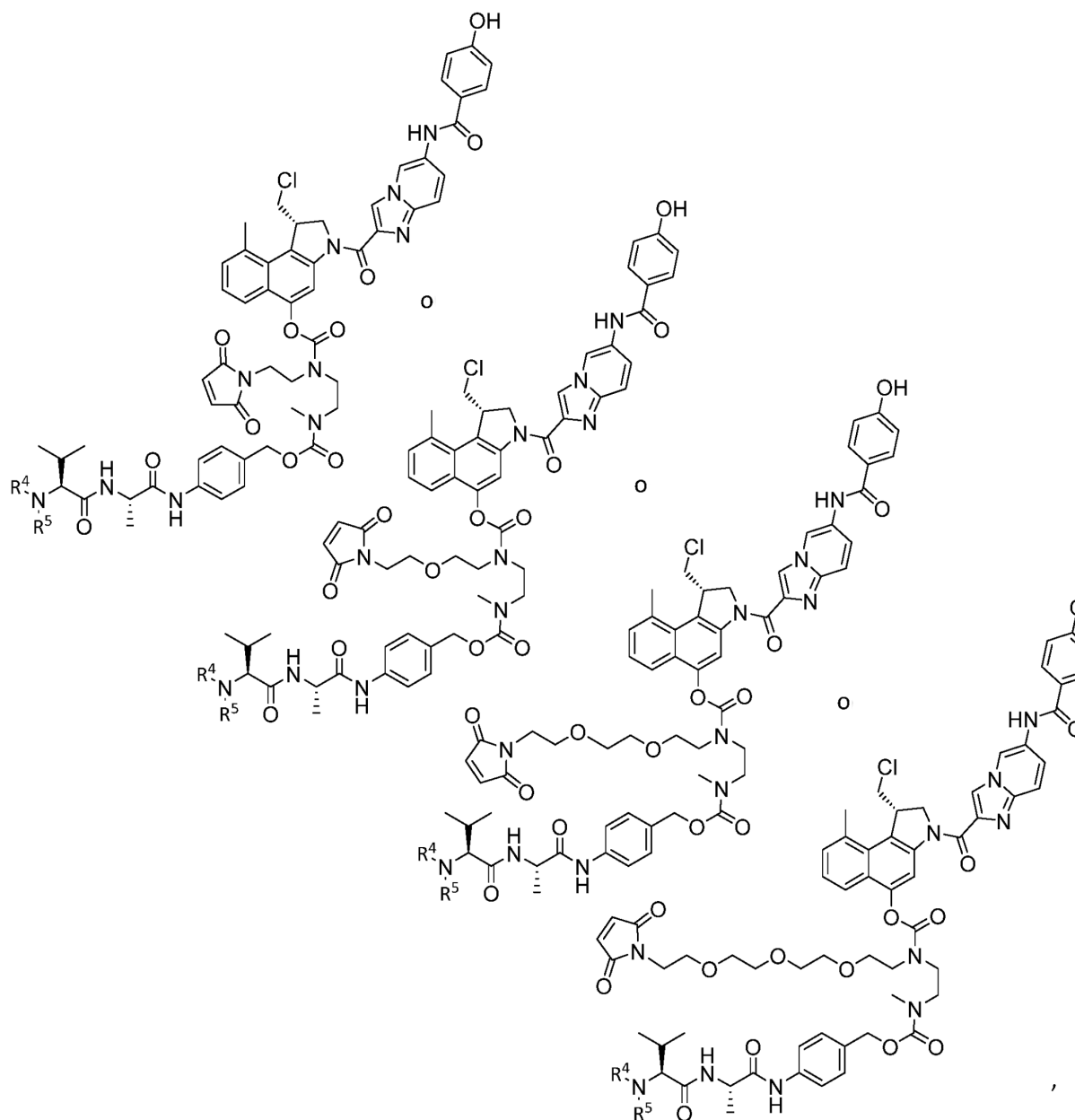


[0066] En una forma de realización, el compuesto con la fórmula (I) está representado por



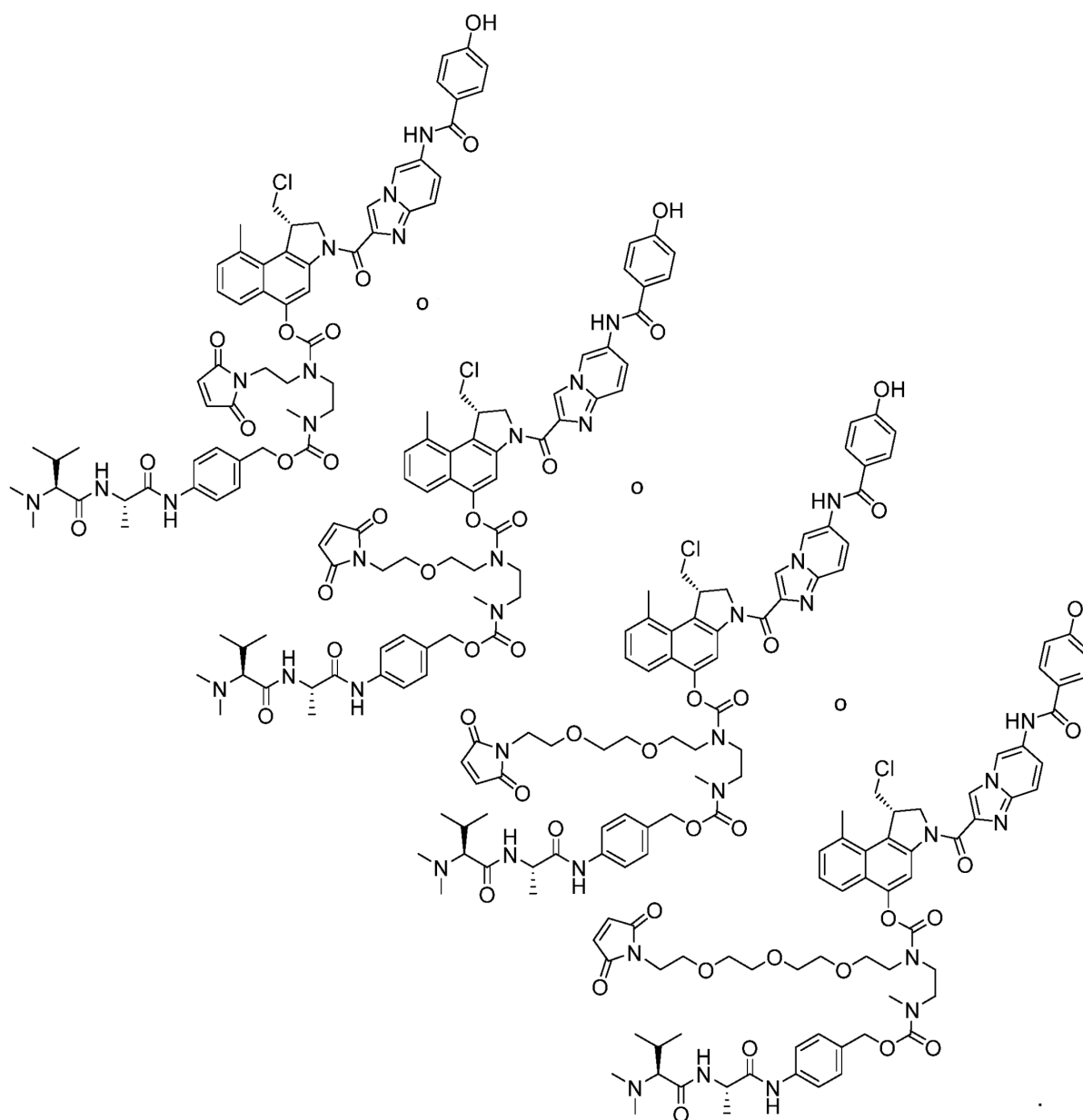
10 donde $\mathbf{V}^1$, $\mathbf{Z}$ y n son tal y como se ha definido en las formas de realización precedentes.

[0067] En una forma de realización preferida, el compuesto con la fórmula (Ia) es

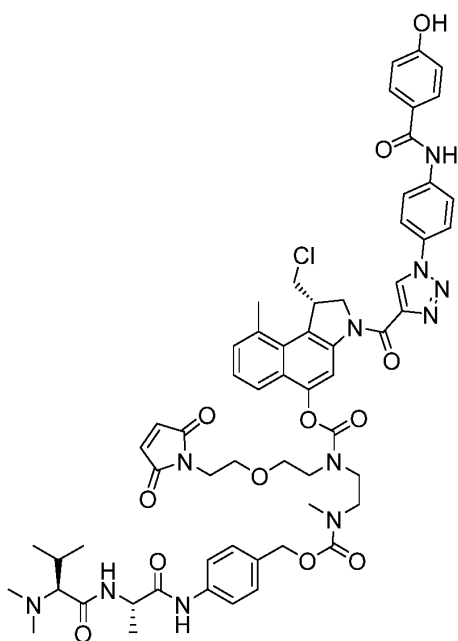


donde R^4 y R^5 son independientemente H o un grupo de bloqueo de amina.

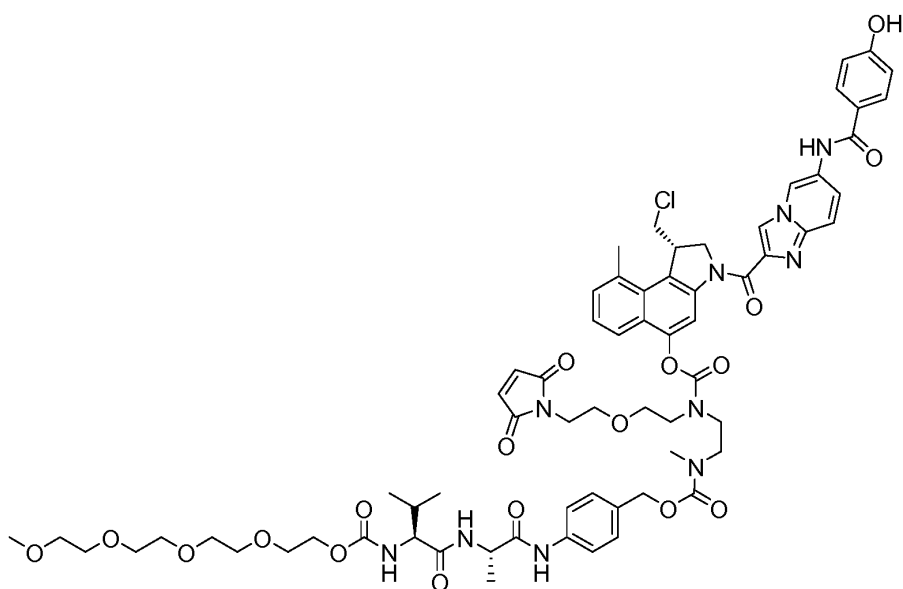
[0068] En una forma de realización más preferida, el compuesto con la fórmula (Ia) es



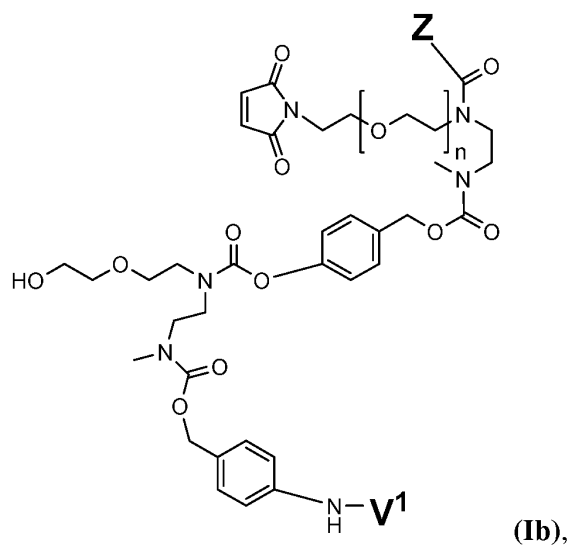
[0069] En otra forma de realización preferida, el compuesto con la fórmula (Ia) es



[0070] En otra forma de realización preferida, el compuesto con la fórmula (Ia) es

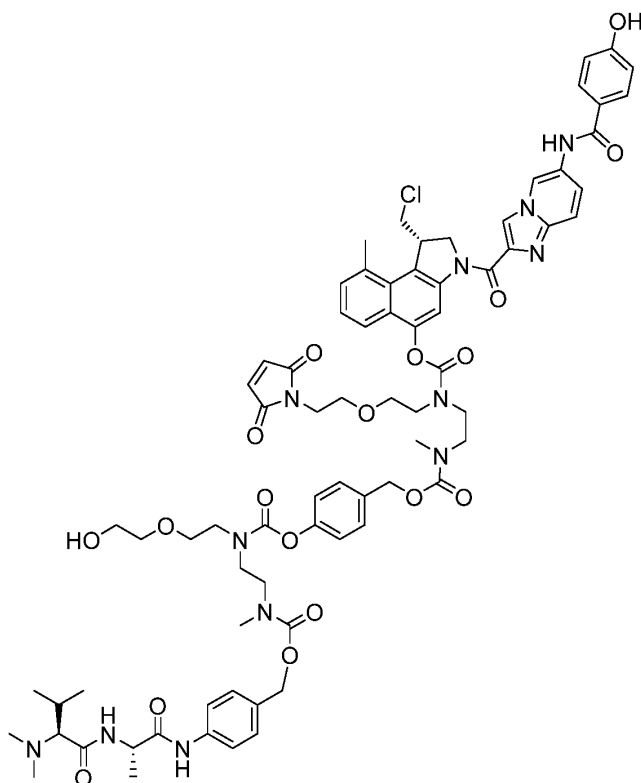


[0071] En una forma de realización, el compuesto con la fórmula (I) está representado por



donde **V¹**, **Z** y *n* son tal y como se ha definido en las formas de realización precedentes.

[0072] En una forma de realización preferida, el compuesto con la fórmula (Ib) es



5 [0073] La presente invención se refiere además a un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) donde un compuesto conector-fármaco según la invención (fórmula I) se conjuga con un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo a través de una cisteína presente en el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno.

10 [0074] La proporción fármaco a anticuerpo (DAR) media del ADC, es decir, el número medio de fármacos conjugados con el anticuerpo, varía típicamente de 1 a 6. Como es bien sabido en la técnica, la DAR y la distribución de carga farmacológica se pueden determinar, por ejemplo, usando la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) o la cromatografía en fase líquida de alto rendimiento de fase invertida (RP-HPLC). La HIC es particularmente adecuada para determinar la DAR media. Preferiblemente, la DAR media varía de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, más preferiblemente de 1,5 a 2.

[0075] Los conectores-fármacos según la presente invención están diseñados de manera que la hidrofobicidad de los ADC que comprenden dichos conectores-fármacos es más comparable a la de los anticuerpos desnudos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que en el caso de la hidrofobicidad de los ADC que comprenden conectores-fármacos lineales. El control de la hidrofobicidad se puede usar para gestionar los parámetros farmacocinéticos del ADC.

[0076] La hidrofobicidad de los ADC se puede determinar comparando la hidrofobicidad del conjugado con la del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo no conjugado, denominada la hidrofobicidad relativa. En determinadas formas de realización, el tiempo de retención del conjugado no es más de tres minutos más largo que el tiempo de retención del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo no conjugado, según se determina por el método descrito en las tablas 1A y 1B en los ejemplos. En determinadas formas de realización diferentes, el tiempo de retención del conjugado no es más de dos minutos más largo que el tiempo de retención del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo no conjugado, según se determina por el método descrito en las tablas 1A y 1B en los ejemplos. En determinadas formas de realización diferentes, el tiempo de retención del conjugado no es más de un minuto y medio más largo que el tiempo de retención del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo no conjugado, según se determina por el método descrito en las tablas 1A y 1B. En determinadas formas de realización diferentes, el tiempo de retención del conjugado no es más de un minuto más largo que el tiempo de retención del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo no conjugado, según se determina por el método descrito en las tablas 1A y 1B.

[0077] Los efectos del conector de la presente invención sobre la hidrofobicidad relativa serán más pronunciados en las formas de realización donde los fármacos sean de naturaleza más hidrofóbica.

[0078] En el contexto de la presente invención, cualquier anticuerpo -particularmente cualquier anticuerpo conocido por tener actividad terapéutica o cualquier anticuerpo conocido en la técnica de los ADC, o cualquier fragmento de unión al antígeno del mismo, por ejemplo un fragmento F(ab')₂ o uno Fab', un anticuerpo de cadena única (sc), un scFv, un anticuerpo de dominio único (sd), un diacuerpo o un minicuerpo, se puede usar para la conjugación (de tipo salvaje o específica de sitio) de un conector-fármaco reivindicado en la presente. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo, como anticuerpos IgG, IgA o IgM. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, más preferiblemente un anticuerpo IgG₁ o IgG₂.

[0079] El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoespecífico (es decir, específico para un antígeno; tal antígeno puede ser común entre especies o tener antígenos relacionados entre especies) o un anticuerpo biespecífico (es decir, específico para dos antígenos diferentes). En una forma de realización de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

[0080] Estos anticuerpos se pueden producir por recombinación, por síntesis o por otros métodos adecuados conocidos en la técnica.

[0081] Preferiblemente, el anticuerpo se une a una diana antigénica que se expresa en o sobre la membrana celular (por ejemplo, sobre la superficie celular) de una célula tumoral. Más preferiblemente, el ADC es interiorizado por la célula después de la unión del anticuerpo a la diana (antigénica), después de lo cual el fármaco citotóxico se libera intracelularmente.

[0082] En una forma de realización, el anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención es un anticuerpo monoespecífico (o un fragmento de unión al antígeno del mismo) contra una de las dianas seleccionadas del grupo que consiste en anexina A1, CA242 (antígeno canceroso 242), CD19, CD22, CD30 (factor de necrosis tumoral 8), CD33, CD37, CD38 (ADP ribosa cíclico hidrolasa), CD44, CD47 (proteína asociada a integrina), CD56 (molécula de adhesión celular neural), CD70, CD74, CD79, CD115 (receptor del factor estimulador de colonias 1), CD123 (receptor de la interleucina 3), CD138 (sindecano 1), CD203c (ENPP3), CD303, CD333, CEACAM, CLL-1 (molécula de tipo lectina tipo C 1), c-MET (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos), Cripto, DLL3, EGFR, EPCAM, EphA2, EphB3, ETBR (receptor de la endotelina tipo B), FAP, FcRL5 (proteína de tipo receptor Fc 5, CD307), FGFR3, FOLR1 (receptor de folato alfa), GCC (guanilil ciclase C), GPNMB, HER2, HMW-MAA (antígeno de alto peso molecular asociado al melanoma), integrina, carbohidrato de tipo Lewis A, Lewis Y (CD174), LIV1, mesotelina (MSLN), MN (CA9), MUC1, MUC16, NaPi2b, nectina 4, PSMA, SLC44A4, STEAP-1, antígeno 5T4, Tag72, factor tisular (TF, tromboplastina, CD142), TF-Ag, TROP2 (transductor de señales de calcio asociado a tumores 2) y VLA.

[0083] En otra forma de realización, el anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención es un anticuerpo (o un fragmento de unión al antígeno del mismo) biespecífico contra una combinación de dos dianas seleccionadas del grupo enumerado anteriormente.

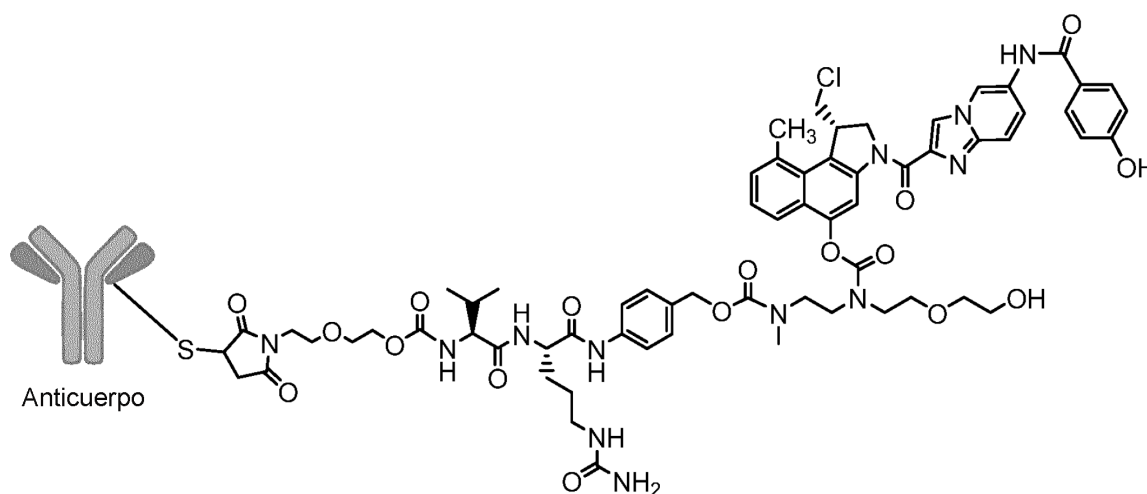
[0084] Los ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen blinatumomab (CD19), epratuzumab (CD22), iratumumab y brentuximab (CD30), vadastuximab (CD33), tetulumab (CD37), isatuximab (CD38), bivatuzumab (CD44), lorvotuzumab (CD56), vorsetuzumab (CD70), milatuzumab (CD74), polatuzumab (CD79), rovalpituzumab (DLL3), futuximab (EGFR), oportuzumab (EPCAM), farletuzumab (FOLR1), glembatumumab (GPNMB), trastuzumab y pertuzumab (HER2), etaracizumab (integrina), anetumab (mesotelina), pankomab (MUC1), enfortumab (nectina 4) y H8, A1 y A3 (antígeno 5T4).

[0085] El anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención es preferiblemente un anticuerpo monoclonal (mAb) y puede ser un mAb quimérico, humanizado o humano. Más preferiblemente, conforme a la presente invención se usa un mAb humano o humanizado, aún más preferiblemente un anticuerpo IgG humanizado o humano, más preferiblemente un mAb IgG₁ humanizado o humano. Preferiblemente, dicho anticuerpo tiene cadenas ligeras κ (kappa), es decir, un anticuerpo IgG₁- κ humanizado o humano.

[0086] En los anticuerpos humanizados, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de unión al antígeno en las regiones variables de la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) derivan de anticuerpos de una especie no humana, comúnmente ratón, rata o conejo. Estas CDR no humanas se pueden colocar dentro de una estructura humana de las regiones variables (región estructural FR1, FR2, FR3 y FR4) de la HC y la LC. Se pueden cambiar aminoácidos seleccionados en las regiones estructurales humanas por los aminoácidos originales correspondientes de la especie no humana para mejorar la afinidad de unión, manteniendo una baja inmunogenicidad. Las regiones variables así humanizadas se combinan con regiones constantes humanas. Alternativamente, regiones variables no humanas que incluyen estructuras no humanas se combinan con una región constante de cadena ligera humana y una región constante pesada humana. En este caso, los aminoácidos seleccionados de las regiones estructurales originales de la especie no humana se cambian por sus aminoácidos humanos correspondientes para reducir la inmunogenicidad, manteniendo la afinidad de unión del anticuerpo. En formas de realización menos preferidas también se pueden cambiar aminoácidos situados en las CDR para reducir la inmunogenicidad, sin reducir la afinidad del anticuerpo. La secuencia de aminoácidos de estos anticuerpos humanizados se puede numerar según el sistema de numeración de Kabat (regiones variables del anticuerpo y región constante de la cadena ligera) y el sistema de Kabat Eu (regiones constantes de la cadena pesada del anticuerpo).

[0087] Los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos se han conjugado con una variedad de fármacos citotóxicos a través de conectores escindibles o no escindibles. Los ejemplos de conectores-fármacos conocidos por la persona experta en la materia incluyen vc-seco-DUBA (es decir, SYD980), mc-vc-PAB-MMAE (también abreviado como mc-vc-MMAE y vc-MMAE), mc-MMAF y mc-vc-MMAF. Estas abreviaturas son bien conocidas por la persona experta en la materia (véase también la WO2015/177360). El conector-fármaco vc-seco-DUBA se describe en la WO2011/133039 como el compuesto **18b** en p. 210, 11. 21- 27.

[0088] La estructura molecular genérica de un ADC vc-seco-DUBA se representa a continuación.



Estructura molecular de un ADC vc-seco-DUBA

[0089] El conector usado de acuerdo con la presente invención es un conector escindible, a diferencia de, por ejemplo, el maleimidocaproilo (mc) no escindible, y puede comprender, por ejemplo, un dipéptido escindible tal como la valinacitrulina (vc) o la valina-alanina (va).

[0090] Muchos de los conectores de la técnica anterior son conectores lineales, es decir, con el sitio para la escisión entre el fármaco y el sitio de unión del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo. Estos conectores son definidos por los presentes inventores como "endoconectores". Los intentos conocidos en la técnica para mejorar la hidrofobicidad del conector-fármaco y, así, el ADC resultante incluyen la unión de grupos hidrosolubles, tales como polímeros de polietilenglicol, a conectores, entre el fármaco y el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o en una posición paralela (como un grupo lateral en el conector). Sin embargo, la adición de grupos de solubilización aumenta necesariamente la complejidad de la molécula conectora y, en el caso de grupos de solubilización grandes, incluso aumenta la complejidad de fabricación de los conjugados.

[0091] Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que la hidrofobicidad de un ADC se puede mejorar sin la necesidad de incorporar grupos hidrosolubles (voluminosos) usando conectores no lineales, es decir, conectores que no tienen el sitio para la escisión entre el fármaco y el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno (definidos por los presentes inventores como "exoconectores"). Sin desear quedar limitado por ninguna teoría, la disposición en el conector usado de acuerdo con la invención puede llevar a una distancia más corta entre el fármaco hidrofóbico y el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno. Como resultado de ello, el fármaco está protegido del medio acuoso hidrófilo que rodea al anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, haciendo así que el ADC sea menos hidrofóbico.

[0092] Este efecto de reducción de la hidrofobicidad aumenta cuando disminuye el número de átomos entre el átomo de azufre del anticuerpo (o del fragmento de unión al antígeno) y el átomo de oxígeno del fármaco, como se muestra en la tabla A a continuación.

[0093] Por ejemplo, en el ADC vc-seco-DUBA hay 29 átomos entre el átomo S del anticuerpo y el átomo O del fármaco.

Tabla A.

Conector-fármaco en el ADC*	Número de átomos	Hidrofobicidad relativa**			
		PSMA	Trastuzumab	Rituximab	H8
vc-seco-DUBA	29	1,0	1,0	1,0	1,0
LD6	16	0,9	0,8	0,8	0,8
LD5	13	0,8	0,8	0,7	0,8
LD4	10	0,7	0,7	0,6	0,7
LD3	7	0,5	0,5	0,5	0,6
* ADC de tipo salvaje; vc-seco-DUBA es un conector-fármaco lineal de comparación.					
** La hidrofobicidad relativa se determina como se describe en la tabla 1A en los ejemplos.					

[0094] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un ADC donde se conjuga un conector-fármaco según la invención de manera específica de sitio con un anticuerpo a través de una cisteína modificada.

[0095] Conforme a la presente invención, el término "cisteína modificada" significa reemplazar un aminoácido distinto de la cisteína en la HC o la LC de un anticuerpo por una cisteína, añadir una cisteína entre aminoácidos existentes o sustituir una cisteína nativa de un enlace disulfuro intercatenario con un aminoácido distinto de la cisteína, por ejemplo serina, creando así una cisteína "modificada" libre en la otra cadena. Como es conocido por la persona experta en la materia, el anticuerpo con modificación de cisteínas se puede expresar en células huésped por métodos de clonación recombinantes o se puede preparar usando técnicas de clonación moleculares convencionales o se pueden sintetizar el/los dominio(s) de HC o LC del anticuerpo que lleva la(s) mutación/mutaciones de cisteína como tales usando equipos y procedimientos de síntesis (peptídica o de ADN) conocidos. Típicamente, se utilizan procedimientos similares a los descritos en la WO2015/177360.

[0096] Los anticuerpos que comprenden cisteínas modificadas proporcionan la oportunidad de preparar ADC específicos de sitio, pueden proporcionar posiciones de conjugación que muestren una buena reactividad con el conector-fármaco y, al mismo tiempo, tienen un riesgo reducido de formar enlaces disulfuro adicionales entre anticuerpos (lo que conduce a la agregación) o afectar a la estructura de los anticuerpos. La introducción de un residuo de cisteína en una posición adecuada del anticuerpo permite el control del sitio de conjugación y los conjugados específicos de sitio obtenidos son más homogéneos que los conjugados obtenidos a través de métodos convencionales, es decir, la conjugación a través de cisteínas de disulfuros intercatenarios de tipo salvaje. Tales métodos convencionales llevan a una mezcla heterogénea de ADC, que puede requerir purificación, por ejemplo para eliminar el anticuerpo no conjugado. Algunos constituyentes individuales de una mezcla de ADC conjugados de forma convencional pueden tener un rendimiento *in vivo* pobre. El rendimiento *in vivo* de los ADC

en cuanto a eficacia, seguridad y estabilidad se puede mejorar si el conector-fármaco de los ADC se conjuga de manera específica de sitio a través de cisteínas modificadas según B.-Q. Shen et al. en Nature Biotechnology, Vol. 30, número 2, 2012, páginas 184-189.

- 5 [0097] Como se muestra en la tabla B a continuación, el efecto de reducción de la hidrofobicidad de los conectores-fármacos de la invención es claramente visible también en los ADC donde el conector-fármaco se conjuga de manera específica de sitio en una posición donde el conector-fármaco apunta hacia afuera.

Tabla B.

Conector-fármaco en el ADC	Número de átomos entre el fármaco y el anticuerpo	Hidrofobicidad relativa
PSMA-HC120*		
vc-seco-DUBA**	29	1,0
LD6	16	0,8
LD5	13	0,7
LD4	10	0,6
LD3	7	0,5
* Cisteína modificada en la posición 120 en la cadena pesada.		
** vc-seco-DUBA es un conector-fármaco lineal de comparación.		

- 10 [0098] Los presentes inventores observaron que la reducción en la hidrofobicidad es aún más pronunciada cuando el conector-fármaco se conjuga de manera específica de sitio en posiciones de la cavidad del Fab o el Fc. Este efecto se muestra en la tabla C para las posiciones 40 y 41 de la LC y la posición 41 de la HC. Los valores de la hidrofobicidad relativa se calcularon usando la hidrofobicidad del ADC PSMA-vc-seco-DUBA conjugado de tipo salvaje como el valor de referencia (primera columna que muestra los valores para los ADC conjugados de manera específica de sitio) o usando la hidrofobicidad del respectivo ADC conjugado de manera específica de sitio (segunda columna que muestra los valores para los ADC conjugados de manera específica de sitio). Los valores de referencia se indexan respecto a 1,0.
- 15

Tabla C.

Conector fármaco en el ADC**	Número de átomos	Hidrofobicidad relativa						
		PSMA	PSMA-LC40*	PSMA-LC41*	PSMA-HC41*			
vc-seco-DUBA	29	1,0	0,9	1,0	0,6	1,0	0,6	1,0
LD6	16	0,9	0,5	0,5	0,4	0,6	0,2	0,4
LD5	13	0,8	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2	0,3
LD4	10	0,7	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2
LD3	7	0,5	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
* Cisteína modificada en las posiciones 40 en la cadena ligera, 41 en la cadena ligera y 41 en la cadena pesada, respectivamente.								
** vc-seco-DUBA es un conector-fármaco lineal de comparación.								

- 20 [0099] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un ADC donde un conector-fármaco se conjuga de manera específica de sitio con un anticuerpo a través de una cisteína modificada en una o más posiciones de dicho anticuerpo seleccionadas de entre 40, 41, 89 (numeración de Kabat), 152, 153, 155, 171, 247, 297, 339, 375 y 376 (numeración Eu), de la cadena pesada, y 40, 41, 165 y 168 (numeración de Kabat) de la cadena ligera.

[0100] En el contexto de la presente invención, la numeración de Kabat se usa para indicar las posiciones aminoácidas de las cisteínas modificadas en las regiones variables de la HC y las regiones constantes y variables de la LC y la numeración Eu se usa para indicar las posiciones en las regiones constantes de la HC del anticuerpo.

- 25 [0101] La expresión "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variable de la cadena pesada o los dominios variable o constante de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real

puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o una inserción en, una FR o una CDR del dominio variable. La numeración de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "estándar".

5 [0102] La expresión "numeración Eu" se refiere al índice Eu como en Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., publicación NIH n.º 91-3242, págs. 662, 680, 689 (1991). El "índice Eu como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo Eu IgG₁ humano (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 78-85 (1969)).

10 [0103] Las posiciones 40, 41 y 89 de la cadena pesada están situadas en la región variable y las posiciones 152, 153, 155, 171, 247, 297, 339, 375 y 376 están situadas en la región constante del anticuerpo. Las posiciones 40 y 41 de la cadena ligera están situadas en la región variable y las posiciones 165 y 168 están situadas en la región constante del anticuerpo.

15 [0104] Las posiciones 40, 41, 89, 152, 153, 155 y 171 de la cadena pesada y las posiciones 40, 41, 165 y 168 de la cadena ligera están situadas en la parte Fab, y las posiciones 247, 297, 339, 375 y 376 de la cadena pesada están situadas en la parte Fc del anticuerpo.

[0105] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que los ADC conjugados de manera específica de sitio de la presente invención muestran propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y/o farmacocinéticas mejoradas, en comparación con los ADC convencionales donde el conector-fármaco lineal se conjuga a través de cisteínas nativas (es decir, endógenas) de enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo.

20 [0106] Por lo general, se evita la modificación de los dominios variables de un anticuerpo, aparte de para la humanización, ya que puede conducir a la pérdida parcial o completa de las propiedades de unión al antígeno. Sin embargo, los residuos de aminoácidos específicos en las regiones estructurales de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo son, cuando se cambian por una cisteína, adecuados para la conjugación y no llevan a una reducción (significativa) de la unión al antígeno después de la conjugación de un conector-fármaco. Además, la conjugación con estas posiciones en la parte Fab permite también el uso de fragmentos de unión al antígeno en vez de anticuerpos completamente intactos. La conjugación en la parte Fab se prefiere a la conjugación en la parte Fc, ya que las proteasas asociadas a tumores en el microambiente tumoral pueden escindir parcialmente los dominios constantes del Fc bajo la región de bisagra. Dicha escisión de los dominios constantes del Fc daría lugar a la pérdida de conectores-fármacos conjugados con Fc, porque estos no son interiorizados por la célula cancerosa, lo que a su vez podría conducir a una actividad disminuida del ADC *in vivo*. (Fan et al. Breast Cancer Res. 2012; 14: R116 y Brezsky et al. PNAS 2009; 106: 17864-17869).

25

30

[0107] Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un ADC donde un conector-fármaco se conjuga de manera específica de sitio con un anticuerpo a través de una cisteína modificada en una o más posiciones de dicho anticuerpo seleccionada de entre las posiciones 40, 41 y 89 de la cadena pesada y las posiciones 40 y 41 de la cadena ligera.

35

[0108] En una forma de realización más preferida, la presente invención se refiere a un ADC donde un conector-fármaco se conjuga de manera específica de sitio con un anticuerpo a través de una cisteína modificada en una o más posiciones de dicho anticuerpo seleccionada de la posición 41 de la cadena pesada y las posiciones 40 y 41 de la cadena ligera.

40 [0109] En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a un ADC donde un conector-fármaco se conjuga de manera específica de sitio con un anticuerpo a través de una cisteína modificada en la posición 41 de la cadena pesada.

45 [0110] Como ejemplo representativo, el anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención es el anticuerpo anti-PSMA con una cisteína modificada en la posición 41 de la cadena pesada (es decir, PSMA-HC41) que se describe en la WO2015/177360 como SYD1030 (la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5).

50 [0111] Como otro ejemplo representativo, el anticuerpo que se va a usar conforme a la presente invención es el anticuerpo anti-antígeno 5T4 con una cisteína modificada en la posición 41 de la cadena pesada que se describe en la WO2015/177360 como H8-HC41 (la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11).

[0112] Los ADC conforme a la presente invención se pueden obtener según métodos y procedimientos que son bien conocidos por una persona experta en la materia.

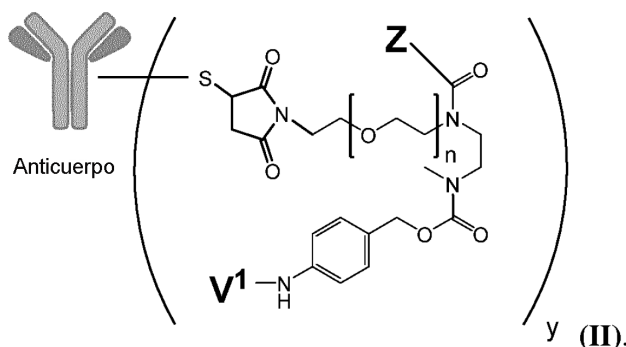
[0113] Un método adecuado para la conjugación (de tipo salvaje) no específica de sitio de conectores-fármacos de duocarmicina, es decir, la conjugación con una cisteína endógena de un enlace disulfuro intercatenario, se describe en el ejemplo 15 de la WO2011/133039.

[0114] Un método adecuado para la conjugación (de tipo salvaje) no específica de sitio de conectores-fármacos de dímeros de CBI se describe en la WO2015/110935.

[0115] Los ADC conforme a la presente invención tienen afinidades de enlace similares a los anticuerpos desnudos, una excelente toxicidad *in vitro* y una buena eficacia *in vivo*. Sobre todo, se ha observado que los ADC son por lo general menos hidrofóbicos y menos susceptibles a la escisión de la catepsina B y, por lo tanto, posiblemente también a otras enzimas/proteasas intra- o extracelulares en la masa tumoral (microambiente tumoral) que los ADC que están conjugados con el conector-fármaco lineal vc-seco-DUBA conocidos del estado de la técnica, pero todavía muestran una citotoxicidad *in vitro* similar.

[0116] De forma inesperada, los ADC conforme a la presente invención muestran una eficacia *in vivo* mejorada en un modelo animal de xenoinjerto tumoral en comparación con los ADC que están conjugados con el conector-fármaco lineal vc-seco-DUBA.

[0117] En una forma de realización particular, la presente invención se refiere a un ADC con la fórmula (II)



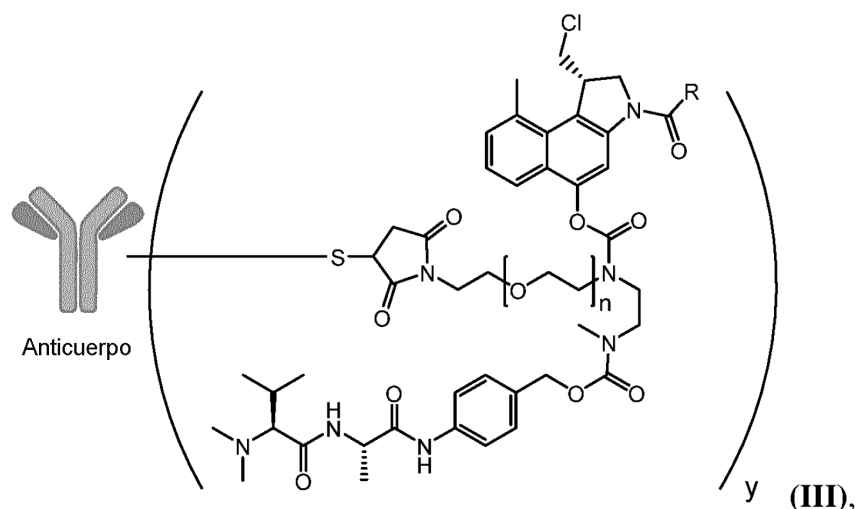
donde "Anticuerpo" es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, sin o con al menos una cisteína modificada como se describe en la presente;

n es 0, 1, 2 o 3;

y representa una DAR media de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, más preferiblemente de 1,5 a 2; y

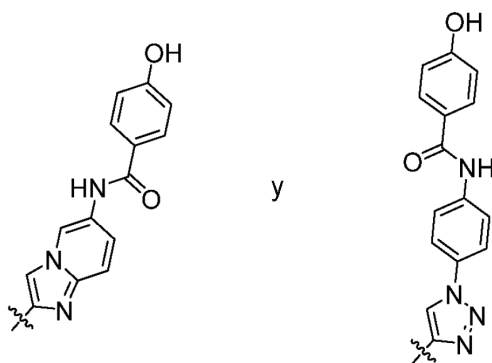
V¹ y Z son tal y como se ha definido en las formas de realización precedentes.

[0118] En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un ADC con la fórmula (III)



donde "Anticuerpo" es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, sin o con al menos una cisteína modificada como se describe en la presente;

- 5 n es 0, 1, 2 o 3;
y representa una DAR media de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4, más preferiblemente de 1 a 3, más preferiblemente de 1,5 a 2; y
R se selecciona de entre



- 10 [0119] En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a un ADC con la fórmula (II) o (III) que comprende un anticuerpo con una cisteína modificada en una o más posiciones seleccionadas de entre las posiciones 40 y 41 de la cadena pesada y las posiciones 40 y 41 de la cadena ligera. Preferiblemente, dicha cisteína modificada está en la posición 41 de la cadena pesada o la posición 40 o 41 de la cadena ligera, más preferiblemente en la posición 41 de la cadena pesada.

- 15 [0120] La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un conector-fármaco o un ADC como se ha descrito anteriormente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones farmacéuticas típicas de proteínas terapéuticas tales como los anticuerpos monoclonales y los conjugados anticuerpo (monoclonal)-fármaco toman la forma de tortas liofilizadas (polvos liofilizados), que requieren la disolución (acuosa) (es decir, la reconstitución) antes de la infusión intravenosa, o soluciones (acuosas) congeladas, que requieren la descongelación antes de usar.

- 20 [0121] Típicamente, la composición farmacéutica conforme a la presente invención se proporciona en forma de una torta liofilizada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la inclusión en la composición farmacéutica (antes de la liofilización) incluyen soluciones tampón (por ejemplo citrato, histidina o succinato con sales en agua), lioprotectores (por ejemplo sacarosa, trehalosa), modificadores de la tonicidad (por ejemplo cloruro sódico), tensioactivos (por ejemplo polisorbato) y agentes de carga (por ejemplo manitol, glicina). Los excipientes
25 usados para formulaciones de proteínas liofilizadas se seleccionan por su capacidad para evitar la desnaturalización de las proteínas durante el proceso de liofilización al igual que durante el almacenamiento. Como ejemplo, la formulación estéril de un solo uso en polvo liofilizada de Kadcyla™ (Roche) contiene -tras la

reconstitución con agua para inyección bacteriostática o estéril (BWFI o SWFI)- 20 mg/ml de ado-trastuzumab emtansina, polisorbato 20 al 0,02% p/v, 10 mM de succinato de sodio y sacarosa al 6% p/v con un pH de 5,0.

[0122] La presente invención se refiere además a un conector-fármaco, un ADC o una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para el uso como un medicamento.

- 5 [0123] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un conector-fármaco, un ADC o una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para usar en el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias hematológicas humanos.

[0124] En una primera forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un conector-fármaco, un ADC o una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para usar en el tratamiento de tumores sólidos humanos seleccionados del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer cerebral (por ejemplo glioblastoma), cáncer del cuello y de la cabeza, cáncer de tiroides, cáncer suprarrenal, cáncer de hueso, cáncer ocular, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer colorrectal, cáncer urotelial (por ejemplo cáncer de la vejiga o renal), cáncer ovárico, cáncer uterino, cáncer vaginal y cervical, cáncer de pulmón (especialmente cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)), mesotelioma (especialmente mesotelioma pleural maligno), cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer testicular y cáncer de próstata.

[0125] En una segunda forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un conector-fármaco, un ADC o una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para usar en el tratamiento de tumores sólidos humanos seleccionados del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer urotelial (por ejemplo cáncer de la vejiga), cáncer ovárico, cáncer uterino, cáncer de pulmón (especialmente cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)), mesotelioma (especialmente mesotelioma pleural maligno), cáncer de hígado, cáncer pancreático y cáncer de próstata.

[0126] En una tercera forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto conector-fármaco, un ADC o una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para usar en el tratamiento de neoplasias hematológicas humanas, particularmente leucemia, más particularmente leucemia seleccionada del grupo que consiste en leucemia linfoblástica y mieloides agudas (ALL y AML, respectivamente).

[0127] La presente invención se refiere además al uso de una combinación administrada consecutivamente o simultáneamente de un compuesto conector-fármaco, un ADC o una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente con uno o más de otros agentes terapéuticos, tal como con un anticuerpo terapéutico, un agente quimioterapéutico y/o un ADC contra una diana adicional relacionada con el cáncer para el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias hematológicas humanas como se ha descrito anteriormente.

[0128] En una forma de realización de la presente invención, el anticuerpo terapéutico es adecatumumab, alemtuzumab, amatuximab, bevacizumab, cetuximab, denosumab, etaracizumab, farletuzumab, gemtuzumab, labetuzumab, mapatumumab, minretumomab, nimotuzumab, nivolumab, oregovomab, panitumumab, pemtumomab, pertuzumab, ramucirumab, sibrotuzumab, trastuzumab o volociximab y el agente quimioterapéutico es i) un agente alquilante, particularmente mostazas de nitrógeno, tales como mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán; nitrosoureas, tales como estreptozocina, carmustina y lomustina; sulfonatos de alquilo, tal como busulfano; triazinas, tales como dacarbazina y temozolomida; etileniminas, tales como tiotepa y altretamina; o fármacos de platino, tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; ii) un antimetabolito, particularmente 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato o pemetrexed; iii) un antibiótico antitumoral, particularmente daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, actinomicina D, bleomicina, mitomicina C o mitoxantrona; iv) un inhibidor de topoisomerasa, particularmente inhibidores de la topoisomerasa I, tales como topotecán e irinotecán; o inhibidores de la topoisomerasa II, tales como etopósido, tenipósido y mitoxantrona; v) un inhibidor mitótico, particularmente taxanos, tales como paclitaxel, cabazitaxel y docetaxel; epotilonas, tal como ixabepilona; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, vincristina y vinorelbina; o estramustina; vi) un inhibidor de cascadas de señalización, particularmente inhibidores de mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos), tal como temsirolimus y everolimus; o inhibidores de tirosina quinasa, tales como gefitinib, erlotinib, imatinib, pazopanib, ceritinib, crizotinib, lapatinib y afatinib; vii) un corticoesteroide, particularmente prednisona, metilprednisolona o dexametasona; viii) un agente terapéutico hormonal, particularmente agentes de modulación de receptores de andrógenos, tales como bicalutamida, enzalutamida y acetato de abiraterona; antiestrógenos, tal como tamoxifeno; o agentes de inhibición de aromatasa o de modificación de esteroides, tales como anastrozol, letrozol, fulvestrant y exemestano; ix) un inhibidor de PARP, particularmente olaparib; o x) otro fármaco de quimioterapia, particularmente L-asparaginasa o bortezomib. La persona experta en la materia no tendrá ninguna dificultad para

seleccionar las terapias de combinación adecuadas para usar en el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias hematológicas humanas como se ha descrito anteriormente.

[0129] Una cantidad terapéuticamente eficaz del ADC conforme a la presente invención se extiende en el rango de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal, particularmente en el rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, más particularmente en el rango de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Este último rango corresponde aproximadamente a una dosis fija en el rango de 20 a 800 mg del conector-fármaco o ADC. El compuesto de la presente invención se puede administrar semanalmente, bisemanalmente, trisemanalmente, mensualmente o cada seis semanas. Los regímenes de tratamiento adecuados dependen de la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, el compuesto que se administra y otros factores que serían considerados por el médico tratante.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

[0130] Se obtuvieron anticuerpos con modificación de cisteínas usando los materiales y los procedimientos descritos en la WO2015/177360. Los reactivos y los tampones fueron procurados de proveedores comerciales.

[0131] *HIC* - Para la HIC analítica, se inyectaron 5-10 µL de muestra (1 mg/ml) sobre una columna TSKgel Butyl-NPR (4,6 mm DI x 3,5 cm L, Tosoh Bioscience, n.º de cat. 14947). El método de elución consistió en un gradiente lineal de 100% del tampón A (25 mM de fosfato sódico, 1,5 M de sulfato de amonio, pH 6,95) a 100% del tampón B (25 mM de fosfato sódico, pH 6,95, isopropanol al 20%) a 0,4 ml/min durante 20 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. Se usó un sistema de cromatografía en fase líquida de rendimiento ultra alto (UPLC) Waters Acquity H-Class equipado con un detector PDA y el *software* Empower. La absorbancia se midió a 214 nm para cuantificar la DAR media y para determinar la hidrofobicidad relativa de los varios ADC.

[0132] *SEC* - Para la SEC analítica, se inyectaron 5 µL de muestra (1 mg/ml) sobre una columna TSKgel G3000SWXL (5 µm, 7,8 mm DI x 30 cm L, Tosoh Bioscience, n.º de cat. 08541) equipado con una precolumna TSKgel SWXL (7 µm, 6,0 mm DI x 4,0 cm L, Tosoh Bioscience, n.º de cat. 08543). El método de elución consistió en la elución con 100% de 50 mM de fosfato sódico, 300 mM de NaCl, pH 7,5 a 0,6 ml/min durante 30 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. Se usó un sistema de UPLC Waters Acquity H-Class equipado con un detector PDA y el *software* Empower. La absorbancia se midió a 214 nm para cuantificar la cantidad de especies HMW.

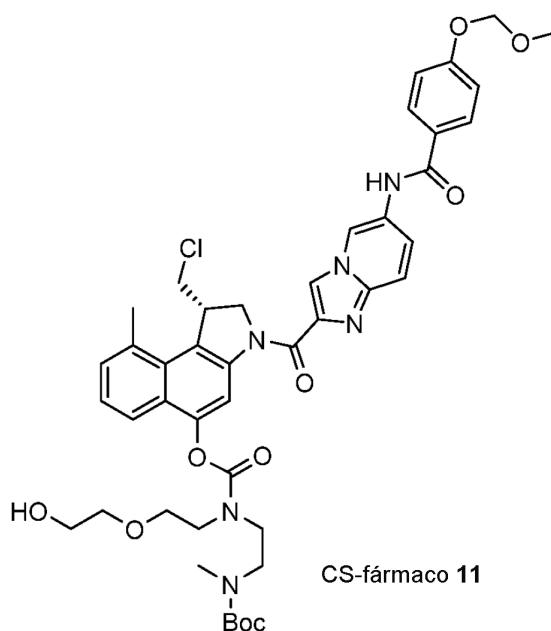
[0133] *SHPC* - Se prepararon las muestras mezclando 70 µl de solución de ADC con 30 µl de DMA. Se inyectaron 50 µl de las muestras en una columna de fase hidrofóbica protegida (SUPELCOSIL LC-HISEP 5 µm, 4,6 mm DI x 15 cm L, Supelco (Sigma-Aldrich), n.º de cat. 58935) montada en un sistema de UPLC Waters Acquity H-Class equipado con un detector PDA y el *software* Empower. El método de elución consistió en un gradiente lineal de 90% del tampón A (100 mM acetato amónico, pH 4,0) y 10% del tampón B (acetonitrilo) a 32% del tampón A y 68% del tampón B a 1,0 ml/min a lo largo de 10 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a 45°C. La absorbancia se midió a 325 nm para cuantificar la cantidad de conector-fármaco libre.

Síntesis de exoconectores-fármacos

[0134] Los solventes usados fueron de grado reactivo o de grado HPLC. Los espectros de RMN se registraron en un Bruker AVANCE400 (400MHz para ¹H; 100 MHz para ¹³C). Los desplazamientos químicos se proporcionan en ppm con respecto al tetrametilsilano como estándar interno.

[0135] Los conectores-fármacos brutos se purificaron disolviendo los conectores-fármacos en DMA y cargando la solución sobre una columna Waters SunFire™ Prep C18 OBD™ (5 µm de tamaño de partícula, 50x150 mm) seguido por una elución con una velocidad de flujo de 117 ml/min usando un gradiente lineal de 20% del tampón A a 70% del tampón A. El tampón A es acetonitrilo. El tampón B es TFA al 0,1% (m/m) en agua. Las purezas se evaluaron por UPLC usando una columna Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 (1,7 µm de tamaño de partícula, 2,1x50 mm) a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min.

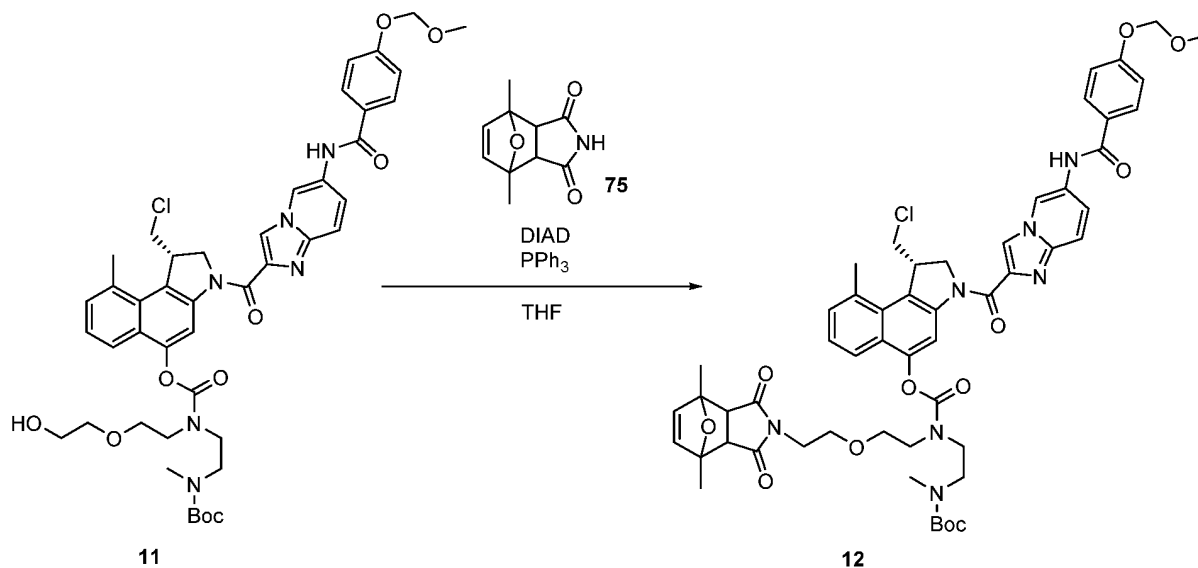
[0136] En general, la síntesis de los conectores-fármacos empieza desde el compuesto **11** y el módulo de ciclación, la síntesis del cual se describe en Elgersma et al. Mol. Pharmaceutics, 2015; 12: 1813-1835 y la WO 2011/133039.



Síntesis de compuestos

Compuesto **12**

[0137]



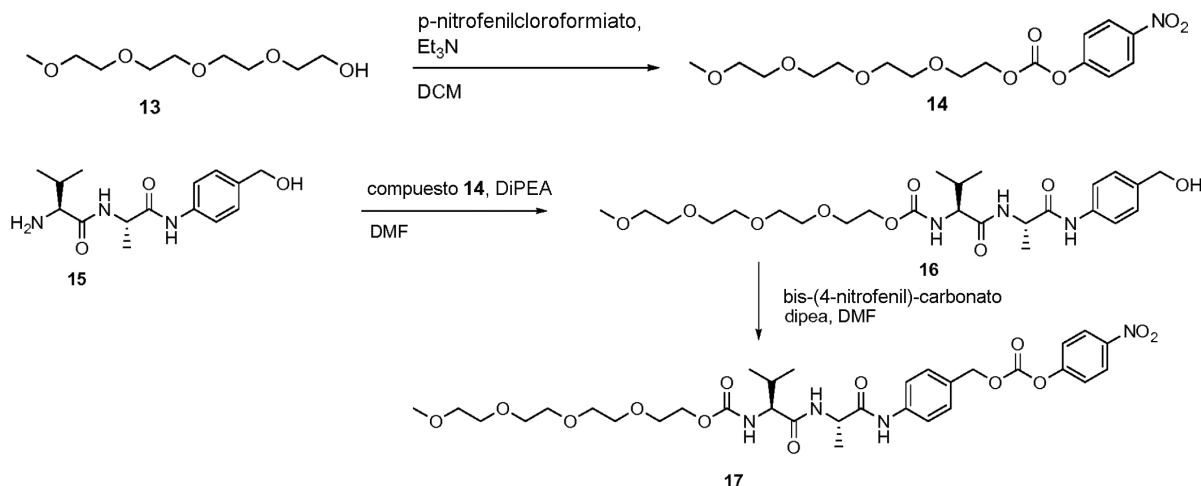
[0138] El compuesto **75**, la maleimida protegida, se sintetizó como se describe en Elduque et al. Bioconjugate Chem. 2013; 24: 832-839. El espectro de RMN fue idéntico al espectro en esta referencia de la literatura.

[0139] El fármaco-CS protegido con Boc-Mom (**11**) (1,0 g, 1,16 mmol, 1 eq.) y maleimida protegida **75** (0,34 g, 1,75 mmol, 1,5 eq.) se disolvieron en THF seco (20 ml), seguido de la concentración al vacío y el secado al vacío. El residuo sólido se redisolvió en THF seco (20 ml) bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió trifenilfosfina (0,46 g, 1,75 mmol, 1,5 eq.) y la mezcla resultante se enfrió en un baño de hielo. A continuación, se añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) (0,35 g, 1,75 mmol, 1,5 eq.) a la mezcla y se calentó gradualmente a temperatura ambiente (RT), se continuó la agitación durante 30 min a RT. La mezcla se concentró al vacío, se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 95:5, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío, se coevaporaron con tolueno y se secaron al vacío para producir el compuesto **12** (1,06 mmol, 91%) como una espuma blanca.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,30-1,44 (9H, m, CH₃, Boc), 1,53 (3H, s, CCH₃), 1,56 (3H, s, CCH₃), 2,78-2,94 (8H, m, ArCH₃, NCH₃, 2 x CH_{exo}), 3,35-3,74 (13H, m, CHCl, 4 x NCH₂, 2 x OCH₂), 3,41 (3H, s, OCH₃) 3,79-3,84 (1H, m, CHCl), 4,45 (1H, t, H₁), 4,62-4,67 (1H, m, H₂), 5,16-5,21 (1H, m, H₂), 5,30 (2H, s, OCH₂O), 6,35 (2H, d, HC=CH), 7,17 (2H, d, H₃"), 7,31-7,37 (1H, m, H₇), 7,39-7,40 (1H, m, H₈), 7,57-7,59 (1H, m, H₈'), 7,71-7,82 (2H, m, H₆, H₇'), 7,99 (2H, d, H₂"'), 8,35 (1H, br s, H₄), 8,68 (1H, s, H₃'), 9,46 (1H, s, H₅'), 10,30 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 15,6, 15,7 (CCH₃), 22,4 (Ar-CH₃), 28,0, 28,1 (CH₃, Boc), 34,1, 34,6 (NCH₃), 37,5, 37,6 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 44,2 (C₁), 45,1, 45,5, 45,9, 46,3, 47,0 (NCH₂), 47,4 (CH₂Cl), 52,1 (CH_{exo}), 54,5 (C₂), 55,8 (OCH₃), 66,6, 68,0, 68,3 (OCH₂), 78,6, 78,6 (C_{Boc}), 86,9 (C_{exo}), 93,7 (OCH₂O), 110,6, 110,6 (C₄), 115,6 (C₃"'), 117,3 (C₅'), 117,5 (C₇'), 119,0 (C₃'), 120,7 (C₆), 122,3 (C_{9b}), 123,1 (C₈'), 124,6 (C₇), 125,8 (C_{5a}), 127,3 (C₆'), 127,4 (C₁"'), 129,6 (C₂"'), 129,7 (C_{9a}), 130,5 (C₈), 132,9, 132,9 (C₉), 140,5 (C_{8a}'), 140,6 (C=C_{exo}), 141,4 (C₂''), 141,9 (C_{3a}), 148,0, 148,1 (Ar-OC(O)N), 153,7 (C=O_{Boc}), 154,7, 155,0 (C₅), 159,6 (C₄"'), 161,9 (NC=O), 165,1 (Ar-NHC(O)-Ar), 174,7, 174,7 (C=O_{exo}).
 MS (ESI) *m/z*; calculado: 1034,41 [M+H]⁺, hallado: 1034,84 [M+H]⁺

Compuesto 17

[0140]



[0141] Una solución del compuesto **13** (2,01 g, 9,65 mmol, 1 eq.) en THF (25 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, después de lo cual, se añadieron 4-nitrofenilcloroformiato (2,14 g, 10,62 mmol, 1,1 eq.) y Et₃N (2,69 ml, 19,30 mmol, 2 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 2 h permitiendo que se calentara a RT. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/EtOAc, 1:0 a 1:1, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el producto intermedio **14** (2,5 g, 6,70 mmol, 69%) como un aceite amarillo. El compuesto **14** (1,34 g, 3,58 mmol, 1,05 eq.) y H-Val-Ala-PABA **15** (síntetizado como se describe en la US2014/0363454 (Igenica Biotherapeutics), 1,0 g, 3,41 mmol, 1 eq.) en DMF (20 ml) se enfriaron a 0°C en un baño de hielo, se añadió N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) (1,49 ml, 8,52 mmol, 2,5 eq.) a la solución y la mezcla se agitó durante 18 h permitiendo que se calentara gradualmente a RT. La mezcla se concentró al vacío, se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v) para producir el compuesto **16** (1,4 g, 2,65 mmol, 78%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,89 (3H, d, CH₃,_{Val}), 0,91 (3H, d, CH₃,_{Val}), 1,34 (3H, d, CH₃,_{Ala}), 1,98-2,03 (1H, m, β-H_{Val}), 3,25 (3H, s, OCH₃), 3,41-3,62 (14H, m, O-CH₂), 3,92 (1H, t, α-H_{Val}), 4,08-4,12 (2H, m, CH₂OC(O)NH), 4,44-4,49 (3H, m, Ar-CH₂, α-H_{Ala}), 5,10-5,14 (1H, m, -OH), 7,12-7,30 (3H, m, H₃, NH_{Val}), 7,57 (2H, d, H₂), 8,14 (1H, d, NH_{Ala}), 9,91 (1H, s, NH_{PABA}).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,1 (CH₃,_{Val}), 18,2 (CH₃,_{Ala}), 19,2 (CH₃,_{Val}), 30,4 (β-CH_{Val}), 49,0 (α-CH_{Ala}), 58,1 (OCH₃), 60,1 (α-CH_{Val}), 62,7 (Ar-CH₂), 63,6 (CH₂OC(O)NH), 68,9 (OCH₂), 69,7 (OCH₂), 69,9 (OCH₂), 69,9 (OCH₂), 71,4 (OCH₂), 119,0 (C₂), 127,0 (C₃), 137,5 (C₄), 137,6 (C₁), 156,4 (OC(O)NH) 171,0 (C=O_{Ala}), 171,1 (C=O_{Val}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 528,62 [M+H]⁺, hallado: 510,47 (-H₂O) [M+H]⁺

[0142] Una solución del compuesto **16** (1,3 g, 2,46 mmol, 1 eq.) en DMF (20 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron bis(4-nitrofenil) carbonato (1,50 g, 4,93 mmol, 2 eq.) y DIPEA (0,65 ml, 3,70 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se agitó durante 3 h y se calentó gradualmente a RT. La mezcla bruta se concentró al vacío, se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v) para producir el compuesto **17** (1,7 g, 2,45 mmol, rendimiento cuantitativo) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,87 (3H, d, CH₃,_{Val}), 0,92 (3H, d, CH₃,_{Val}), 1,35 (3H, d, CH₃,_{Ala}), 1,99-2,04 (1H, m, β-H_{Val}), 3,26 (3H, s, OCH₃), 3,36-3,62 (14H, m, O-CH₂), 3,92 (1H, t, α-CH_{Val}), 4,08-4,12 (2H, m, CH₂OC(O)NH),

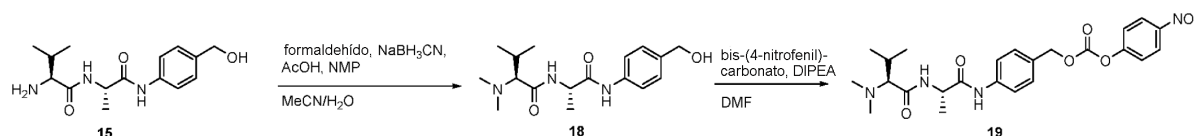
4,47 (1H, m, α -CH_{Ala}), 5,27 (2H, s, Ar-CH₂), 7,16-7,30 (1H, m, NH_{Val}), 7,44 (2H, d, H₃), 7,59 (2H, d, H₆), 7,68 (2H, d, H₂), 8,19 (1H, d, NH_{Ala}), 8,33 (2H, d, H₇), 10,09 (1H, s, NH_{PABA}).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,0 (CH_{3,Val}), 18,1 (CH_{3,Ala}), 19,2 (CH_{3,Val}), 30,4 (β -CH_{Val}), 49,1 (α -CH_{Ala}), 58,0 (OCH₃), 60,0 (α -CH_{Val}), 63,5 (CH₂OC(O)NH), 68,8 (OCH₂), 69,6 (OCH₂), 69,8 (OCH₂), 69,8 (OCH₂), 70,3 (Ar-CH₂), 71,3 (OCH₂), 119,1 (C₂), 122,6 (C₆), 125,4 (C₇), 129,3 (C₄), 129,5 (C₃), 139,5 (C₁), 145,2 (C₅), 152,0 (OC(O)O), 155,3 (C₈), 156,3 (OC(O)NH) 171,1 (C=O_{Val}), 171,3 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 693,73 [M+H]⁺, hallado: 693,63 [M+H]⁺

Compuesto 19

[0143]



[0144] A una solución de H-Val-Ala-PABA **15** (sintetizado como se describe en la US2014/0363454 (Igenica Biotherapeutics), 1,4 g, 4,77 mmol, 1 eq.) en MeCN/H₂O (1:1) (100 ml) se añadieron posteriormente N-metilmorfolina (1,05 ml, 9,54 mmol, 2 eq.), formaldehído (3,55 ml, 47,7 mmol, 10 eq.) y NaCNBH₃ (0,9 g, 14,32 mmol, 3 eq.) seguido por la adición gota a gota de ácido acético (0,55 ml, 9,54 mmol, 2 eq.). La mezcla resultante se agitó durante 30 min. Luego, la mezcla bruta se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v) para producir el compuesto **18** (1,55 g, rendimiento cuantitativo) como un sólido ceroso blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,84 (3H, d, CH_{3,Val}), 0,97 (3H, s, CH_{3,Val}), 1,35 (3H, d, CH_{3,Ala}), 1,98-2,11 (1H, m, β -H_{Val}), 2,39 (6H, br s, N(CH₃)₂), 3,20-3,60 (α -CH_{Val}), 4,45 (2H, ArCH₂), 4,46-4,55 (1H, m, α -CH_{Ala}), 5,12 (1H, s, OH), 7,26 (2H, d, H₃), 7,56 (2H, d, H₂), 8,29 (1H, br s, NH_{Ala}), 10,01 (1H, s, NH_{PABA}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 322,21 [M+H]⁺, hallado: 322,16 [M+H]⁺

[0145] Una solución del compuesto **18** (1,53 g, 4,77 mmol, 1 eq.) en DMF (20 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se añadieron bis(4-nitrofenil) carbonato (2,90 g, 9,54 mmol, 2 eq.) y DIPEA (1,25 ml, 7,16 mmol, 1,5 eq.). La mezcla resultante se agitó durante 3 h y se calentó gradualmente a RT. La mezcla se concentró al vacío, se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 8:2, v/v) para producir el compuesto **19** (2,2 g, 4,52 mmol, 95%) como un sólido ceroso amarillo.

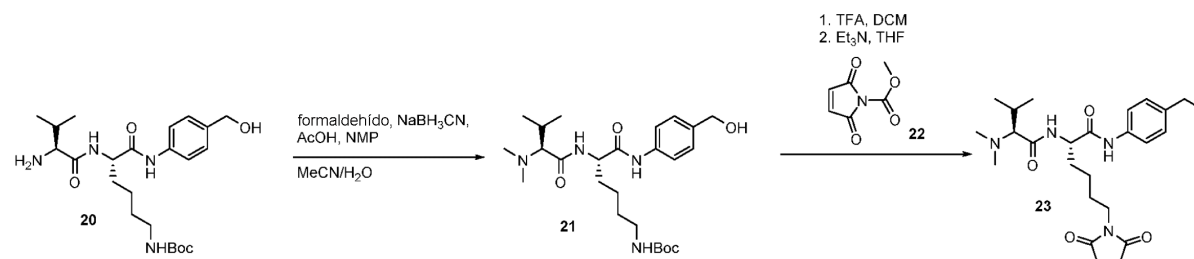
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,81 (3H, d, CH_{3,Val}), 0,91 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,34 (3H, d, CH_{3,Ala}), 1,93-2,01 (1H, m, β -H_{Val}), 2,29 (6H, br s, N(CH₃)₂), 3,20-3,60 (α -CH_{Val}), 4,50 (1H, m, α -CH_{Ala}), 5,24 (2H, s, ArCH₂), 7,42 (2H, d, H₃), 7,56 (2H, d, H₂), 7,64 (2H, d, H₂), 8,24 (1H, br s, NH_{Ala}), 8,30 (2H, d, H₃'), 10,14 (1H, s, NH_{PABA}).

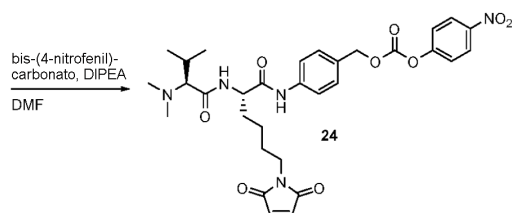
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,8 (CH_{3,Ala}), 20,0 (CH_{3,Val}), 27,1 (β -CH_{Val}), 41,8 (N(CH₃)₂), 49,3 (α -CH_{Ala}), 70,7 (Ar-CH₂), 73,1 (α -CH_{Val}), 119,5 (C₂), 122,9, 123,0 (C₂'), 125,8 (C₃'), 129,7 (C₄), 130,0 (C₃), 139,9 (C₁), 145,6 (C₁'), 152,4 (OC(O)O), 155,8 (C₄'), 162,8 (C=O_{Val}), 171,8 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 487,22 [M+H]⁺, hallado: 487,60 [M+H]⁺

Compuesto 24

[0146]





[0147] A una solución de H-Val-Lys(Boc)-PABA **20** (sintetizado como se describe en la WO2013/67597, páginas 80-82 (Ascend Biopharmaceuticals), 1,26 g, 2,80 mmol, 1 eq.) en MeCN/H₂O (1:1) (50 ml) se añadieron N-metilmorfolina (0,62 ml, 5,59 mmol, 2 eq.), formaldehído (2,08 ml, 28,0 mmol, 10 eq.) y NaCNBH₃ (0,53 g, 8,39 mmol, 3 eq.) seguido por la adición gota a gota de ácido acético (0,32 ml, 5,59 mmol, 2 eq.). La mezcla se agitó durante 30 min. La mezcla se concentró al vacío y se coevaporó con tolueno. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3 v/v) para producir el compuesto **21** (1,13 g, 2,36 mmol, 84%) como un sólido ceroso blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,80 (3H, d, CH_{3,Val}), 0,91 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,22-1,53 (13H, m, CH_{3,Boc} 2 x CH_{2,Lys}), 1,62-1,73 (2H, m, CH_{2,Lys}), 1,84-1,96 (1H, m, β-CH_{Val}), 2,26 (6H, br s, 2 x NCH₃), 2,52 (1H, s, α-CH_{Val}), 3,41 (2H, t, CH_{2,Lys}), 4,45 (3H, s, Ar-CH₂, α-CH_{Lys}), 6,77 (1H, br s, ε-NH_{Lys}), 7,25 (2H, d, H3), 7,54 (2H, d, H2), 8,09 (1H, br s, NH_{Lys}), 10,00 (1H, s, NH_{PABA}), 11,99 (1H, br s, OH).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 20,0 (CH_{3,Val}), 23,4 (CH_{2,Lys}), 27,2 (β-CH_{Val}), 28,7 (CH_{3,Boc}), 29,6 (CH_{2,Lys}), 32,0 (CH_{2,Lys}), 39,8 (CH_{2,Lys}), 41,8 (NCH₃), 53,5 (α-CH_{Lys}), 63,0 (Ar-CH₂), 73,4 (α-CH_{Val}), 77,8 (C_{Boc}), 119,3 (C2), 127,4 (C3), 137,8 (C4), 138,1 (C1), 156,0 (C=O_{Boc}), 171,2 (C=O_{Val}, C=O_{Lys}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 479,32 [M+H]⁺, hallado: 479,67 [M+H]⁺

[0148] Una solución del compuesto **21** (1,06 g, 2,22 mmol, 1 eq.) en DCM (20 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se añadió TFA (15 ml) y se agitó durante 30 min, luego se diluyó con DCM, se concentró al vacío y se coevaporó con DCM (dos veces). La sal de TFA obtenida se disolvió en THF (10 ml), se añadió carbamato de maleimida **22** (0,34 g, 2,22 mmol, 1 eq.) seguido de la adición de Et₃N (1,24 ml, 8,86 mmol, 4 eq.). La mezcla reactiva se agitó durante 48 h a 50°C, después de lo cual se añadieron 0,5 eq. adicionales de Et₃N y se agitó durante otras 24 h. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3 v/v) para producir el compuesto **23**, que se usó inmediatamente en el siguiente paso.

MS (ESI) *m/z*; calculado: 459,26 [M+H]⁺, hallado: 459,53 [M+H]⁺

[0149] Una solución del compuesto **23** (1,0 g, 2,18 mmol, 1 eq.) en DMF (10 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, y se añadieron bis(4-nitrofenil) carbonato (1,33 g, 4,36 mmol, 2 eq.) y DIPEA (0,57 ml, 3,27 mmol, 1,5 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 3 h a 0°C en un baño de hielo. Luego, la mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 8:2 v/v) para producir el compuesto **24** (0,55 g, 0,88 mmol, 40%) como un sólido blanco roto.

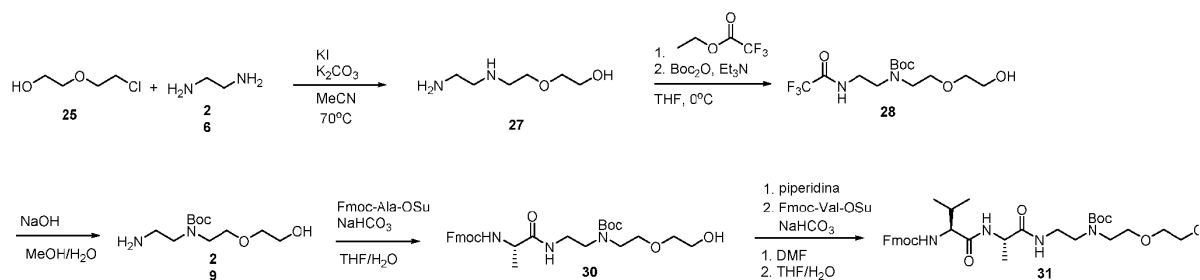
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,77 (3H, d, CH_{3,Val}), 0,88 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,20-1,42 (2H, m, CH_{2,Lys}), 1,44-1,76 (4H, m, 2 x CH_{2,Lys}), 1,84-1,96 (1H, m, β-CH_{Val}), 2,18 (6H, br s, 2 x NCH₃), 2,60 (1H, d, α-CH_{Val}), 3,41 (2H, t, CH_{2,Lys}), 4,39 (1H, m, α-CH_{Lys}), 5,25 (2H, s, Ar-CH₂), 7,00 (2H, s, HC=CH), 7,42 (2H, d, H3), 7,57 (2H, d, H6), 7,62 (2H, d, H2), 8,04 (1H, d, NH_{Lys}), 8,32 (2H, d, H7), 10,12 (1H, s, NH_{PABA}).

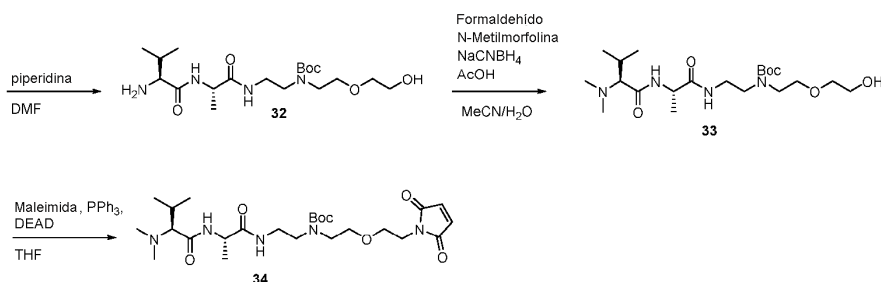
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 19,4, 19,5 (CH_{3,Val}), 23,0 (CH_{2,Lys}), 26,7 (β-CH_{Val}), 27,6 (CH_{2,Lys}), 31,1 (CH_{2,Lys}), 37,0 (CH_{2,Lys}), 41,3 (NCH₃), 52,8 (α-CH_{Lys}), 70,2 (ArCH₂), 72,9 (α-CH_{Val}), 119,0 (C2), 122,6 (C6), 125,4 (C7), 129,2 (C4), 129,5 (C3), 134,4 (HC=CH) 139,4 (C1), 145,2 (C5), 151,9 (OC(O)O), 155,3 (C8), 170,1 (C=O_{Val}), 171,0 (C=O_{maleimida}), 171,1 (C=O_{Lys}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 624,27 [M+H]⁺, hallado: 624,61 [M+H]⁺

Compuesto 34

[0150]





[0151] A una mezcla de etano-1,2-diamina **26** (2,15 ml, 32,1 mmol, 4 eq.), yoduro potásico (1,33 g, 8,03 mmol, 1 eq.) y carbonato potásico (2,22 g, 16,06 mmol, 2 eq.) en MeCN (25 ml) se le añadió gota a gota una solución de 2-(2-cloroeto)etanol **25** (0,85 ml, 8,03 mmol, 1 eq.). La mezcla resultante se agitó a 60°C durante 2 días. A continuación, la mezcla bruta se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y el residuo se recogió en EtOAc y se agitó durante 10 min. La suspensión se filtró y el filtrado se concentró al vacío para producir el compuesto **27** 2-(2-(2-aminoetilamino)eto)etanol (750 mg, 5,06 mmol, 63%) como un aceite incoloro.
MS (ESI) *m/z*; calculado: 149,13 [M+H]⁺, hallado: 149,23 [M+H]⁺

[0152] A una solución enfriada (0°C) de 2,2,2-trifluoroacetato (602 µl, 5,06 mmol, 1 eq.) en THF (10 ml) se le añadió gota a gota una solución de 2-(2-(2-aminoetilamino)eto)etanol **27** (750 mg, 5,06 mmol, 1 eq.) en THF (5 ml) y la mezcla se agitó durante 45 min. Luego, se añadió gota a gota dicarbonato de di-*tert*-butilo (1,33 g, 6,07 mmol, 1,2 eq.) en THF (5 ml) seguido de la adición de Et₃N (846 µl, 6,07 mmol, 1,2 eq.) y se agitó durante 1 h. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/EtOAc, 1:0 a 1:1, v/v) para producir el compuesto **28** (980 mg, 2,85 mmol, 56%) como un aceite amarillo.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,38 (9H, s, CH₃Boc), 3,25-3,36 (6H, m, CH₂NBoc, CH₂N), 3,39-3,43 (2H, m, CH₂O), 3,46-3,52 (4H, m, CH₂OH, CH₂O), 4,62 (1H, t, OH).
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 28,2, 28,4 (CH₃Boc), 38,2, 38,4 (CH₂NH), 46,2, 46,5, 46,8, 47,2 (CH₂NBoc), 60,6 (CH₂OH), 68,8, 69,2 (NCH₂CH₂O), 72,6 (CH₂O), 79,3 (CBoc), 112,1, 114,9, 117,8, 120,7 (CF₃), 155,0, 155,3 (C=OBoc), 156,3, 156,7, 157,0, 157,4 (C=O).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 367,15 [M+Na]⁺, hallado: 245,18 [M-Boc]⁺, 367,29 [M+Na]⁺

[0153] A una solución del compuesto **28** (900 mg, 2,61 mmol, 1 eq.) en MeOH (10 ml) se le añadió NaOH (157 mg, 3,92 mmol, 1,5 eq., disuelto en agua (5 ml)) y la mezcla se agitó durante 4 h a RT. La mezcla se concentró al vacío y se añadieron DCM y agua (saturada con NaCl). La capa de DCM se secó en MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para producir el compuesto **29** (660 mg, 100%) como un aceite amarillo.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,39 (9H, s, CH₃Boc), 2,64 (2H, t, CH₂NH₂), 3,10 (3H, br s, NH₂, OH), 3,12-3,19 (2H, m, CH₂NBoc), 3,27-3,33 (2H, m, CH₂NBoc), 3,39-3,44 (2H, m, CH₂O), 3,45-3,51 (4H, m, CH₂OH, CH₂O).
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 28,5 (CH₃Boc), 40,9 (CH₂NH₂), 47,3, 47,4 (CH₂NBoc), 50,6, 51,1 (CH₂NBoc), 60,7 (CH₂OH), 68,9, 69,3 (NCH₂CH₂O), 72,6 (CH₂O), 78,9 (CBoc), 155,2 (C=OBoc).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 249,18 [M+H]⁺, hallado: 249,30 [M+H]⁺

[0154] A una solución del compuesto **29** (650 mg, 2,62 mmol, 1 eq.) y NaHCO₃ (440 mg, 5,24 mmol, 2 eq.) en agua (6 ml) se le añadió Fmoc-Ala-OSu (1,18 g, 2,88 mmol, 1,1 eq.) en THF (6 ml) y la mezcla se agitó a RT durante toda la noche. Luego, el THF se evaporó, se añadió agua y se extrajo con EtOAc (dos veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó (en MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v) para producir el compuesto **30** (1,2 g, 2,22 mmol, 85%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,21 (3H, d, CH₃Ala), 1,39 (9H, s, CH₃Boc), 3,11-3,52 (12H, m, CH₂NH, CH₂NBoc, CH₂O, CH₂OH), 3,94-4,06 (1H, m, α-CHAla), 4,18-4,30 (3H, m, CH_{Fmoc}, CH₂Fmoc), 4,60 (1H, t, OH), 7,31-7,36 (2H, m, CH_{Ar}), 7,39-7,50 (3H, m, CH_{Ar}, NHAla), 7,71-7,76 (2H, m, CH_{Ar}), 7,86-7,95 (3H, m, CH_{Ar}, NH).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,7 (CH₃Ala), 28,5 (CH₃Boc), 37,7, 38,0 (CH₂NH), 47,1 (CH_{Fmoc}), 47,3, 47,5 (CH₂NBoc), 50,6 (α-CHAla), 60,7 (CH₂OH), 66,1 (CH₂Fmoc), 68,8, 69,2 (NCH₂CH₂O), 72,6 (CH₂O), 79,1 (CBoc), 120,6 (CH_{Ar}), 125,8 (CH_{Ar}), 127,5 (CH_{Ar}), 128,1 (CH_{Ar}), 141,2 (C_{Ar}), 144,3, 144,4 (C_{Ar}), 155,1, 155,2 (C=OBoc), 156,1 (C=OFmoc), 173,0 (C=OAla).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 564,27 [M+Na]⁺, hallado: 442,47 [M-Boc]⁺, 564,55 [M+Na]⁺

[0155] A una solución del compuesto **30** (1,2 g, 2,16 mmol, 1 eq.) en DMF (10 ml) se le añadió piperidina (4,4 ml, 44,3 mmol, 20 eq.) y se agitó durante 90 min. La mezcla se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se redisolvió en agua (12 ml) y se extrajo dos veces con éter. Una solución de Fmoc-Val-OSu (0,94 g, 2,16 mmol, 1 eq.) en THF (16 ml) se añadió luego a la capa de agua, seguido de la adición de bicarbonato sódico (0,2 g, 2,38 mmol, 1,1 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 4 h a RT. A continuación, el THF se evaporó, se añadió agua y se extrajo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se

concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v) para producir el compuesto **31** (1,4 g, 2,19 mmol, rendimiento cuantitativo) como una espuma blanca.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,83-0,89 (6H, m, CH_{3,Val}), 1,21 (3H, d, CH_{3,Ala}), 1,39 (9H, s, CH_{3,Boc}), 1,95-2,03 (1H, m, β-H_{Val}), 3,10-3,51 (14H, m, CH₂NH₂, CH₂N_{Boc}, CH₂O, CH₂OH), 4,18-4,30 (4H, m, α-CH_{Ala}, CH_{Fmoc}, CH_{2,Fmoc}), 4,60 (1H, t, OH), 7,30-7,36 (2H, m, CH_{Ar}), 7,39-7,47 (3H, m, CH_{Ar}, NH_{Val}), 7,72-7,77 (2H, m, CH_{Ar}), 7,87-7,99 (4H, m, CH_{Ar}, NH_{Ala}, NH).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,6 (CH_{3,Val}), 18,9 (CH_{3,Ala}), 19,7 (CH_{3,Val}), 28,5 (CH_{3,Boc}), 30,8 (β-CH_{Val}), 37,5, 38,0 (CH₂NH), 47,2 (CH_{Fmoc}), 47,0, 47,3 (CH₂N_{Boc}), 48,6 (α-CH_{Ala}), 60,5 (α-CH_{Val}), 60,7 (CH₂OH), 66,2 (CH_{2,Fmoc}), 68,9, 69,2 (NCH₂CH₂O), 72,6 (CH₂O), 79,1 (C_{Boc}), 120,5 (CH_{Ar}), 125,8 (CH_{Ar}), 127,5 (CH_{Ar}), 128,1 (CH_{Ar}), 141,2, 141,2 (C_{Ar}), 144,2, 144,4 (C_{Ar}), 155,1 (C=O_{Boc}), 156,6 (C=O_{Fmoc}), 171,1 (C=O_{Val}), 172,5 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 641,35 [M+H]⁺, hallado: 641,59 [M+H]⁺

[0156] A una solución del compuesto **31** (1,4 g, 2,19 mmol, 1 eq.) en DMF (10 ml) se le añadió piperidina (4,3 ml, 43,7 mmol, 20 eq.) y se agitó durante 2 h. La mezcla bruta se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y el residuo sólido se lavó con Et₂O, se filtró y se secó al vacío para producir el compuesto **32** (0,68 g, 1,63 mmol, 74%) como un sólido gris.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,76 (3H, d, CH_{3,Val}), 0,88 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,18 (3H, d, CH_{3,Ala}), 1,39 (9H, s, CH_{3,Boc}), 1,90-1,97 (1H, m, β-H_{Val}), 2,99 (1H, d, α-CH_{Val}), 3,10-3,52 (12H, m, CH₂NH, CH₂N_{Boc}, CH₂O, CH₂OH), 4,22-4,30 (1H, m, α-CH_{Ala}), 4,62 (1H, br s, OH), 7,98-8,05 (2H, m, NH_{Ala}, NH).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 17,2 (CH_{3,Val}), 19,3 (CH_{3,Ala}), 19,9 (CH_{3,Val}), 28,5 (CH_{3,Boc}), 31,7 (β-CH_{Val}), 37,6, 38,0 (CH₂NH), 47,0, 47,2, 47,4 (CH₂N_{Boc}), 48,1 (α-CH_{Ala}), 60,1 (α-CH_{Val}), 60,7 (CH₂OH), 68,9, 69,2 (NCH₂CH₂O), 72,6 (CH₂O), 79,1 (C_{Boc}), 155,1, 155,2 (C=O_{Boc}), 172,7 (C=O_{Ala}), 174,3 (C=O_{Val}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 419,29 [M+H]⁺, hallado: 419,58 [M+H]⁺

[0157] A una solución del compuesto **32** (680 mg, 1,63 mmol, 1 eq.) en MeCN/H₂O (50 ml, 1:1, v/v) se le añadió posteriormente N-metilmorfolina (357 μl, 3,25 mmol, 2 eq.), formaldehído (1,21 ml, 16,25 mmol, 10 eq.) y NaCNBH₃ (306 mg, 4,87 mmol, 3 eq.) seguido por la adición gota a gota de ácido acético (186 μl, 3,25 mmol, 2 eq.). La mezcla resultante se agitó durante 15 min. La mezcla bruta se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 8:2, v/v). El producto se coevaporó de nuevo con tolueno para producir el compuesto **33** (680 mg, 1,52 mmol, 94%) como un aceite incoloro.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,77 (3H, d, CH_{3,Val}), 0,88 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,20 (3H, d, CH_{3,Ala}), 1,38 (9H, s, CH_{3,Boc}), 1,89-1,98 (1H, m, β-H_{Val}), 2,24 (6H, s, N(CH₃)₂), 2,63-2,72 (1H, d, α-CH_{Val}), 3,08-3,62 (12H, m, CH₂NH, CH₂N_{Boc}, CH₂O, CH₂OH), 4,28-4,34 (1H, m, α-CH_{Ala}), 7,87-8,01 (2H, m, NH_{Ala}, NH).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 19,4 (CH_{3,Val}), 19,4 (CH_{3,Ala}), 20,0 (CH_{3,Val}), 27,0 (β-CH_{Val}), 28,5 (CH_{3,Boc}), 37,5, 37,9 (CH₂NH), 41,8 (NCH₃), 46,9, 47,3, 47,5 (CH₂N_{Boc}), 48,2 (α-CH_{Ala}), 60,7 (CH₂OH), 68,9, 69,2 (NCH₂CH₂O), 72,6 (CH₂O), 73,4 (α-CH_{Val}), 79,1 (C_{Boc}), 155,1 (C=O_{Boc}), 169,2 (C=O_{Val}), 172,6 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 447,32 [M+H]⁺, hallado: 447,85 [M+H]⁺

[0158] Una solución del compuesto **33** (680 mg, 1,52 mmol, 1 eq.) en THF seco (20 ml) se puso bajo una atmósfera de nitrógeno y se añadieron maleimida (192 mg, 1,98 mmol, 1,3 eq.) y trifenilfosfina (519 mg, 1,98 mmol, 1,3 eq.). La mezcla se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadió gota a gota DEAD (2,2 M en tolueno) (900 μl, 1,98 mmol, 1,3 eq.) y se agitó durante 30 min a RT. La mezcla bruta se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v) para producir el compuesto **34** (280 mg, 0,53 mmol, 35%) como un sólido ceroso incoloro.

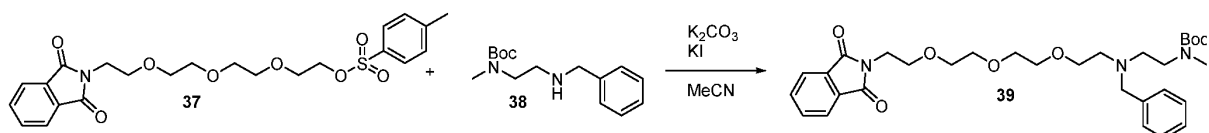
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,76 (3H, dd, CH_{3,Val}), 0,87 (3H, dd, CH_{3,Val}), 1,13-1,30 (3H, m, CH_{3,Ala}), 1,38 (9H, s, CH_{3,Boc}), 1,86-2,01 (1H, m, β-H_{Val}), 2,18 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,57 (1H, d, α-CH_{Val}), 3,05-3,71 (12H, m, NCH₂, OCH₂), 4,27-4,35 (1H, m, α-CH_{Ala}), 7,02 (2H, s, HC=CH), 7,87 (2H, br s, NH_{Ala}, C(=O)NHCH₂).

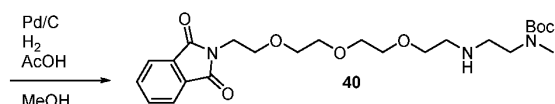
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 19,4 (CH_{3,Ala}), 19,7 (CH_{3,Val}), 20,0 (CH_{3,Val}), 27,1 (β-CH_{Val}), 28,5 (CH_{3,Boc}), 37,3, 37,4 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 37,8 (NHCH₂), 41,8 (N(CH₃)₂), 46,9, 47,1, 46,5 (NCH₂), 48,0 (α-CH_{Ala}), 67,3, 68,6, 68,9 (OCH₂), 73,5 (α-CH_{Val}), 79,1 (C_{Boc}), 135,0 (HC=CH), 155,7 (C=O_{Boc}), 169,7 (C=O_{Val}), 171,3 (C=O_{maleimida}), 172,7 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 526,32 [M+H]⁺, hallado: 526,65 [M+H]⁺

Compuesto 40

[0159]





[0160] La síntesis de ftalimida-tetraetilenglicol-tosilato **37** se describe en varios procedimientos de la literatura. Por ejemplo en Kim et al. Organic Letters, 2007, 9 (22): 4419-4422.

[0161] Una mezcla de tert-butil 2-(bencilamino)etil(metil)carbamato **38** (664 mg, 2,51 mmol, 1 eq.), ftalimida-tetraetilenglicol-tosilato **37** (1,2 g, 2,51 mmol, 1 eq.), K₂CO₃ (695 mg, 5,03 mmol, 2 eq.) y KI (417 mg, 2,51 mmol, 1 eq.) en acetonitrilo (20 ml) se sometió a reflujo durante 3 días. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 8:2, v/v) para producir el compuesto **39** (1,4 g, 2,46 mmol, 98%) como un aceite incoloro.

MS (ESI) *m/z*; calculado: 570,32 [M+H]⁺, hallado: 570,50 [M+H]⁺

[0162] Paladio en carbono (262 mg, 0,25 mmol, 0,1 eq.) se suspendió en MeOH (10 ml) seguido por la adición del compuesto **39** (1,4 g, 2,46 mmol, 1 eq. en MeOH ((10 ml)) y ácido acético (422 µl, 7,37 mmol, 3 eq.). La mezcla resultante se agitó bajo hidrógeno durante 3 h. La mezcla se filtró sobre celita, se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío para producir el compuesto **40** (850 mg, 1,77 mmol, 72%).

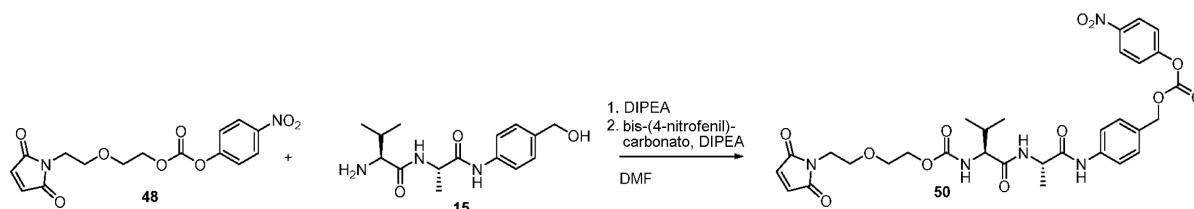
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,38 (CH₃,Boc), 2,59-2,65 (4H, m, CH₂NHCH₂), 2,77 (3H, br s, NCH₃), 3,19 (2H, t, NCH₂), 3,35-3,68 (10H, m, OCH₂), 3,62 (2H, t, (C=O)₂NCH₂CH₂), 3,75 (2H, t, (C=O)₂NCH₂), 7,82-7,89 (4H, m, H_{Ar}).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 28,5 (CH₃,Boc), 34,7 (NCH₃), 37,6 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 47,5 (NHCH₂), 48,8 (NCH₂), 67,4 ((C=O)₂NCH₂CH₂O), 70,0, 70,0, 70,1, 70,2, 70,4 (OCH₂), 78,7 (C_{Boc}), 123,5 (CH_{Ar}), 132,0 (C_{Ar}), 134,9 (CH_{Ar}), 155,3 (C=O_{Boc}), 168,2 (C=O_{Ftalimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 480,27 [M+H]⁺, hallado: 480,44 [M+H]⁺

Compuesto 50

[0163]



[0164] A una solución del compuesto **15** (3,58 g, 10,2 mmol, 1 eq.) en DMF (20 ml) se le añadió el compuesto **48** (3,16 g, 10,2 mmol, 1 eq.) y DIPEA (2,0 ml, 11,5 mmol, 1,1 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 2 h. Luego, bis-(4-nitrofenil)carbonato (4,68 g, 15,4 mmol, 1,5 eq.) y se agitó durante 18 h. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0, 9:1, v/v), se recogió en dioxano/agua y se liofilizó para producir el compuesto **50** (5,16 g, 7,7 mmol, 75%) como un sólido blanco roto.

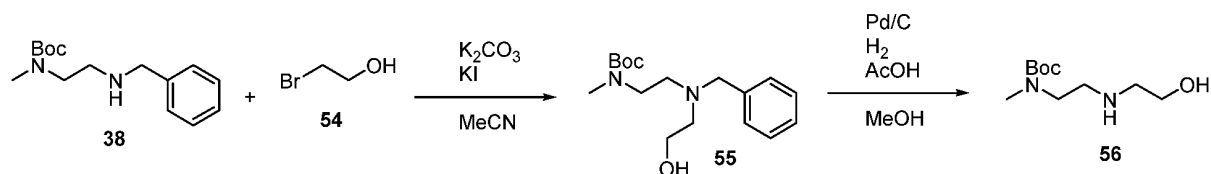
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,82-0,90 (6H, m, CH₃,Val), 1,32 (3H, d, CH₃,Ala), 1,92-2,03 (1H, m, β-H_{Val}), 3,50-3,60 (6H, m, NCH₂, OCH₂), 3,85-3,91 (1H, m, α-CH_{Val}), 3,96-4,07 (2H, m, CH₂OC(O)NH), 4,38-4,47 (1H, m, α-CH_{Ala}), 5,25 (1H, s, Ar-CH₂), 7,02 (2H, s, HC=CH), 7,17 (1H, d, NH_{Val}), 7,42 (2H, d, H₃), 7,57 (2H, d, H₂'), 7,64 (2H, d, H₂), 8,16 (1H, d, NH_{Ala}), 8,31 (2H, d, H₃'), 10,06 (1H, s, NH_{PABA}).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,5 (CH₃,Val), 19,6 (CH₃,Ala), 30,8 (β-CH_{Val}), 37,1 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 49,5 (α-CH_{Ala}), 60,4 (α-CH_{Val}), 63,8 (CH₂OC(O)NH), 67,4, 68,8 (OCH₂), 70,7 (ArCH₂O), 119,5 (C₂), 123,1 (C₂'), 125,9 (C₃'), 129,8 (4), 129,9 (C₃), 135,0 (HC=CH), 139,9 (C₁), 145,6 (C₁'), 152,4 (OC(O)O), 155,8 (C₄'), 156,6 (OC(O)NH), 171,3 (C=O_{maleimida}), 171,5 (C=O_{Val}), 171,7 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 670,24 [M+H]⁺, hallado: 670,30 [M+H]⁺

Compuesto 56

[0165]



[0166] Una mezcla de compuesto **38** (2,05 g, 7,75 mmol, 1 eq.), 2-bromoetanol (**54**, 551 μ l, 7,75 mmol, 1 eq.), K_2CO_3 (2,14 g, 15,5 mmol, 2 eq.) y KI (1,29 g, 7,75 mmol, 1 eq.) se disolvió en acetonitrilo (20 ml) y se calentó a reflujo durante 72 h. La mezcla se enfrió a RT y se concentró al vacío. El producto bruto se disolvió en DCM, se lavó con agua (2x) y salmuera, se secó en $MgSO_4$, se filtró y se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/EtOAc, 1:0 a 0:1 v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **55** (1 g, 3,24 mmol, 42%) como un aceite naranja.

MS (ESI) m/z ; calculado: 309,22 $[M+H]^+$, hallado: 309,38 $[M+H]^+$

[0167] A una suspensión de Pd/C (345 mg, 0,32 mmol, 0,1 eq.) en MeOH (50 ml) se le añadió una solución del compuesto **55** (1 g, 3,24 mmol, 1 eq. en MeOH 50 ml) seguido de la adición de ácido acético (557 μ l, 9,73 mmol, 3 eq.). La mezcla resultante se agitó durante 4 h bajo una atmósfera de hidrógeno. Luego, la mezcla se filtró sobre celita, se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, gradiente), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir OEGCS (**56**) (720 mg, 3,3 mmol, rendimiento cuantitativo) como un aceite.

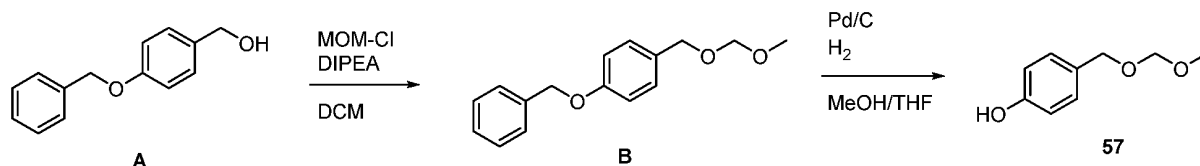
1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 1,39 (9H, s, CH_3 , Boc), 2,63 (2H, t, NCH_2CH_2OH), 2,68 (2H, t, NCH_2CH_2N), 2,78 (3H, br s, NCH_3), 3,24 (2H, t, NCH_2), 3,46 (2H, t, CH_2OH), 4,25 (2H, br s, NH, OH).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ = 28,5 (CH_3 , Boc), 34,7 (NCH_3), 46,8, 47,2, 47,8, 48,3 ($NHCH_2$), 51,5 (NCH_2), 60,3 (CH_2OH), 78,8 (C_{Boc}), 155,3 ($C=O_{Boc}$).

MS (ESI) m/z ; calculado: 219,17 $[M+H]^+$, hallado: 219,28 $[M+H]^+$

Compuesto **57**

[0168]



[0169] El compuesto **A** está comercialmente disponible de Acros Organics (CAS n.º 836-43-1, código compl. 18196).

[0170] Una solución del compuesto **A** (2,73 g, 12,7 mmol, 1 eq.) en DCM (20 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, y se añadió DIPEA (6,68 ml, 38,2 mmol, 3 eq.) seguido de la adición gota a gota de MOM-Cl (1,45 ml, 19,1 mmol, 1,5 eq.). La mezcla se agitó durante 24 h a RT. A continuación, se añadieron agua y DCM y las capas se separaron. La capa de DCM se lavó con una solución de HCl 1M, una solución saturada de $NaHCO_3$, agua y salmuera y se secó en Na_2SO_4 . La capa de DCM se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (C7/EtOAc, 1:0 a 9:1, v/v) y las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **B** (2,6 g, 10,1 mmol, 79%) como un aceite incoloro.

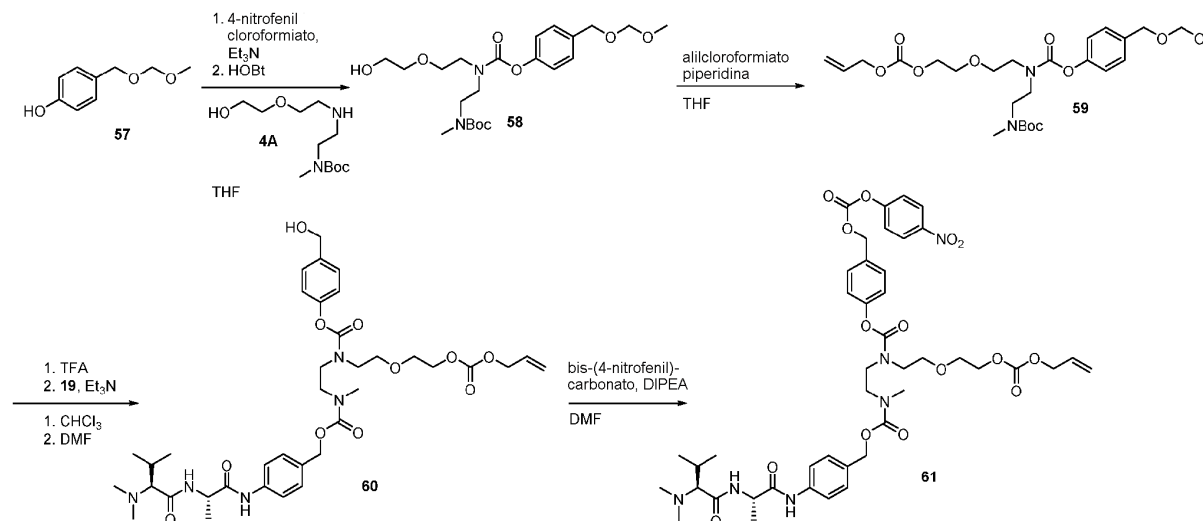
1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): 3,40 (3H, s, OCH_3), 4,52 (2H, s, $ArCH_2$), 4,68 (2H, s, OCH_2O), 5,06 ($ArCH_2$, bencilo), 6,96 (2H, d, H2), 7,26-7,44 (7H, m, H3, $H_{bencilo}$).

[0171] A una suspensión de Pd/C (0,21 g, 2,01 mmol, 0,2 eq.) en MeOH (6 ml) se le añadió el compuesto **B** (2,6 g, 10,07 mmol, 1 eq.) en THF (12 ml). La mezcla se purgó con hidrógeno 3 veces y se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 4 h. La suspensión se filtró sobre celita, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (C7/EtOAc, 1:0 a 3:1, v/v). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **57** (1,68 g, 9,99 mmol, 99%) como un aceite incoloro.

1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): 3,42 (3H, s, OCH_3), 4,52 (2H, s, $ArCH_2$), 4,70 (2H, s, OCH_2O), 6,55 (1H, br s, OH), 6,75 (2H, d, H2), 7,20 (2H, d, H3).

Compuesto 61

[0172]



[0173] Una solución del compuesto **57** (1,68 g, 10 mmol, 1 eq.) en THF (25 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron 4-nitrofenilcloroformiato (2,12 g, 10,5 mmol, 1,05 eq.) y Et₃N (4,18 ml, 30 mmol, 3 eq.) y la mezcla se agitó a 0°C en un baño de hielo durante 30 min. A continuación, se añadieron HOBt (1,53 g, 10 mmol, 1 eq.) y el separador de ciclación **4A** (sintetizado como se describe en la WO2011/133039, ejemplo 1 (Syntarga), 2,62 g, 10 mmol, 1 eq. en THF (10 ml)) y se agitaron a 50°C durante 90 min. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/EtOAc, 1:0 a 1:1, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **58** (3,1 g, 6,8 mmol, 68%) como un aceite amarillo.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,34-1,43 (9H, m, CH₃Boc), 2,80-2,87 (3H, m, NCH₃), 3,31 (3H, s, OCH₃), 3,29-3,66 (12H, m, CH₂N, CH₂O), 4,52 (2H, s, ArCH₂), 4,66 (2H, s, OCH₂O), 7,06-7,11 (2H, m, H₂), 7,33-7,38 (2H, m, H₃).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 28,4 (CH₃Boc), 34,4, 34,7, 34,9 (NCH₃), 45,7, 46,5, 46,6, 47,1, 47,3, 47,4 (NCH₂), 55,2 (OCH₃), 60,7, 60,7 (CH₂OH), 68,4 (ArCH₂), 68,7, 69,2 (NCH₂CH₂O), 72,7, 72,8 (OCH₂), 79,0, 79,0 (CBoc), 95,7 (OCH₂O), 122,0, 122,2 (C2), 128,9, 129,0 (C3), 135,4 (C4), 151,0 (C1), 154,3 (C=O), 155,2 (C=OBoc).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 457,25 [M+H]⁺, hallado: 357,16 (-Boc), 457,58 [M+H]⁺

[0174] Una solución del compuesto **58** (1 g, 2,19 mmol, 1 eq.) en THF (20 ml) se enfrió en un baño de hielo y se añadieron cloroformiato de alilo (0,26 ml, 2,41 mmol, 1,1 eq.) y piridina (0,35 ml, 4,38 mmol, 2 eq.) gota a gota. La mezcla se agitó durante 5 h a 0°C en un baño de hielo. La mezcla bruta se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/EtOAc, 1:0 a 1:1, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **59** (1,1 g, 2,0 mmol, 92%) como un aceite incoloro.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,33-1,41 (9H, m, CH₃Boc), 2,78-2,86 (3H, m, NCH₃), 3,30 (3H, s, OCH₃), 3,29-3,70 (10H, m, CH₂N, CH₂O), 4,22-4,26 (2H, m, (C=O)OCH₂CH₂O), 4,51 (2H, s, ArCH₂), 4,57-4,62 (2H, m, CH₂Alloc), 4,65 (2H, s, OCH₂O), 5,22-5,35 (2H, m, C=CH₂Alloc), 5,86-5,99 (1H, m, CHAlloc), 7,05-7,11 (2H, m, H₂), 7,32-7,36 (2H, m, H₃).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 28,5 (CH₃Boc), 34,5, 35,0 (NCH₃), 45,7, 46,5, 47,2 (NCH₂), 55,2 (OCH₃), 67,2 (C=O)OCH₂CH₂O, 68,3 (CH₂Alloc), 68,4 (ArCH₂), 68,6, 69,2 (OCH₂), 79,0, 79,0 (CBoc), 95,7 (OCH₂O), 118,8 (C=CH₂Alloc), 122,0, 122,2 (C2), 129,0 (C3), 132,6 (CHAlloc), 135,5 (C4), 151,0 (C1), 154,3 (C=O), 154,9 (C=OAlloc), 155,2 (C=OBoc).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 563,26 [M+Na]⁺, hallado: 441,50 [M-Boc]⁺, 563,57 [M+Na]⁺

[0175] El compuesto **59** (250 mg, 0,46 mmol, 1 eq.) se disolvió en cloroformo (6 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se añadió TFA (6 ml) y se agitó durante 8 h. La mezcla se diluyó con cloroformo, se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío. La sal de TFA resultante se redisolvió en DMF seco (2 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Una solución del compuesto **19** (225 mg, 0,46 mmol, 1 eq.) en DMF seco (2 ml) se añadió seguido de la adición gota a gota de Et₃N (0,14 ml, 1,39 mmol, 3 eq.). La mezcla resultante se agitó durante 3 h seguido de la adición de MeOH (2 ml) y una agitación adicional durante 15 min. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 8:2, v/v), las fracciones que contenían

el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **60** (190 mg, 0,26 mmol, 55%) como un aceite amarillo claro.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,82-0,86 (3H, m, CH_{3,Val}), 0,94-0,98 (3H, m, CH_{3,Val}), 1,33-1,37 (3H, m, CH_{3,Ala}), 2,06 (1H, br s, β-H_{Val}), 2,30 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,85-2,90 (3H, m, NCH₃), 3,30-3,72 (10H, m, CH₂N, CH₂O), 4,21-4,26 (2H, m, (C=O)OCH₂CH₂O), 4,46-4,61 (5H, m, α-CH_{Ala}, ArCH₂, CH_{2,Ala}), 4,95-5,03 (2H, m, CH_{2,PABA}) 5,20-5,35 (2H, m, OH, C=CH_{2,Ala}), 5,86-5,96 (1H, m, CH_{Ala}), 6,96-7,04 (2H, m, H_{2'}), 7,23-7,32 (4H, m, H₃, H_{3'}), 7,52-7,61 (2H, m, H₂), 8,55 (1H, br s, NH_{Ala}), 9,74 (1H, br s, OH), 10,16 (NH_{PABA}).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,6 (CH_{3,Val}), 18,6 (CH_{3,Ala}), 19,8 (CH_{3,Val}), 27,1 (β-CH_{Val}), 34,5, 34,7, 35,1, 35,2 (NCH₃), 41,7 (NCH_{3,Val}), 45,7, 46,4, 46,7, 47,1, 47,3 (NCH₂), 49,5 (α-CH_{Ala}), 62,9 (ArCH₂OH), 66,5, 66,7 (ArCH_{2,PABA}), 67,2 (C=O)OCH₂CH₂O), 68,3, 68,3 (CH_{2,Ala}), 68,5, 68,6, 69,1 (OCH₂), 72,7 (α-CH_{Val}), 118,7 (C=CH_{2,Ala}), 119,5 (C2) 121,8 (C2'), 127,6, 127,7 (C3), 128,9 (C3'), 132,0, 132,1 (C4, C4'), 132,6 (CH_{Ala}), 139,2 (C1), 139,8 (C4'), 150,3 (C1'), 154,3 (Ar-OC(O)N), 154,9 (C=O_{Ala}), 156,0, 156,1 (ArCH₂OC(O)N), 171,4 (C=O_{Ala}). MS (ESI) *m/z*; calculado: 744,38 [M+H]⁺, hallado: 744,72 [M+H]⁺

[0176] Una solución del compuesto **60** (190 mg, 0,26 mmol, 1 eq.) en DMF seco (2 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron bis(4-nitrofenil)carbonato (155 mg, 0,51 mmol, 2 eq.) y DIPEA (67 µl, 0,38 mmol, 1,5 eq.) y se agitaron durante 4 h. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **61** (202 mg, 0,22 mmol, 87%).

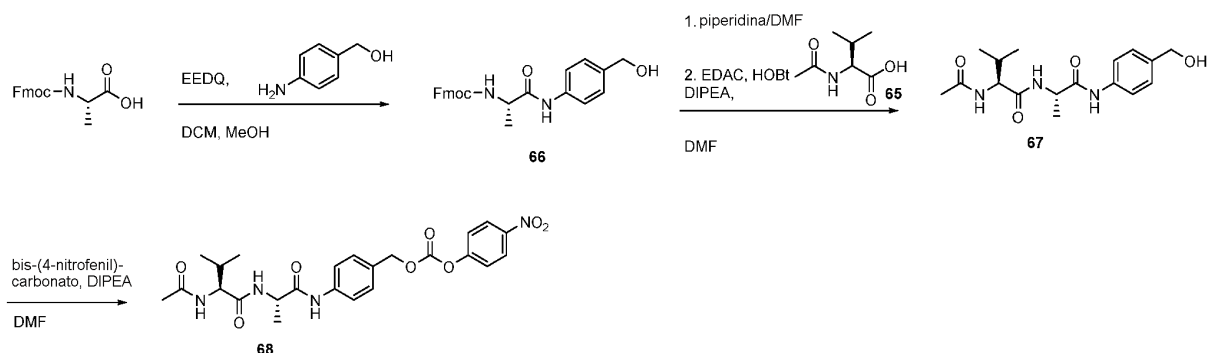
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,80 (3H, d, CH_{3,Val}), 0,90 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,32 (3H, d, CH_{3,Ala}), 1,94 (1H, br s, β-H_{Val}), 2,25 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,85-2,91 (3H, m, NCH₃), 3,30-3,71 (10H, m, CH₂N, CH₂O), 4,23 (2H, br s, (C=O)OCH₂CH₂O), 4,45-4,54 (1H, m, α-CH_{Ala}), 4,59 (2H, br s, CH_{2,Ala}), 4,95-5,03 (2H, m, CH_{2,PABA}), 5,31 (2H, s, ArCH₂), 5,20-5,34 (2H, m, C=CH_{2,Ala}), 5,86-5,96 (1H, m, CH_{Ala}), 7,07-7,15 (2H, m, H_{2'}), 7,23-7,33 (2H, m, H₃), 7,45-7,49 (2H, m, H_{3'}), 7,52-7,60 (4H, m, H₂, H_{2''}), 8,14 (1H, br s, NH_{Ala}), 8,29-8,35 (2H, m, H_{3''}), 10,09 (NH_{PABA}).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,5 (CH_{3,Ala}), 20,0 (CH_{3,Val}), 27,1 (β-CH_{Val}), 34,5, 34,8, 35,1, 35,3 (NCH₃), 41,8 (NCH_{3,Val}), 45,7, 45,9, 46,4, 46,7, 47,1, 47,43 (NCH₂), 49,2 (α-CH_{Ala}), 66,5, 66,7 (ArCH_{2,PABA}), 67,2 (C=O)OCH₂CH₂O), 68,3 (CH_{2,Ala}), 68,5, 68,6, 69,0 (OCH₂), 70,4 (ArCH₂), 73,3 (α-CH_{Val}), 118,8 (C=CH_{2,Ala}), 119,5 (C2) 122,3, 122,4 (C2'), 123,0 (C2''), 125,9 (C3''), 128,9, 128,9 (C3), 130,1 (C3'), 131,9, 132,0 (C4, C4'), 132,6 (CH_{Ala}), 139,2 (C1), 145,7 (C1''), 151,9 (C1'), 152,4 (OC(O)O), 154,3 (Ar-OC(O)N), 154,9 (C=O_{Ala}), 155,8 (C4''), 156,0, 156,1 (Ar-CH₂OC(O)N), 171,7 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 909,39 [M+H]⁺, hallado: 909,77 [M+H]⁺

Compuesto 68

[0177]



[0178] Una solución de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)propanoico (5 g, 16,1 mmol) y (4-aminofenil)methanol (2,77 g, 22,5 mmol, 1,4 eq) en DCM (90 ml) y MeOH (30 ml) se enfrió a 0°C, se añadió etil 2-etoxiquinolona-1(2H)-carboxilato (7,94 g, 32,1 mmol, 2 eq) y se agitó durante 18 h. La mezcla se concentró al vacío, se agitó en éter (100 ml) y se filtró para producir (S)-(9H-fluoren-9-il)metil 1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato (6 g, 14,41 mmol, 90%) como un sólido blanco roto.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,32 (3H, d, CH_{3,Ala}), 4,17-4,29 (4H, m, α-CH_{Ala}, CH_{Fmoc}, CH_{2 Fmoc}), 4,44 (2H, s, ArCH₂), 7,24-7,90 (13H, m, CH_{ArFmoc}, H₂, H₃, NH_{Ala}), 9,95 (1H, s, NH_{PABA}).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,1 (CH_{3,Ala}), 46,6 (CH_{2,Fmoc}), 50,7 (α-CH_{Ala}), 62,6 (CH₂), 65,6 (CH_{2 Fmoc}), 118,9 (C2), 120,1 (CH_{Fmoc}), 125,3 (CH_{Fmoc}), 126,9 (CH_{Fmoc}), 127,1 (C3), 127,6 (CH_{Fmoc}), 137,4, 137,6 (C1, C4), 140,7 (C_{Fmoc}), 143,8 (C_{Fmoc}), 143,9 (C_{Fmoc}), 155,8 (C=O_{Fmoc}), 171,4 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 417,18 [M+H]⁺, hallado: 417,48 [M+H]⁺

[0179] (S)-(9H-fluoren-9-il)metil 1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilcarbamato (6 g, 14,41 mmol) se disolvió en DMF (25 ml), se añadió piperidina (9,81 g, 115 mmol) y se agitó durante 1 h. La mezcla se concentró y

se coevaporó con tolueno. El producto bruto (sólido) se agitó en éter (150 ml) durante 1 h y se filtró. Este procedimiento se repitió una vez y el producto sólido obtenido se secó en alto vacío para producir el compuesto desprotegido **66** (2,4 g, 12,36 mmol, 86%) como un sólido blanco y se usó directamente en el siguiente paso.

[0180] Una solución del compuesto **65** (224 mg, 1,55 mmol, 1 eq.) y el compuesto desprotegido **66** (300 mg, 1,55 mmol, 1 eq.) en DMF (5 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron EDAC (474 mg, 2,47 mmol, 1,6 eq.), HOBt (284 mg, 1,85 mmol, 1,2 eq.) y DIPEA (1,35 ml, 7,72 mmol, 5 eq.). La mezcla resultante se agitó durante 18 h permitiendo que se calentara a RT. La mezcla bruta se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v) para producir el compuesto **67** en el rendimiento cuantitativo. MS (ESI) m/z ; calculado: 336,19 $[M+H]^+$, hallado: 336,36 $[M+H]^+$

[0181] El compuesto **67** (150 mg, 0,45 mmol, 1 eq.) se disolvió en DMF (2,5 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron bis(4-nitrofenil)carbonato (272 mg, 0,89 mmol, 2 eq.) y DIPEA (117 μ l, 0,67 mmol, 1,5 eq.) y la solución resultante se agitó durante 3 h permitiendo que se calentara a RT. Luego, la mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 95:5, v/v) para producir el compuesto **68** (200 mg, 0,4 mmol, 89%) como un sólido blanco roto.

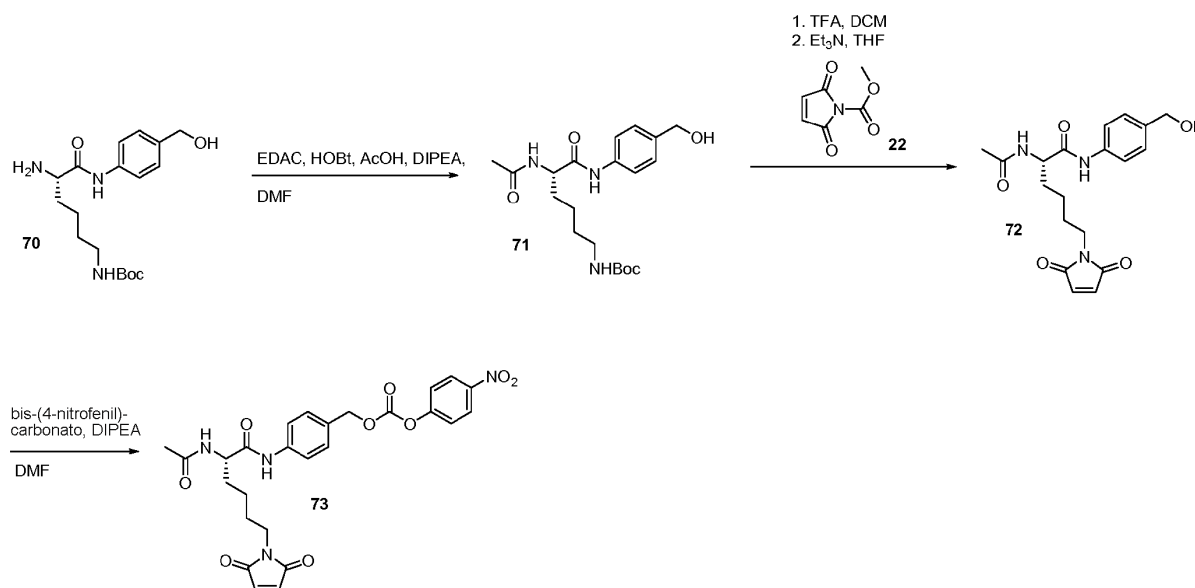
^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 0,85 (3H, d, CH_3_{Val}), 0,89 (3H, d, CH_3_{Val}), 1,32 (3H, d, CH_3_{Ala}), 1,89 (3H, s, $\text{CH}_3_{\text{Acetilo}}$), 1,90-1,99 (1H, m, $\beta\text{-H}_{\text{Val}}$), 4,15-4,21 (1H, m, $\alpha\text{-CH}_{\text{Val}}$), 4,37-4,43 (1H, m, $\alpha\text{-CH}_{\text{Ala}}$), 5,25 (2H, s, ArCH_2), 7,42 (2H, d, H3), 7,57 (2H, d, H2'), 7,65 (2H, d, H2), 7,90 (1H, d, NH_{Val}), 8,23 (1H, d, NH_{Ala}), 8,31 (2H, d, H3'), 9,99 (1H, s, NH_{PABA}).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ = 18,3 (CH_3_{Ala}), 18,7 (CH_3_{Val}), 19,6 (CH_3_{Val}), 23,1 ($\text{CH}_3_{\text{Acetilo}}$), 30,9 ($\beta\text{-CH}_{\text{Val}}$), 49,5 ($\alpha\text{-CH}_{\text{Ala}}$), 58,2 ($\alpha\text{-CH}_{\text{Val}}$), 70,7 (Ar-CH_2), 119,5 (C2), 123,1 (C2'), 125,9 (C3'), 129,7 (C4), 129,9 (C3), 139,9 (C1), 145,7 (C1'), 152,4 (OC(O)O), 155,8 (C4'), 170,0 ($\text{C=O}_{\text{Acetilo}}$), 171,5 (C=O_{Val}), 171,7 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) m/z ; calculado: 501,20 $[M+H]^+$, hallado: 501,40 $[M+H]^+$

Compuesto 73

[0182]



[0183] La síntesis de H-Lys(Boc)-PABA, compuesto **70**, se describe en Nair et al. Chem. Commun. 2015; 51: 2403-2406.

[0184] El compuesto **71** se obtuvo como un producto secundario del acoplamiento de H-Lys(Boc)-PABA **70** (1 eq.) y Me_2ValOH (1,2 eq.) usando EDAC (1,6 eq.), HOBt (1,2 eq.) y DIPEA (5 eq.) en DMF (20 ml) durante 18 h. Esta reacción secundaria fue causada por la presencia de AcOH en el Me_2ValOH . La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **71** (540 mg, 1,37 mmol, 40%) como un sólido blanco después de la cristalización de éter.

MS (ESI) m/z ; calculado: 394,24 $[M+H]^+$, hallado: 394,23 $[M+H]^+$

[0185] Una solución del compuesto **71** (540 mg, 1,37 mmol, 1 eq.) en cloroformo (12 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se diluyó con TFA (8 ml) y la mezcla se agitó durante 45 min. Luego, la mezcla reactiva se diluyó con DCM, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 1:1, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para dar la amina intermedia (300 mg, 1,02 mmol, 75%) como un aceite amarillo claro. El aceite se suspendió en THF (20 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron el compuesto **22** (159 mg, 1,02 mmol, 1 eq.) y Et₃N (570 µl, 4,09 mmol, 4 eq.) y se agitaron durante 20 min. La mezcla reactiva se calentó a 50°C durante 48 h. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **72** (90 mg, 0,24 mmol, 24%) como un sólido ceroso incoloro.

MS (ESI) *m/z*; calculado: 374,17 [M+H]⁺, hallado: 374,38 [M+H]⁺

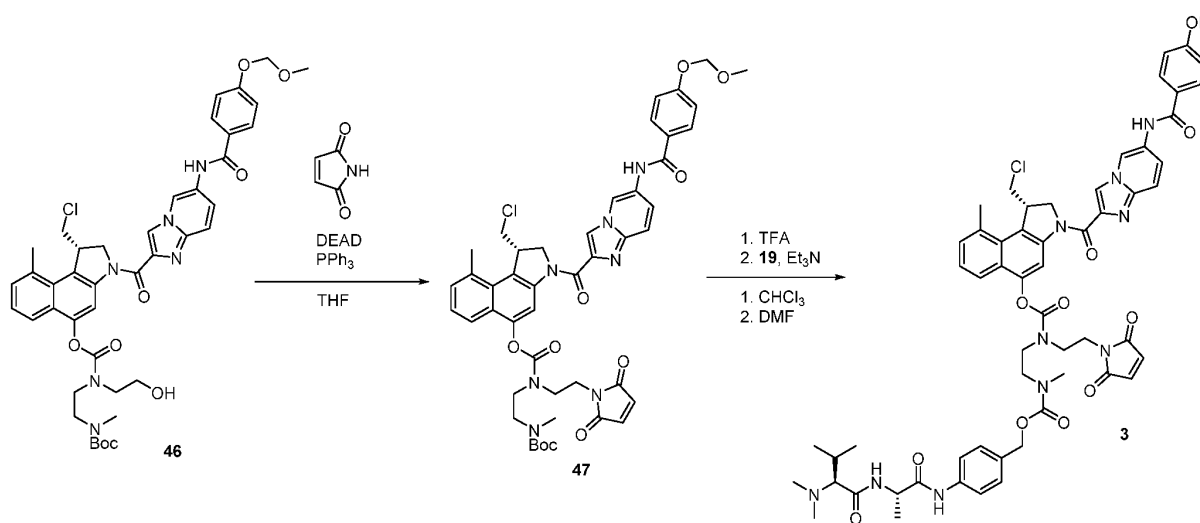
[0186] Una solución del compuesto **72** (90 mg, 0,24 mmol, 1 eq.) en DMF (2,5 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron bis(4-nitrofenil)carbonato (147 mg, 0,48 mmol, 2 eq.) y DIPEA (63 µl, 0,36 mmol, 1,5 eq.) y la solución resultante se agitó durante 3 h permitiendo que se calentara gradualmente a RT. Luego, la mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 9:1 v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **73** (56 mg, 0,10 mmol, 43%) como un sólido incoloro.

MS (ESI) *m/z*; calculado: 539,18 [M+H]⁺, hallado: 539,40 [M+H]⁺

Síntesis de compuestos conector-fármaco

Compuesto conector-fármaco **3**

[0187]



[0188] El compuesto **11** (530 mg, 0,93 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF seco (15 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se añadieron 4-nitrofenilcloroformiato (206 mg, 1,02 mmol, 1,1 eq.) y Et₃N (647 µl, 1,49 mmol, 5 eq.) y se agitaron durante 45 min. Luego se añadieron el compuesto **56** (263 mg, 1,21 mmol, 1,3 eq.) en THF seco (3 ml) y HOBt (156 mg, 1,02 mmol, 1,1 eq.) y la mezcla resultante se calentó a 45°C durante 2 h. Después la mezcla bruta se enfrió a RT, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 93:7, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el producto **46** (580 mg, 0,71 mmol, 77%) como una espuma blanca.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,32-1,45 (9H, m, CH₃Boc), 2,78-2,95 (6H, m, ArCH₃, NCH₃), 3,30-3,79 (9H, m, CHCl, NCH₂, OCH₂), 3,41 (3H, s, OCH₃), 3,81-3,86 (1H, m, CHCl), 4,47 (1H, t, H1), 4,64-4,70 (1H, m, H2), 4,89, 5,04 (1H, 2 x br s, OH), 5,17-5,21 (1H, m, H2), 5,31 (2H, s, OCH₂O), 7,18 (2H, d, H3"), 7,31-7,37 (1H, m, H7), 7,37-7,44 (1H, m, H8), 7,56-7,60 (1H, m, H8'), 7,71-7,86 (2H, m, H6, H7'), 8,00 (2H, d, H2"), 8,37 (1H, br s, H4), 8,70 (1H, s, H3'), 9,47 (1H, s, H5'), 10,32 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 22,9 (Ar-CH₃), 28,5, 28,6 (CH₃Boc), 34,5 (NCH₃), 44,7 (C1), 45,8, 46,2, 46,4 (NCH₂), 48,0 (CH₂Cl), 55,1 (C2), 56,3 (OCH₃), 59,1, 59,7 (CH₂OH), 79,1, 79,2 (C_{Boc}), 93,7 (OCH₂O), 111,0, 111,1 (C4), 116,2 (C3"), 117,8 (C5'), 118,0 (C7'), 119,6 (C3'), 121,3 (C6), 122,8 (C9b), 123,6 (C8'), 125,1 (C7), 126,3 (C5a), 127,8 (C6'), 127,9 (C1"), 130,1 (C2"), 130,3 (C9a), 131,0 (C8), 133,4 (C9), 141,0 (C2'), 141,9 (C8a'), 142,4 (C3a), 148,6, 148,6 (Ar-OC(O)N), 154,3, 154,4 (C5), 155,2 (C=O_{Boc}), 160,1 (C4"), 162,4 (NC=O), 165,6 (Ar-NHC(O)-Ar).

MS (ESI) m/z ; calculado: 815,32 $[M+H]^+$, hallado: 815,60 $[M+H]^+$

[0189] Una solución del compuesto **46** (200 mg, 0,25 mmol, 1 eq.), maleimida (31 mg, 0,32 mmol, 1,3 eq.) y trifetilfosfina (84 mg, 0,32 mmol, 1,3 eq.) en THF seco (4 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadió DEAD (2,2 M en tolueno, 145 µl, 0,32 mmol, 1,3 eq.) gota a gota y la mezcla se agitó durante 45 min a RT. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 95:5, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío, se coevaporaron con tolueno para producir el compuesto **47** (150 mg, 0,17 mmol, 68%) como una espuma blanca.

MS (ESI) m/z ; calculado: 894,32 $[M+H]^+$, hallado: 894,62 $[M+H]^+$

[0190] Una solución del compuesto **47** (150 mg, 0,17 mmol, 1 eq.) en cloroformo (4 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se diluyó con TFA (2 ml) y se agitó durante 3 h. La mezcla se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío. El producto intermedio se disolvió en DMF seco (2 ml) y se enfrió a 0°C en un baño de hielo seguido de la adición del conector activado **19** (98 mg, 0,20 mmol, 1,2 eq.) y Et₃N (47 µl, 0,34 mmol, 2 eq.). La mezcla reactiva se agitó durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto bruto **3**, que se purificó adicionalmente por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El acetonitrilo se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó, el sólido obtenido se recogió en dioxano/agua (6 ml, 2:1) y se liofilizó para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **3** (69 mg, 0,06 mmol, 38%) como un sólido blanco.

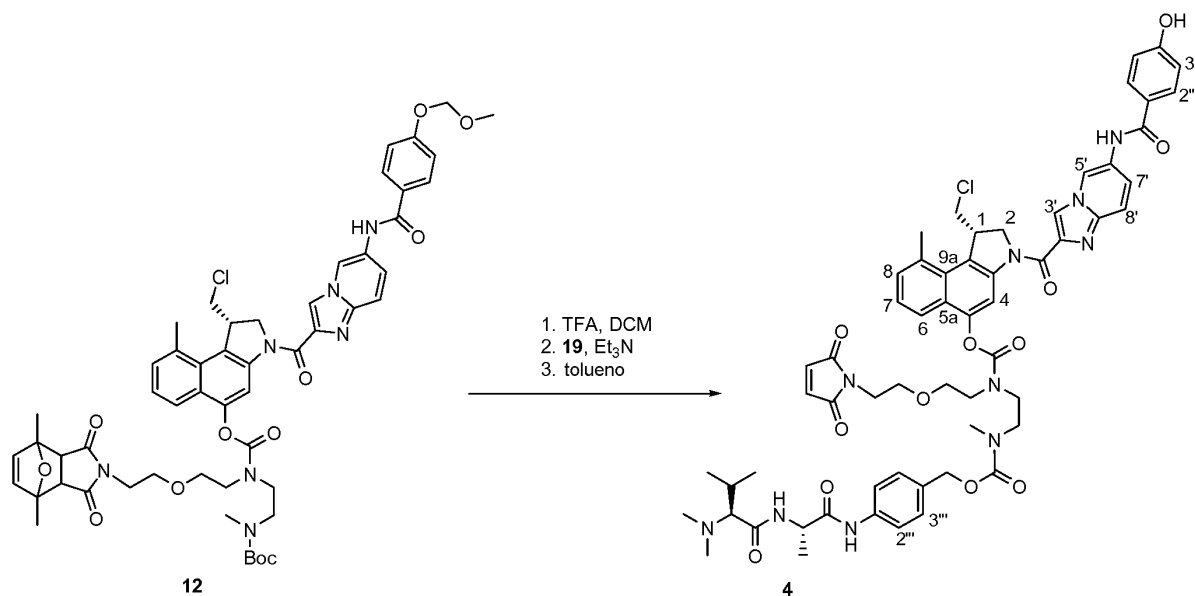
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,89 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,07 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,37 (3H, d, CH_{3,Ala}), 2,24-2,34 (1H, m, P-H_{Val}), 2,78 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,84 (3H, br s, ArCH₃), 2,84-2,98 (3H, d, C(O)NCH₃), 3,35-3,88 (11H, m, CH₂Cl, α-CH_{Val}, NCH₂), 4,44-4,51 (1H, m, H1), 4,55 (1H, t, α-CH_{Ala}), 4,61-4,69 (1H, m, H2), 4,97-5,10 (3H, m, H2, Ar-CH₂), 6,92 (2H, d, H3''), 6,98 (1H, s, HC=CH), 7,08 (1H, s, HC=CH), 7,19-7,80 (9H, m, H6, H7, H8, H7', H8', H2'', H3''), 7,91 (2H, d, H2''), 8,21-8,32 (1H, m, H4), 8,78-8,83 (1H, m, H3'), 8,99 (1H, d, NH_{Ala}), 9,54-9,68 (2H, m, H5', OH), 10,11-10,20 (1H, m, NHPABA), 10,30 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): 17,1 (CH_{3,Val}), 18,5 (CH_{3,Ala}), 19,6 (CH_{3,Val}), 22,8 (Ar-CH₃), 27,0 (β-CH_{Val}), 34,7 (NCH₃), 35,5 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 41,5 (NCH_{3,Val}), 42,1 (NCH_{3,Val}), 44,8 (C1), 45,6 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 49,8 (α-CH_{Ala}), 54,9 (C2), 66,4 (ArCH₂OC(O)N), 72,0 (α-CH_{Val}), 111,0 (C4), 115,6 (C3''), 117,0 (C7'), 117,8 (C5'), 119,3 (C3'), 119,5 (C2''), 121,1 (C6), 123,1 (C9b), 125,0 (C1''), 125,3 (C7, C8'), 126,3 (5a), 128,7 (C6'), 128,9 (C3'''), 130,2 (C9a), 130,3 (C2'), 131,1 (C8), 132,3 (C4'''), 133,4 (C9), 135,1, 135,2 (HC=CH), 138,9 (C1'''), 141,1 (C2', C8a'), 142,1 (C3a), 148,4 (Ar-OC(O)N), 154,2 (C5), 154,7 (Ar-CH₂OC(O)N), 161,4 (NC=O), 161,4 (C4''), 165,4 (C=O_{Val}), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 170,7 (C=O_{Ala}), 171,4, 171,5 (C=O_{maleimida}).

MS (ESI) m/z ; calculado: 1097,43 $[M+H]^+$, hallado: 1097,76 $[M+H]^+$

Compuesto conector-fármaco **4**

[0191]



[0192] Una solución del compuesto **12** (990 mg, 0,96 mmol, 1 eq.) en DCM (5 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se diluyó con TFA (5 ml). La mezcla se agitó durante 2,5 h y luego se diluyó con DCM, se concentró al vacío

y se coevaporó con tolueno. El compuesto activado **19** (512 mg, 1,05 mmol, 1,1 eq.) se disolvió en DMF seco (10 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y posteriormente se añadió Et₃N (533 µl, 4,06 mmol, 4 eq.) seguido de la adición gota a gota de la sal de TFA (que se disolvió en DMF seco (10 ml)). La mezcla resultante se agitó durante 3 h y se calentó gradualmente desde 0°C en un baño de hielo hasta RT. A continuación, la mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, gradiente), las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron al vacío y se coevaporaron con tolueno. Luego, el sólido obtenido se suspendió en tolueno (120 ml) y se calentó gradualmente a 90°C en 5 h. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El acetonitrilo se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó. El producto obtenido se disolvió en dioxano/agua (18 ml, 2:1) y se liofilizó una segunda vez para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **4** (475 mg, 0,42 mmol, 44%) como un sólido blanco.

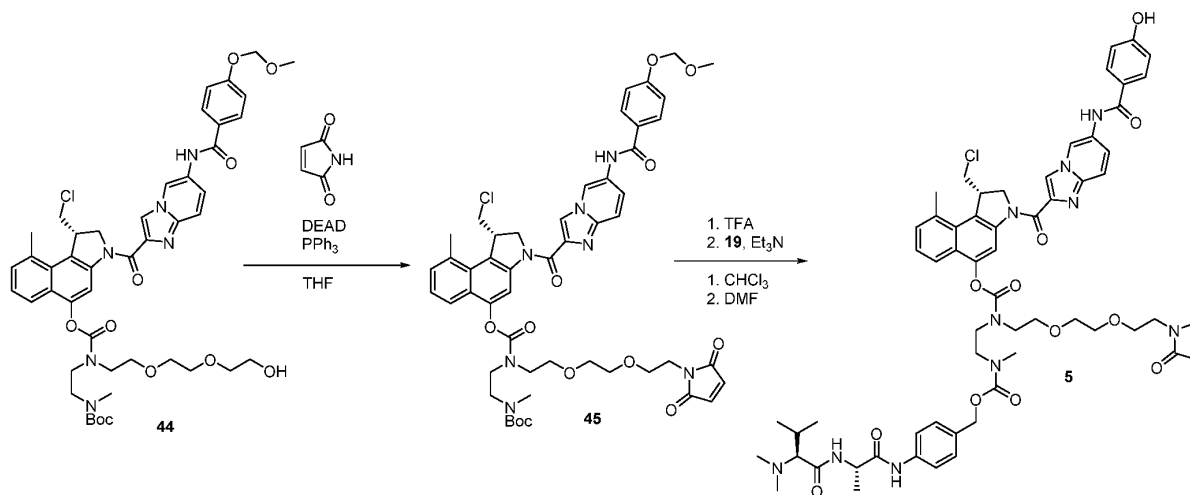
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,88 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,06 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,36 (3H, d, CH_{3,Ala}), 2,25-2,30 (1H, m, β-H_{Val}), 2,77 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,85 (3H, br s, ArCH₃), 2,85-2,92 (3H, d, C(O)NCH₃), 3,33-3,71 (14H, m, CHCl, α-CH_{Val}, NCH₂, OCH₂), 3,83 (1H, d, CHCl), 4,47-4,51 (1H, m, H1), 4,51-4,57 (1H, m, α-CH_{Ala}), 4,63-4,69 (1H, m, H2), 4,96-5,07 (3H, m, H2, Ar-CH₂), 6,89-6,97 (3H, m, HC=CH, H3"), 7,03 (1H, d, CH=CH), 7,17-7,59 (6H, m, H7, H8, H2", H3"), 7,62-7,80 (3H, m, H6, H7', H8'), 7,91 (2H, d, H2"), 8,28-8,39 (1H, m, H4), 8,79-8,81 (1H, m, H3'), 8,99 (1H, d, NH_{Ala}), 9,55-9,62 (2H, m, H5', OH), 10,11-10,18 (1H, m, NH_{PABA}), 10,30 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 17,1 (CH_{3,Val}), 18,5 (CH_{3,Ala}), 19,6 (CH_{3,Val}), 22,9 (Ar-CH₃), 27,0 (β-CH_{Val}), 34,4, 34,8, 35,2 (NCH₃), 37,1, 37,4 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 41,5 (NCH_{3,Val}), 42,1 (NCH_{3,Val}), 44,8 (C1), 47,4, 47,6 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 49,8 (α-CH_{Ala}), 54,9 (C2), 66,4, 66,5 (Ar-CH₂OC(O)N), 67,6, 68,4, 68,6 (OCH₂), 71,9 (α-CH_{Val}), 111,0 (C4), 115,6 (C3"), 117,0 (C7'), 117,8 (C5'), 119,5 (C3', C2"), 121,2 (C6), 123,0 (C9b), 124,9 (C1"), 125,3 (C7, C8'), 126,3 (C5a), 128,8 (C6'), 128,9, 129,0 (C3"), 130,2 (C9a), 130,3 (C2"), 131,1 (C8), 132,4 (C4"), 133,5 (C9), 134,9, 135,0 (HC=CH), 138,9 (C1"), 139,0 (C2'), 140,9 (C8a'), 142,1 (C3a), 148,5 (Ar-OC(O)N), 154,1, 154,3 (C5), 156,2 (Ar-CH₂OC(O)N), 161,3 (NC=O), 161,4 (C4"), 165,4 (C=O_{Val}), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 170,8 (C=O_{Ala}), 171,4 (C=O_{maleimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1141,45 [M+H]⁺, hallado: 1141,90 [M+H]⁺

Compuesto conector-fármaco **5**

[0193]



[0194] Una solución del compuesto **44** (720 mg, 0,80 mmol, 1 eq.), maleimida (10 mg, 1,04 mmol, 1,3 eq.) y trifenilfosfina (272 mg, 1,04 mmol, 1,3 eq) en THF seco (10 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadió DEAD (2,2 M en tolueno, 471 µl, 1,04 mmol, 1,3 eq.) gota a gota y se agitó durante 45 min a RT. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 95:5, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío, se coevaporaron con tolueno para producir el compuesto **45** (590 mg, 0,60 mmol, 75%) como una espuma blanca.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,29-1,45 (9H, m, CH_{3,Boc}), 2,78-2,95 (6H, m, ArCH₃, NCH₃), 3,42 (3H, s, OCH₃), 3,35-3,74 (17H, m, CHCl, NCH₂, OCH₂), 3,80-3,86 (1H, m, CHCl), 4,47 (1H, t, H1), 4,63-4,70 (1H, m, H2), 5,16-5,21 (1H, m, H2), 5,31 (2H, s, OCH₂O), 6,97-7,02 (2H, m, HC=CH), 7,18 (2H, d, H3"), 7,31-7,44 (2H, m, H7, H8), 7,57-7,61 (1H, m, H8'), 7,68-7,84 (2H, m, H6, H7'), 7,99 (2H, d, H2"), 8,35 (1H, br s, H4), 8,70 (1H, s, H3'), 9,47 (1H, s, H5'), 10,32 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 22,9 (Ar-CH₃), 28,5, 28,6 (CH_{3,Boc}), 34,6 (NCH₃), 37,2, 37,3 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 44,7 (C1), 45,5, 46,0, 47,5 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 55,1 (C2), 56,3 (OCH₃), 67,5, 68,6, 69,1, 69,9, 70,2, 70,3 (OCH₂), 79,1, 79,1 (C_{Boc}), 94,2 (OCH₂O), 111,0, 111,1 (C4), 116,2 (C3"), 117,8 (C5'), 118,0 (C7'), 119,6 (C3'), 121,2 (C6), 122,8 (C9b), 123,6 (C8'), 125,1 (C7), 126,3 (C5a), 127,8 (C6'), 127,9 (C1"), 130,1 (C2"), 130,3 (C9a), 131,0 (C8),

133,5 (C9), 134,9, 134,9 (HC=CH), 141,0 (C2'), 141,9 (C8a'), 142,4 (C3a), 148,5, 148,6 (Ar-OC(O)N), 154,3 (C5), 155,2 (C=O_{Boc}), 160,1 (C4''), 162,3 (NC=O), 165,6 (Ar-NHC(O)-Ar), 171,3, 171,3 (C=O_{Maleimida}).
MS (ESI) *m/z*; calculado: 982,37 [M+H]⁺, hallado: 982,80 [M+H]⁺

[0195] Una solución del compuesto **45** (200 mg, 0,20 mmol, 1 eq.) en cloroformo (2 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se diluyó con TFA (2 ml) y se agitó durante 3 h. La mezcla se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío. El producto intermedio se disolvió en DMF seco (2 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y el conector activado **19** (119 mg, 0,24 mmol, 1,2 eq.) y Et₃N (85 µl, 0,61 mmol, 3 eq.) se añadieron y la mezcla se agitó durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v) para producir el compuesto bruto **5**, que se purificó por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El MeCN se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó, el sólido obtenido se recogió en dioxano/agua (6 ml, 2:1) y se liofilizó para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **5** (18 mg, 0,013 mmol, 7%) como un sólido blanco.

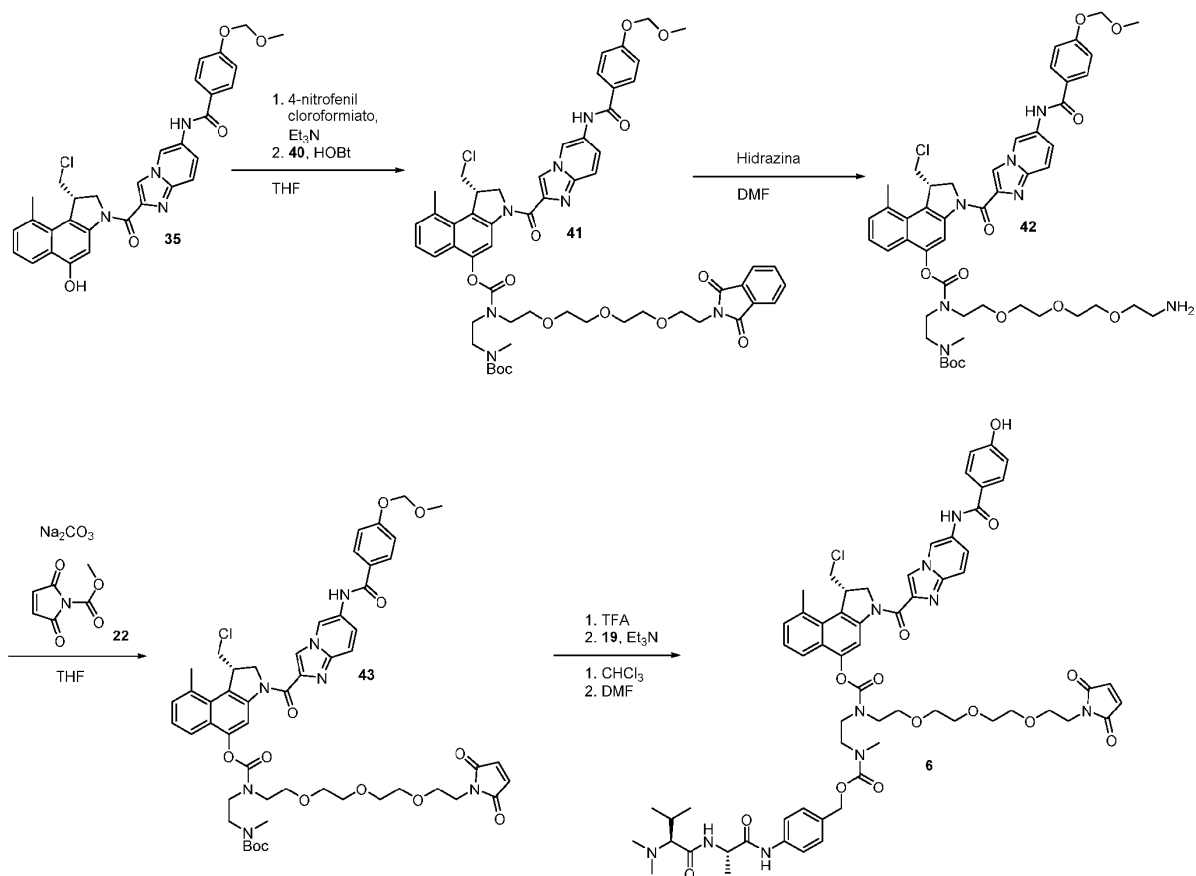
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,88 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,06 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,37 (3H, d, CH_{3,Ala}), 2,23-2,33 (1H, m, β-H_{Val}), 2,77 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,85 (3H, br s, ArCH₃), 2,85-2,98 (3H, d, C(O)NCH₃), 3,36-3,99 (19H, m, CH₂Cl, α-CH_{Val}, NCH₂, OCH₂), 4,46-4,51 (1H, m, H1), 4,55 (1H, t, α-CH_{Ala}), 4,63-4,69 (1H, m, H2), 4,97-5,18 (3H, m, H2, Ar-CH₂), 6,91 (2H, d, H3''), 6,95-7,01 (2H, m, HC=CH), 7,18-7,59 (6H, m, H7, H8, H2'', H3''), 7,62-7,80 (3H, m, H6, H7', H8'), 7,91 (2H, d, H2''), 8,28-8,39 (1H, m, H4), 8,72 (1H, s, H3'), 8,99 (1H, d, NH_{Ala}), 9,50 (1H, br s, H5'), 9,64 (1H, br s, OH), 10,11-10,30 (2H, m, NH_{PABA}, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 17,2 (CH_{3,Val}), 18,5 (CH_{3,Ala}), 19,7 (CH_{3,Val}), 22,9 (Ar-CH₃), 27,0 (β-CH_{Val}), 34,9, 35,3 (NCH₃), 37,3 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 41,6 (NCH_{3,Val}), 42,0 (NCH_{3,Val}), 44,8 (C1), 47,4, 47,6 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 49,8 (α-CH_{Ala}), 55,0 (C2), 66,5 (ArCH₂OC(O)N), 67,5, 69,0, 69,8, 70,1, 70,3 (OCH₂), 71,9 (α-CH_{Val}), 111,0 (C4), 115,5 (C3''), 117,7 (C7'), 117,7 (C5'), 119,5 (C3', C2''), 121,3 (C6), 122,9 (C9b), 124,1 (C8'), 125,1 (C7), 126,3 (C5a, C1''), 128,3 (C6'), 128,8 (C3'''), 130,3 (C9a), 130,3 (C2''), 131,1 (C8), 132,6 (C4'''), 133,5 (C9), 134,9, 135,0 (HC=CH), 138,9 (C1'''), 141,6 (C2', C8a'), 142,3 (C3a), 148,5 (Ar-OC(O)N), 154,5 (C5), 156,3 (Ar-CH₂OC(O)N), 158,1, 158,4, 158,8, 159,1 (TFA), 161,4 (NC=O), 161,4 (C4''), 165,4 (C=O_{Val}), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 170,7 (C=O_{Ala}), 171,3 (C=O_{maleimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1185,48 [M+H]⁺, hallado: 1186,79 [M+H]⁺

Compuesto conector-fármaco **6**

[0196]



[0197] Una solución del compuesto **35** (170 mg, 0,30 mmol, 1 eq.) en THF seco (5 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron 4-nitrofenilcloroformiato (66 mg, 0,33 mmol, 1,1 eq.) y Et₃N (207 µl, 1,49 mmol, 5 eq.) y se agitaron durante 30 min. A continuación, se añadieron una solución del compuesto **40** (186 mg, 0,39 mmol, 1,3 eq.) en THF seco (3 ml) y HOBt (50 mg, 0,33 mmol, 1,1 eq.) y la mezcla resultante se calentó a 45°C durante 2 h.

La mezcla se enfrió a RT, se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 95:5, v/v) para producir el compuesto **41** (325 mg, rendimiento cuantitativo).

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,30-1,44 (9H, m, CH₃, Boc), 2,78-2,95 (6H, m, ArCH₃, NCH₃), 3,35-3,77 (21H, m, CHCl, 4 x NCH₂, 6 x OCH₂), 3,41 (3H, s, OCH₃), 3,79-3,85 (1H, m, CHCl), 4,42-4,48 (1H, m, H1), 4,62-4,69 (1H, m, H2), 5,16-5,21 (1H, m, H2), 5,30 (2H, s, OCH₂O), 7,18 (2H, d, H3"), 7,29-7,41 (2H, m, H7, H8), 7,56-7,80 (1H, m, H8'), 7,67-7,86 (6H, m, H6, H7', H_{Ftalimida}), 7,99 (2H, d, H2"), 8,36 (1H, br s, H4), 8,68 (1H, s, H3'), 9,46 (1H, s, H5'), 10,30 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 22,9 (Ar-CH₃), 28,4, 28,6 (CH₃, Boc), 34,5 (NCH₃), 37,5, 37,6 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 44,7 (C1), 45,5, 46,0, 46,4, 47,5 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 55,1 (C2), 56,3 (OCH₃), 67,4, 68,5, 69,1, 70,0, 70,0, 70,2, 70,3, 70,3 (OCH₂), 79,1, 79,1 (C_{Boc}), 94,2 (OCH₂O), 111,0, 111,1 (C4), 116,1 (C3"), 117,8 (C5'), 118,0 (C7'), 121,2 (C3'), 121,3 (C6), 122,8 (C9b), 123,4 (CH_{Ftalimida}) 123,5 (C8'), 125,1 (C7), 126,3 (C5_a), 127,8 (C6'), 127,9 (C1"), 130,1 (C2"), 130,2 (C9a), 131,0 (C8), 132,0 (C_{Ftalimida}), 133,4, 133,4 (C9), 134,8 (CH_{Ftalimida}) 141,0 (C2'), 141,9 (C8a'), 142,4 (C3_a), 148,5, 148,6 (Ar-OC(O)N), 154,3 (C5), 155,2, 155,5 (C=O_{Boc}), 160,1 (C4"), 162,3 (NC=O), 165,6 (Ar-NHC(O)-Ar), 168,2, 168,2 (C=O_{Ftalimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1076,42 [M+H]⁺, hallado: 1076,77 [M+H]⁺

[0198] A una solución del compuesto **41** (323 mg, 0,3 mmol, 1 eq.) en DMF (3 ml) se le añadió hidrazina (44 µl, 0,9 mmol, 3 eq.) y la mezcla se calentó a 35°C durante 5,5 h con adición regular de hidrazina fresca (30 µl, 0,6 mmol, 2 eq.) cada 45 min. La mezcla bruta se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v) para producir el compuesto **42** (284 mg, 0,17 mmol, 56%) como un sólido ceroso amarillo/naranja.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,29-1,45 (9H, m, CH₃, Boc), 2,74-2,96 (8H, m, ArCH₃, NCH₃, CH₂NH₂), 3,34 (2H, br s, NH₂), 3,41 (3H, s, OCH₃), 3,40-3,79 (19H, m, CHCl, NCH₂, OCH₂), 3,81-3,86 (1H, m, CHCl), 4,48 (1H, t, H1), 4,64-4,71 (1H, m, H2), 5,15-5,20 (1H, m, H2), 5,31 (2H, s, OCH₂O), 7,18 (2H, d, H3"), 7,34-7,46 (2H, m, H7, H8), 7,63-8,08 (5H, m, H6, H7', H8', H2"), 8,35 (1H, br s, H4), 8,70 (1H, s, H3'), 9,49 (1H, s, H5'), 10,43 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 22,9 (Ar-CH₃), 28,5, 28,6 (CH₃, Boc), 34,6 (NCH₃), 39,1 (CH₂NH₂), 44,7 (C1), 45,5, 45,9, 47,4 (NCH₂), 48,0 (CH₂Cl), 55,1 (C2), 56,3 (OCH₃), 67,3, 68,4, 69,0, 70,2, 70,2, 70,4 (OCH₂), 79,1, 79,2 (C_{Boc}), 94,2 (OCH₂O), 111,0, 111,1 (C4), 116,1 (C3"), 117,8 (C5'), 118,0 (C7'), 119,5 (C3'), 121,2, 121,3 (C6), 122,9 (C9b), 123,7 (C8'), 125,1 (C7), 126,3 (C5_a), 127,7 (C6'), 128,0 (C1"), 130,1 (C2"), 130,3 (C9a), 131,0 (C8), 133,5 (C9), 141,0 (C2'), 141,9 (C8a'), 142,4 (C3_a), 148,5, 148,6 (Ar-OC(O)N), 154,3 (C5), 155,2 (C=O_{Boc}), 160,1 (C4"), 162,4 (NC=O), 165,6 (Ar-NHC(O)-Ar).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 946,41 [M+H]⁺, hallado: 946,71 [M+H]⁺

[0199] El compuesto **42** (160 mg, 0,17 mmol, 1 eq.) se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y una solución de NaHCO₃ saturada (1 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadió carbamato de maleimida 22 (26 mg, 0,17 mmol, 1 eq.). La mezcla se agitó durante 30 min. Luego, se añadió Na₂CO₃ (1 M en H₂O) (169 µl, 0,17 mmol, 1 eq.) y se agitó durante unos 45 min adicionales. Luego, se añadió H₂O a la mezcla, se extrajo dos veces con EtOAc y se secó en MgSO₄. La solución se filtró y se concentró al vacío seguido de la purificación del producto bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 95:5 v/v) para producir el compuesto **43** (100 mg, 0,10 mmol, 58%) como un sólido ceroso blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,31-1,45 (9H, m, CH₃, Boc), 2,76-2,95 (6H, m, ArCH₃, NCH₃), 3,41 (3H, s, OCH₃), 3,40-3,79 (21H, m, CHCl, NCH₂, OCH₂), 3,79-3,85 (1H, m, CHCl), 4,46 (1H, t, H1), 4,63-4,70 (1H, m, H2), 5,16-5,21 (1H, m, H2), 5,30 (2H, s, OCH₂O), 6,99 (2H, d, HC=CH), 7,11-7,27 (4H, d, H3"), 7,32-7,43 (2H, m, H7, H8), 7,56-7,60 (1H, m, H8'), 7,68-7,84 (2H, m, H6, H7'), 7,99 (2H, d, H2"), 8,35 (1H, br s, H4), 8,69 (1H, s, H3'), 9,47 (1H, s, H5'), 10,31 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 22,9 (Ar-CH₃), 28,5, 28,6 (CH₃, Boc), 34,5 (NCH₃), 37,2, 37,3 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 44,7 (C1), 45,5, 46,0, 46,4, 47,5 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 55,1 (C2), 56,3 (OCH₃), 67,4, 67,4, 68,5, 69,1, 69,9, 69,9, 70,2, 70,2, 70,3, 70,4 (OCH₂), 79,1, 79,1 (C_{Boc}), 94,2 (OCH₂O), 111,0, 111,1 (C4), 116,2 (C3"), 117,8 (C5'), 118,0 (C7'), 119,5 (C3'), 121,2, 121,3 (C6), 122,8 (C9b), 123,6 (C8'), 125,1 (C7), 126,3 (C5_a), 127,8 (C6'), 127,9 (C1"), 130,1 (C2"), 130,3 (C9a), 131,0 (C8), 133,5 (C9), 135,0 (HC=CH), 141,0 (C2'), 141,9 (C8a'), 142,4 (C3_a), 148,5, 148,6 (Ar-OC(O)N), 154,3 (C5), 155,2, 155,5 (C=O_{Boc}), 160,1 (C4"), 162,4 (NC=O), 165,6 (Ar-NHC(O)-Ar), 171,3 (C=O_{Maleimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1026,40 [M+H]⁺, hallado: 1026,59 [M+H]⁺

[0200] Una solución del compuesto **43** (100 mg, 0,097 mmol, 1 eq.) en cloroformo (4 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se diluyó con TFA (2 ml) y se agitó durante 3 h. La mezcla se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío. Luego, el producto intermedio se disolvió en DMF seco (2 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron el conector activado **19** (57 mg, 0,117 mmol, 1,2 eq.) y Et₃N (27 µl, 0,195 mmol, 2 eq.) y la mezcla se agitó durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v) para producir el compuesto **6**, que se purificó

además por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El acetonitrilo se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó, el sólido obtenido se recogió en dioxano/agua (6 ml, 2:1) y se liofilizó para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **6** (19 mg, 0,015 mmol, 15%) como un sólido blanco.

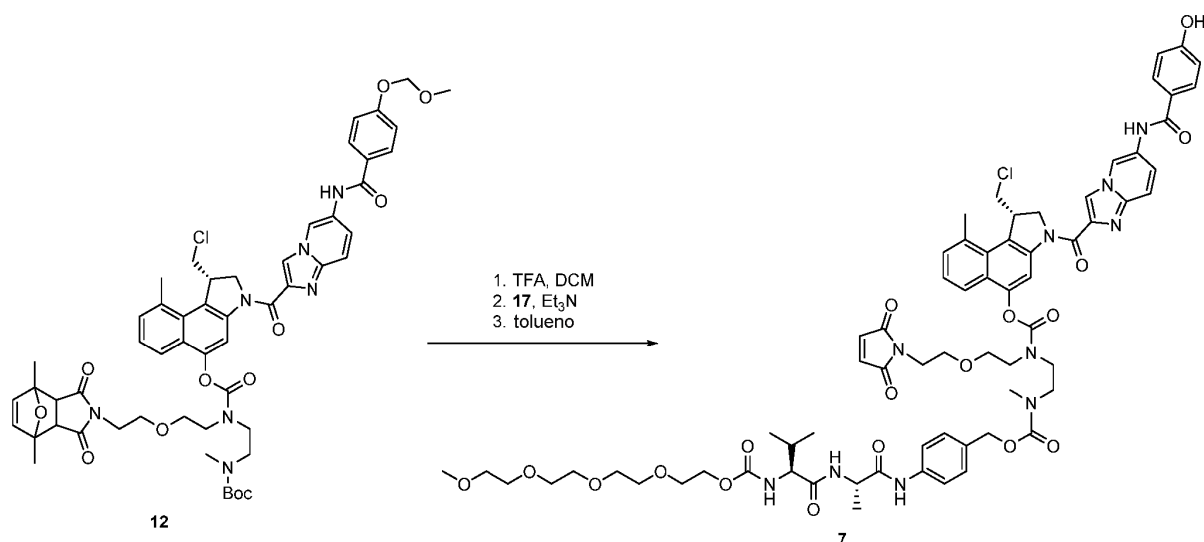
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,88 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,06 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,37 (3H, d, CH_{3,Ala}), 2,18-2,32 (1H, m, P-H_{Val}), 2,77 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,85 (3H, br s, ArCH₃), 2,85-2,98 (3H, d, C(O)NCH₃), 3,39-4,11 (23H, m, CH₂Cl, α-CH_{Val}, NCH₂, OCH₂), 4,46-4,51 (1H, m, H1), 4,51-4,58 (1H, m, α-CH_{Ala}), 4,63-4,69 (1H, m, H2), 4,97-5,15 (3H, m, H2, ArCH₂), 6,91 (2H, d, H3''), 6,99 (2H, s, HC=CH), 7,18-7,59 (6H, m, H7, H8, H2''', H3'''), 7,63-7,82 (3H, m, H6, H7', H8'), 7,91 (2H, d, H2''), 8,28-8,39 (1H, m, H4), 8,76 (1H, s, H3'), 8,97 (1H, d, NH_{Ala}), 9,53 (2H, br s, H5', OH), 10,11-10,30 (2H, m, NH_{PABA}, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 17,1 (CH_{3,Val}), 18,6 (CH_{3,Ala}), 19,7 (CH_{3,Val}), 22,9 (Ar-CH₃), 27,0 (β-CH_{Val}), 34,6, 35,2 (NCH₃), 37,2 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 41,5 (NCH_{3,Val}), 42,2 (NCH_{3,Val}), 44,8 (C1), 47,4, 47,6 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 49,8 (α-CH_{Ala}), 55,0 (C2), 66,5 (ArCH₂OC(O)N), 67,4, 68,5, 69,9, 70,2, 70,3 (OCH₂), 72,0 (α-CH_{Val}), 111,1 (C4), 115,5 (C3''), 117,4 (C7'), 117,7 (C5'), 119,5 (C3', C2'''), 121,2 (C6), 122,9 (C9b), 124,4 (C8'), 125,0 (C1''), 125,2 (C7), 126,3 (C5a), 128,5 (C6'), 128,8 (C3'''), 130,3 (C9a), 130,3 (C2''), 131,0 (C8), 132,5 (C4'''), 133,5 (C9), 135,0 (HC=CH), 138,8 (C1'''), 141,4 (C2'), 141,4 (C8a'), 142,2 (C3a), 148,5 (Ar-OC(O)N), 154,2, 154,5 (C5), 156,2 (Ar-CH₂OC(O)N), 158,1, 158,4, 158,8, 159,1 (TFA), 161,4 (NC=O), 161,4 (C4''), 165,4 (C=O_{Val}), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 170,7 (C=O_{Ala}), 171,3 (C=O_{maleimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1229,51 [M+H]⁺, hallado: 1229,82 [M+H]⁺

Compuesto conector-fármaco **7**

[0201]



[0202] Una solución de fármaco-CS protegido **12** (1,05 g, 1,02 mmol, 1 eq.) en DCM (5 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, después de lo cual se añadió TFA (5 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 2,5 h, luego se diluyó con DCM, se concentró al vacío y se coevaporó con tolueno. A continuación, el conector activado **17** (0,70 g, 1,02 mmol, 1 eq.) se disolvió en DMF seco (10 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se añadió Et₃N (0,57 ml, 4,06 mmol, 4 eq.) seguido de la adición gota a gota de la sal de TFA en DMF seco (10 ml). La mezcla resultante se agitó durante 3 h, permitiendo que la mezcla se calentara a RT. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron al vacío y se coevaporaron con tolueno. Luego, el sólido se suspendió en tolueno (120 ml) y se calentó gradualmente a 90°C a lo largo de un periodo de 3 h. A continuación, la mezcla se concentró al vacío y se purificó por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El acetonitrilo de las fracciones recogidas se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó. El sólido obtenido se disolvió en dioxano/agua (18 ml, 2:1) y se liofilizó una segunda vez para producir la sal de TFA del compuesto **7** (0,50 g, 0,37 mmol, 37%) como un sólido blanco.

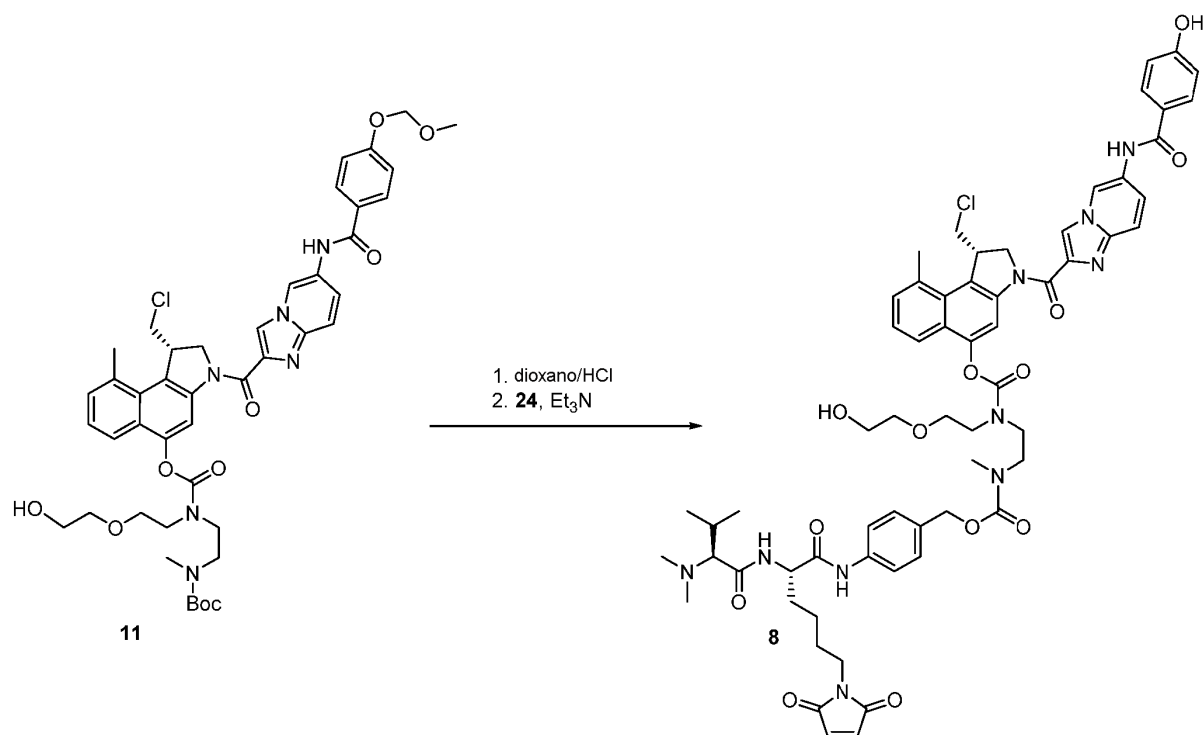
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,82 (3H, d, CH_{3,Val}), 0,87 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,28 (3H, d, CH_{3,Ala}), 1,93-1,98 (1H, m, β-H_{Val}), 2,85 (3H, br s, Ar-CH₃), 2,84-2,93 (3H, m, NCH₃), 3,22 (3H, s, OCH₃), 3,34-3,72 (27H, m, CHCl, NCH₂, OCH₂), 3,82-3,89 (2H, m, CHCl, α-CH_{Val}), 4,03-4,06 (2H, m, CH₂OC(O)NH), 4,40 (1H, t, α-CH_{Ala}), 4,48-4,50 (1H, m, H1), 4,65-4,69 (1H, m, H2), 4,95-5,05 (3H, m, H2, Ar-CH₂), 6,89-6,97 (3H, m, CH=CH, H3''), 7,03 (1H, d, HC=CH), 7,17-7,58 (7H, m, H7, H8, H2''', H3''', NH_{Val}), 7,67-7,83 (3H, m, H6, H7', H8'), 7,91 (2H, d, H2''), 8,13-8,15 (1H, m, NH_{Ala}), 8,28-8,39 (1H, m, H4), 8,84-8,88 (1H, m, H3'), 9,59, (1H, s, H5'), 9,96-10,00 (1H, m, NH_{PABA}), 10,15-10,40 (1H, br s, OH), 10,33 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,5 (CH_{3,Val}), 18,6 (CH_{3,Ala}), 19,6 (CH_{3,Val}), 22,8 (Ar-CH₃), 30,8 (β-CH_{Val}), 34,4, 35,2 (NCH₃), 37,1, 37,4 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 44,8 (C1), 47,4, 47,6 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 49,4 (α-CH_{Ala}), 54,9 (C2), 58,5 (OCH₃), 60,4 (α-CH_{Val}), 63,9 (CH₂OC(O)NH), 66,5 (Ar-CH₂OC(O)N), 66,6 (Ar-CH₂OC(O)N), 68,4, 68,5, 68,7 (OCH₂, maleimida PEG), 69,3, 70,0, 70,2, 70,3, 71,7 (OCH₂), 111,0 (C4), 115,6 (C3"), 116,4 (C7'), 117,9 (C5'), 119,4 (C3', C2"), 121,2 (C6), 123,1 (C9b), 124,9 (C1"), 125,4 (C7), 126,4 (C8'), 126,5 (C5a) 128,8, 129,0 (C3"), 129,1 (C6'), 130,2 (C9a), 130,4 (C2"), 131,1 (C8), 132,2 (C4"), 133,5, 133,6 (C9), 134,9, 135,0 (HC=CH), 139,0 (C1"), 139,1 (C2'), 140,4 (C8a'), 141,9 (C3a), 148,5 (Ar-OC(O)N), 154,1, 154,3 (C5), 155,8, 155,9 (Ar-CH₂OC(O)N) 156,7 (OC(O)NH), 158,4, 158,8 (TFA), 161,5 (C4"), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 171,4 (C=O_{Val}), 171,5 (C=O_{maleimida}), 171,5 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1347,53 [M+H]⁺, hallado: 1347,84 [M+H]⁺

Compuesto conector-fármaco 8

[0203]



[0204] A una solución del compuesto **11** (630 mg, 0,73 mmol, 1 eq.) en dioxano (6 ml) se le añadió 4M HCl en dioxano (15 ml) y la mezcla se agitó durante 2 h. Luego, la mezcla se concentró y se secó al vacío. A continuación, el compuesto activado **24** (503 mg, 0,81 mmol, 1,1 eq.) se disolvió en DMF seco (5 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadió Et₃N (307 µl, 2,20 mmol, 3 eq.). Luego, la sal de HCl (disuelta en 5 ml de DMF) se añadió gota a gota y la mezcla se agitó durante 3 h y se calentó gradualmente a RT. A continuación, la mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v) para producir el compuesto bruto **8** que se purificó además por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El acetonitrilo de las fracciones recogidas se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó. El sólido obtenido se disolvió en dioxano/agua (12 ml, 2:1) y se liofilizó una segunda vez para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **8** (217 mg, 0,18 mmol, 25%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,88 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,04 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,20-1,38 (2H, m, CH_{2,Lys}), 1,46-1,59 (2H, m, CH_{2,Lys}), 1,61-1,81 (2H, m, CH_{2,Lys}), 2,26-2,32 (1H, m, β-H_{Val}), 2,78 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,85 (3H, br s, ArCH₃), 2,85-2,98 (3H, d, C(O)NCH₃), 3,36-3,86 (17H, m, 2 x CHCl, α-CH_{Val}, CH_{2,Lys}, 2 x NCH₂, OCH₂), 4,48-4,53 (2H, m, H1, α-CH_{Lys}), 4,63-4,69 (1H, m, H2), 4,97-5,08 (3H, m, H2, Ar-CH₂), 6,92 (2H, d, H3"), 6,99 (2H, s, HC=CH), 7,19-7,58 (6H, m, H7, H8, H2", H3"), 7,70-7,81 (3H, m, H6, H7', H8'), 7,92 (2H, d, H2"), 8,30-8,42 (1H, m, H4), 8,79-8,81 (1H, m, H3'), 8,94 (1H, d, NH_{Lys}), 9,56 (1H, s, H5'), 9,62 (1H, br s, OH), 10,14-10,22 (1H, m, NH_{PABA}), 10,30 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

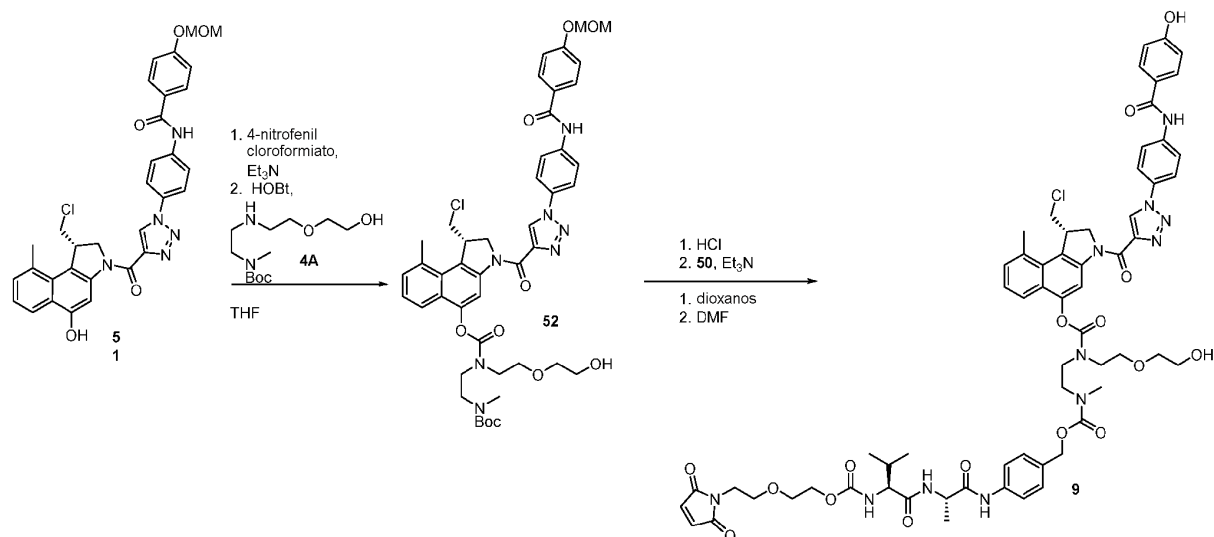
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 17,2 (CH_{3,Val}), 19,7 (CH_{3,Val}), 22,9 (Ar-CH₃), 23,2 (CH_{2,Lys}), 27,0 (β-CH_{Val}), 28,1 (CH_{2,Lys}), 31,8 (CH_{2,Lys}), 34,4, 34,8, 35,2 (NCH₃), 37,4 (CH_{2,Lys}), 41,6, 41,9 (NCH_{3,Val}), 44,8 (C1), 47,5, 47,7 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 53,7 (α-CH_{Lys}), 54,9 (C2), 60,7, 60,7 (CH₂OH) 66,5 (ArCH₂), 68,5, 69,1 (NCH₂CH₂O), 72,0 (α-CH_{Val}), 72,7, 72,9 (OCH₂), 111,0 (C4), 115,6 (C3"), 117,0 (C7'), 117,8 (C5'), 119,6 (C3', C2"), 121,3 (C6), 123,0 (C9b), 125,0 (C1"), 125,0 (C7), 125,3 (C8'), 126,3, 126,4 (C5a), 128,8 (C6'), 128,8 (C3"), 130,2 (C9a), 130,3 (C2"), 131,1

(C8), 132,5 (C4'''), 133,5 (C9), 134,9 HC=CH), 138,7 (C2', C1'''), 141,1 (C8a'), 142,1 (C3a), 148,5 (Ar-OC(O)N), 154,2, 154,4 (C5), 156,2 (ArCH₂OC(O)N), 161,3 (NC=O), 161,5 (C4''), 165,8 (C=O_{Val}), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 170,1 (C=O_{Lys}), 171,4 (C=O_{maleimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1199,50 [M+H]⁺, hallado: 1199,93 [M+H]⁺

5 Compuesto conector-fármaco 9

[0205]



[0206] Una solución del compuesto 51 (200 mg, 0,35 mmol, 1 eq.) en THF seco (5 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron 4-nitrofenilcloroformiato (78 mg, 0,39 mmol, 1,1 eq.) y Et₃N (245 µl, 1,76 mmol, 5 eq.) y se agitaron durante 30 min. Luego, se añadieron una solución del separador de ciclación 4A (sintetizado como se describe en la WO2011/133039, ejemplo 1 (Syntarga), 138 mg, 0,53 mmol, 1,5 eq.) en THF seco (3 ml) y HOBt (60 mg, 0,39 mmol, 1,1 eq.) y la mezcla resultante se calentó a 50°C durante 2 h. La mezcla se enfrió a RT, se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 93:7, v/v) para producir el compuesto 52 (250 mg, 0,28 mmol, 80%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 1,33-1,45 (9H, m, CH₃_{Boc}), 2,86 (3H, s, Ar-CH₃), 2,79-2,96 (3H, m, NCH₃), 3,41 (3H, s, OCH₃), 3,39-3,80 (13H, m, CHCl, CH₂OH, OCH₂, NCH₂), 3,84-3,91 (1H, m, CHCl), 4,50-4,55 (1H, m, H1), 4,62-4,73 (2H, m, H2, OH), 5,01-5,06 (1H, m, H2), 5,31 (2H, s, OCH₂O), 7,18 (2H, d, H3''), 7,37-7,46 (2H, m, H7, H8), 7,68-7,89 (1H, m, H6), 7,97-8,06 (6H, m, H2', H3', H2''), 8,31-8,42 (1H, m, H4), 9,43 (1H, s, H_{triazol}), 10,41 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 22,8 (Ar-CH₃), 28,5, 28,6 (CH₃_{Boc}), 34,6 (NCH₃), 44,6 (C1), 45,5, 46,0, 47,6 (NCH₂), 48,1 (CH₂Cl), 54,8 (C2), 56,3 (OCH₃), 60,7, 60,7 (CH₂OH), 68,5, 69,0, 72,7, 72,9 (OCH₂), 79,1 (C_{Boc}), 94,2 (OCH₂O), 110,8, 110,9 (C4), 116,1 (C3''), 121,2 (C6), 121,4, 121,5 (C2', C3'), 123,2 (C9b), 125,4 (C7), 125,5 (C1''), 126,5 (C5a), 127,6 (CH_{triazol}), 130,1 (C2''), 130,3 (C9a), 131,2 (C8), 131,9 (C4'), 133,5 (C9), 140,7 (C1'), 141,8 (C3a), 145,0 (C_{triazol}), 148,6 (Ar-OC(O)N), 154,3 (C5), 155,2 (C=O_{Boc}), 159,3 (NC(O)C), 160,0 (C4''), 165,6 (Ar-NHC(O)-Ar).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 886,35 [M+H]⁺, hallado: 886,68 [M+H]⁺

[0207] Una solución del compuesto 52 (125 mg, 0,14 mmol, 1 eq.) en dioxano (2 ml) se diluyó con HCl 4 M en dioxano (8 ml) y se agitó durante 10 min a RT. La mezcla se concentró al vacío, se coevaporó con DCM y se secó al vacío. La sal de HCl obtenida se disolvió en DMF seco (2,5 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo, seguido de la adición del compuesto activado 50 (142 mg, 0,21 mmol, 1,5 eq.) y Et₃N (39 µl, 0,28 mmol, 2 eq.). La mezcla se agitó durante 1,5 h permitiendo que se calentara a RT. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto 9, que se purificó además por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA, gradiente). El acetonitrilo se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó, el sólido obtenido se recogió en dioxano/agua y se liofilizó para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco 9 (57 mg, 0,05 mmol, 32%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,82 (3H, d, CH₃_{Val}), 0,86 (3H, d, CH₃_{Val}), 1,29 (3H, d, CH₃_{Ala}), 1,89-2,02 (1H, m, β-H_{Val}), 2,85 (3H, br s, ArCH₃), 2,83-2,99 (3H, m, NCH₃), 3,20-3,80 (20H, m, CHCl, CH₂OH, OCH₂, NCH₂), 3,82-3,90 (2H, m, CHCl, α-CH_{Val}), 3,98-4,03 (2H, m, CH₂OC(O)NH), 4,40 (1H, t, α-CH_{Ala}), 4,49-4,55 (1H, m, H1), 4,67-4,73 (1H, m, H2), 4,95-5,07 (3H, m, H2, Ar-CH₂), 6,90 (2H, d, H3''), 7,00 (2H, s, HC=CH), 7,15-7,58 (7H, m, H7,

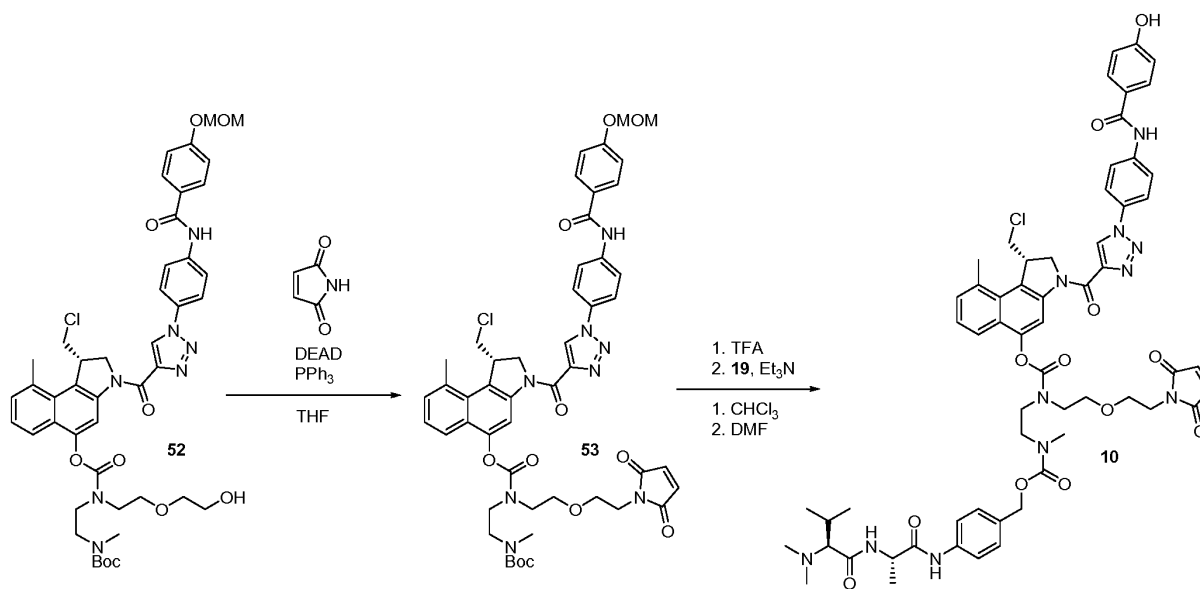
H8, H2'', H3'', NH_{Val}), 7,69-7,83 (1H, m, H6), 7,90 (2H, d, H2''), 7,97-8,05 (4H, m, H2', H3'), 8,13 (1H, d, NH_{Ala}), 8,30-8,42 (1H, m, H4), 9,37-9,42 (1H, m, H_{triazol}), 9,88-10,02 (1H, m, NH_{PABA}), 10,19 (1H, br s, Ar-OH), 10,30 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 18,5 (CH_{3,Val}, CH_{3,Ala}), 19,6 (CH_{3,Val}), 22,8 (ArCH₃), 30,8 (β-CH_{Val}), 35,2 (NCH₃), 37,1 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 44,6 (C1), 47,7 (NCH₂), 48,1 (CHCl), 49,4 (α-CH_{Ala}), 54,8 (C2), 60,4 (α-CH_{Val}), 60,7, 60,7 (CH₂OH), 63,8 (CH₂OC(O)NH), 66,6 (Ar-CH₂OC(O)N), 68,4, 68,8, 68,9, 72,7, 72,9 (OCH₂), 110,8 (C4), 115,5 (C3''), 119,4 (C2''), 121,3 (C6), 121,5 (C2', C3'), 123,2 (C9b), 125,4 (C7), 125,5 (C1''), 126,4 (C5a), 127,7 (CH_{triazol}), 128,8, 129,0 (C3''), 130,2 (C9a), 130,3 (C2''), 131,1 (C8), 131,7 (C4'), 132,2 (C4''), 133,5 (C9), 135,0 (HC=CH), 139,0 (C1''), 140,8 (C1'), 141,8 (C3a), 145,0 (C_{Triazol}), 148,6 (Ar-OC(O)N), 154,2 (C5), 154,4 (Ar-CH₂OC(O)N), 156,6 (OC(O)NH), 159,3 (NC(O)C), 161,3 (C4''), 165,8 (Ar-NHC(O)-Ar), 171,3 (C=O_{Val}), 171,4 (C=O_{maleimida}), 171,5 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1272,48 [M+H]⁺, hallado: 1272,57 [M+H]⁺

Compuesto conector-fármaco **10**

[0208]



[0209] El compuesto 52 (200 mg, 0,23 mmol, 1 eq.), maleimida (29 mg, 0,29 mmol, 1,3 eq.) y trifetilfosfina (77 mg, 0,29 mmol, 1,3 eq.) se disolvieron en THF seco (5 ml), se enfriaron a 0°C en un baño de hielo y se añadió DEAD (2,2 M en tolueno, 133 µl, 0,29 mmol, 1,3 eq.) gota a gota. La mezcla se agitó durante 100 min a RT. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 97:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **53** (100 mg, 0,10 mmol, 46%) como una espuma naranja.

MS (ESI) *m/z*; calculado: 965,36 [M+H]⁺, hallado: 965,70 [M+H]⁺

[0210] Una solución del compuesto **53** (80 mg, 0,08 mmol, 1 eq.) en cloroformo (2 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se diluyó con TFA (2 ml) y se agitó durante 3 h. La mezcla se concentró luego al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío. La sal de TFA obtenida se disolvió en DMF seco (2 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron el compuesto activado **19** (48 mg, 0,10 mmol, 1,2 eq.) y Et₃N (58 µl, 0,41 mmol, 5 eq.) y la mezcla se agitó durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto **10** que se purificó además por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El MeCN se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó, el sólido obtenido se recogió en dioxano/agua (6 ml, 2:1) y se liofilizó para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **10** (33 mg, 0,03 mmol, 34%) como un sólido blanco.

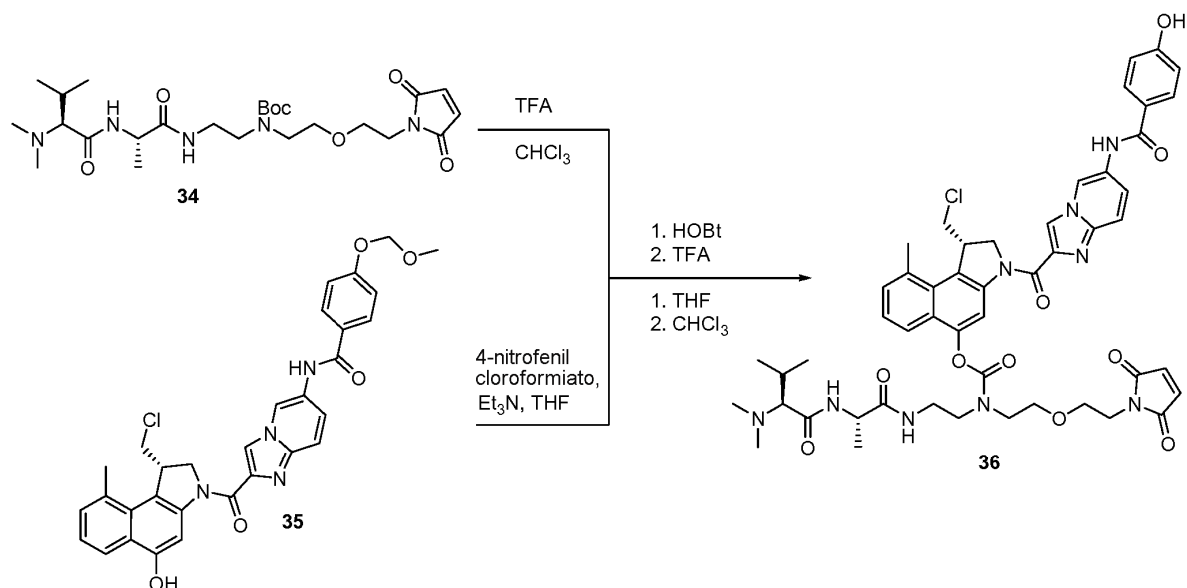
¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,94 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,11 (3H, d, CH_{3,Val}), 1,42 (3H, d, CH_{3,Ala}), 2,28-2,36 (1H, m, β-H_{Val}), 2,82 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,91 (3H, br s, ArCH₃), 2,90-3,02 (3H, d, C(O)NCH₃), 3,38-3,80 (14H, m, CHCl, α-CH_{Val}, NCH₂, OCH₂), 3,89-3,94 (1H, m, CHCl), 4,55-4,63 (2H, m, H1, α-CH_{Ala}), 4,71-4,79 (1H, m, H2), 5,03-5,12 (3H, m, H2, Ar-CH₂), 6,96 (2H, d, H3''), 7,01 (1H, d, CH=CH), 7,08 (1H, d, CH=CH), 7,23-7,64 (6H, m, H7, H8, H2'', H3''), 7,72-7,83 (1H, m, H6), 7,96 (2H, d, H2''), 8,03-8,11 (4H, m, H2', H3'), 8,36-8,45 (1H, m, H4), 9,02 (1H, d, NH_{Ala}), 9,42-9,48 (1H, m, H_{triazol}), 9,61 (1H, br s, CN(CH₃)₂H⁺ CF₃COO⁻), 10,16-10,28 (2H, m, NH_{PABA}, OH), 10,36 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 17,1 (CH_{3,Val}), 18,6 (CH_{3,Ala}), 19,7 (CH_{3,Val}), 22,8 (Ar-CH₃), 27,0 (β-CH_{Val}), 34,5, 34,8 (NCH₃), 37,2, 37,4 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 41,5 (NCH_{3,Val}), 42,2 (NCH_{3,Val}), 44,6 (C1), 45,9, 46,4, 47,4 (NCH₂), 48,0 (CH₂Cl), 49,8 (α-CH_{Ala}), 54,8 (C2), 66,5 (Ar-CH₂OC(O)N), 67,5, 68,4, 68,7 (OCH₂), 72,0 (α-CH_{Val}), 110,9 (C4), 115,5 (C3"), 119,5 (C2"), 121,3 (C6), 121,3, 121,5 (C2', C3'), 123,1 (C9b), 125,4 (C7), 125,5 (C1"), 126,4 (C5a), 127,7 (CH_{triazol}), 128,8, 129,0 (C3"), 130,2 (C9a), 130,3 (C2"), 131,1 (C8), 131,7 (C4'), 132,4 (C4"), 133,6 (C9), 134,9, 135,0 (HC=CH), 138,8 (C1"), 140,9 (C1'), 141,8 (C3a), 145,0 (C_{triazol}), 148,5 (Ar-OC(O)N), 154,1, 154,3 (C5), 155,7, 156,1 (ArCH₂OC(O)N), 159,3 (NC(O)C), 161,3 (C4"), 165,4 (C=O_{Val}), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 170,7 (C=O_{Ala}), 171,4 (C=O_{maleimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1168,47 [M+H]⁺, hallado: 1168,79 [M+H]⁺

10 Compuesto conector-fármaco 36

[0211]



[0212] Una solución del compuesto **34** (140 mg, 0,27 mmol, 1 eq.) en cloroformo (4 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadió TFA (2 ml) seguido de la agitación de la mezcla durante 1 h. La mezcla se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío. Por separado, el compuesto **35** (152 mg, 0,27 mmol, 1 eq.) se disolvió en THF seco (3 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron 4-nitrofenilcloroformiato (59 mg, 0,29 mmol, 1,1 eq.) y Et₃N (186 µl, 1,33 mmol, 5 eq.) y se agitaron durante 15 min. Luego se añadieron HOBT (41 mg, 0,27 mmol, 1 eq.) y la sal de TFA (del compuesto desprotegido **34**) en THF (3 ml) a la solución, que se calentó a 50°C durante 1 h. La mezcla bruta se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío. El sólido restante disuelto en cloroformo (3 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se añadió TFA (3 ml) y se agitó durante 2 h. Luego se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, gradiente), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el producto bruto **36**, que se purificó por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El acetonitrilo se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó, el sólido obtenido se recogió en dioxano/agua (6 ml, 2:1, v/v) y se liofilizó para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **36** (65 mg, 0,07 mmol, 25%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,87 (3H, dd, CH_{3,Val}), 1,02 (3H, dd, CH_{3,Val}), 1,26-1,33 (3H, m, CH_{3,Ala}), 2,22-2,30 (1H, m, β-H_{Val}), 2,76 (6H, br s, N(CH₃)₂), 2,85 (3H, br s, ArCH₃), 3,26-3,77 (14H, CHCl, α-CH_{Val}, NCH₂, OCH₂), 3,84 (1H, d, CHCl), 4,36-4,46 (1H, m, α-CH_{Ala}), 4,49 (1H, t, H1), 4,68 (1H, t, H2), 5,09 (1H, d, H2), 6,91 (2H, d, H3"), 6,95 (1H, s, HC=CH), 7,05 (1H, s, HC=CH), 7,32-7,39 (1H, m, H7), 7,40-7,46 (1H, m, H8), 7,66-7,72 (1H, m, H8'), 7,75-7,83 (2H, m, H6, H7'), 7,91 (2H, d, H2"), 8,25-8,44 (2H, m, H4, (C=O)NH-CH₂), 8,78 (1H, s, H3'), 8,86 (1H, d, NH_{Ala}), 9,54 (1H, s, H5'), 9,57 (1H, br s, OH), 10,28 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

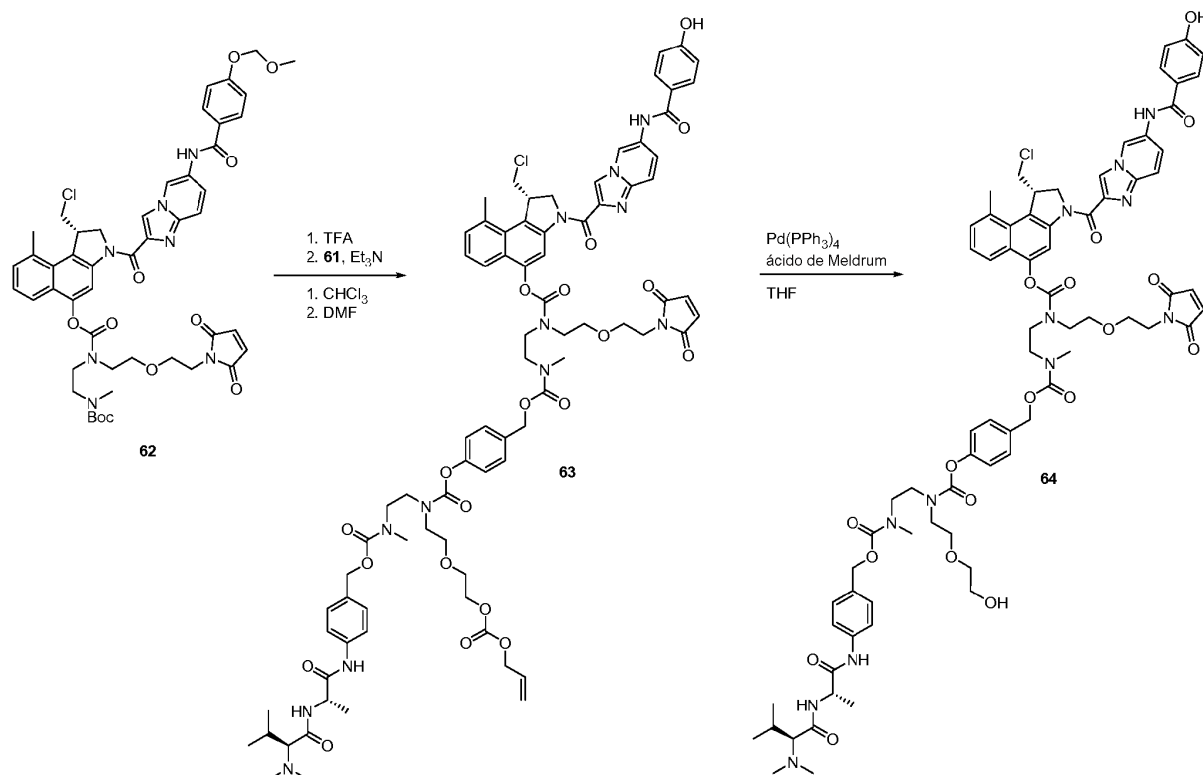
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 17,1, 17,1 (CH_{3,Val}), 18,8, 18,9 (CH_{3,Ala}), 19,6, 19,6 (CH_{3,Val}), 22,9 (Ar-CH₃), 26,9, 26,9 (β-CH_{Val}), 37,1, 37,3 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 38,1 (CH₂NH), 41,5 (NCH_{3,Val}), 42,1 (NCH_{3,Val}), 44,7 (C1), 47,4, 47,7 (NCH₂), 48,0 (CH₂Cl), 48,2 (NCH₂), 49,0 (α-CH_{Ala}), 55,0 (C2), 68,3, 68,5, 68,7, 68,9 (OCH₂, maleimida PEG), 72,0 (α-CH_{Val}), 111,0, 111,1 (C4), 115,6 (C3"), 117,3 (C7'), 117,7 (C5'), 119,3 (C3'), 121,3, 121,4 (C6), 122,9, 123,0 (C9b), 124,7 (C8'), 125,0 (C1"), 125,2 (C7), 126,4, 126,4 (C5a) 128,6 (C6'), 130,2 (C9a), 130,3 (C2"), 131,1 (C8), 133,5, 133,5 (C9), 134,9, 135,0 (HC=CH), 139,3 (C2'), 141,3 (C8a'), 142,2 (C3a), 148,5, 148,6 (Ar-OC(O)N), 154,1,

154,3 (C5), 161,4 (NC=O), 161,6 (C4''), 165,2 (C=O_{Val}), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 171,4 (C=O_{maleimida}), 172,0, 172,1 (C=O_{Ala}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 978,39 [M+H]⁺, hallado: 978,70 [M+H]⁺

Compuesto conector-fármaco **64**

5 [0213]



[0214] Una solución del compuesto **62** (60 mg, 0,06 mmol, 1 eq.) en DCM (2 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se diluyó con TFA (2 ml) y la mezcla se agitó durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío. A continuación, una solución del compuesto **61** (64 mg, 0,07 mmol, 1,1 eq.) en DMF (1 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadió Et₃N (36 ml, 0,26 mmol, 4 eq.) seguido de la adición gota a gota de la sal de TFA (disuelta en 1 ml de DMF). La mezcla resultante se agitó durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el producto intermedio **63**.

(MS (ESI) *m/z*; calculado: 1563,62 [M+H]⁺, hallado: 1563,31 [M+H]⁺)

[0215] El producto intermedio **63** se disolvió (30 mg, 0,02 mmol, 1 eq.) en THF (5 ml), se añadió Pd(PPh₃)₄ (11 mg, 9,6 μmol, 0,5 eq.), seguido de 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (28 mg, 0,19 mmol, 10 eq.) y la mezcla se agitó durante 3 h a RT bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el producto bruto **64**, que se purificó además por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El MeCN se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó, el sólido obtenido se recogió en dioxano/agua (6 ml, 2:1) y se liofilizó para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **64** (6 mg, 3,9 μmol, 20%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 0,87 (3H, m, CH_{3,Val}), 1,05 (3H, m, CH_{3,Val}), 1,34-1,39 (3H, m, CH_{3,Ala}), 2,24-2,33 (1H, br s, β-H_{Val}), 2,76 (6H, br s, N(CH₃)_{2,Val}), 2,84 (3H, s, ArCH₃), 2,82-2,97 (6H, m, NCH₃), 3,30-3,96 (26H, m, CH₂Cl, CH₂N, CH₂O), 4,43-4,49 (1H, m, H1), 4,50-4,59 (1H, m, α-CH_{Ala}), 4,60-4,69 (1H, m, H2), 4,92-5,12 (5H, m, H2, ArCH_{2,PABA}, ArCH₂), 6,86-7,04 (6H, m, HC=CH, H3'', H2'''), 7,22-7,43 (6H, m, H7, H8, H3''', H3''''), 7,49-7,76 (5H, m, H6, H7', H8', H2'''), 7,90 (2H, d, H2''), 8,30-8,38 (1H, m, H4), 8,71 (1H, br s, H3'), 8,96 (1H, d, NH_{Ala}), 9,46-9,57 (2H, m, H5', OH), 1,13-10,26 (3H, m, NH_{PABA}, Ar-NHC(O)-Ar).

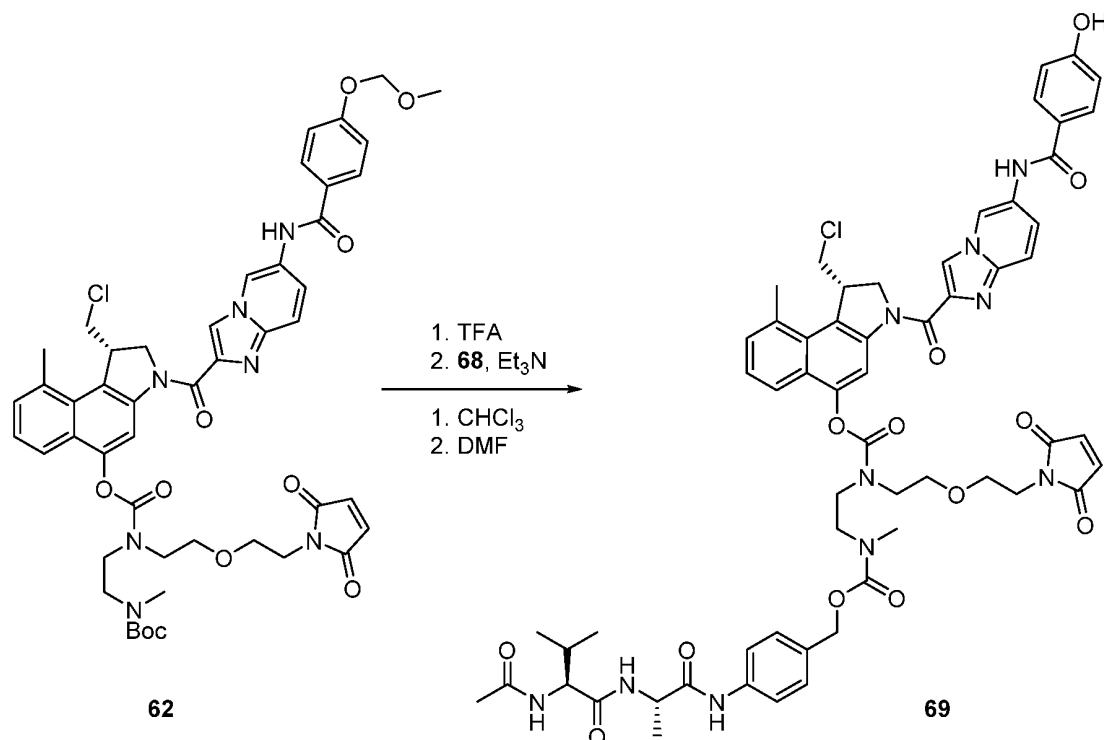
¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 17,1 (CH_{3,Val}), 18,6 (CH_{3,Ala}), 19,6 (CH_{3,Val}), 22,9 (Ar-CH₃), 27,0 (β-CH_{Val}), 35,2 (NCH₃), 37,2, 37,4 ((C=O)₂NCH₂CH₂), 41,5, 42,2 (NCH_{3,Val}), 44,7 (C1), 46,0, 46,7, 47,4 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 49,8 (α-CH_{Ala}), 55,0 (C2), 60,7 (CH₂OH), 66,3 (Ar-CH₂OC(O)N), 67,6, 68,4, 68,6, 69,1 (OCH₂), 72,0 (α-CH_{Val}), 72,7

(OCH₂), 111,1 (C4), 115,5 (C3''), 117,7 (C5', C7'), 119,6 (C3', C2'''), 121,2 (C6), 122,1 (C2'''), 122,9 (C9b), 124,0 (C8'), 125,1 (C1''), 125,2 (C7), 126,3 (C5a), 128,3 (C6'), 128,9, 129,1 (C3''', C3'''), 130,3 (C2''), 131,0 (C8), 131,7 (C9a), 132,4 (C4''', C4'''), 133,5 (C9), 134,9, 135,0 (HC=CH), 138,9 (C1'''), 140,4 (C2'), 141,7 (8a'), 142,3 (C3a), 148,5 (Ar-OC(O)N), 151,1 (C1'''), 154,1, 154,3 (C5), 155,9, 156,1 (Ar-CH₂OC(O)N), 161,4 (C4''), 162,1 (NC=O), 165,4 (C=O_{Val}), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 170,7 (C=O_{Ala}), 171,4 (C=O_{maleimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1479,60 [M+H]⁺, hallado: 1480,86 [M+H]⁺

Compuesto conector-fármaco **69**

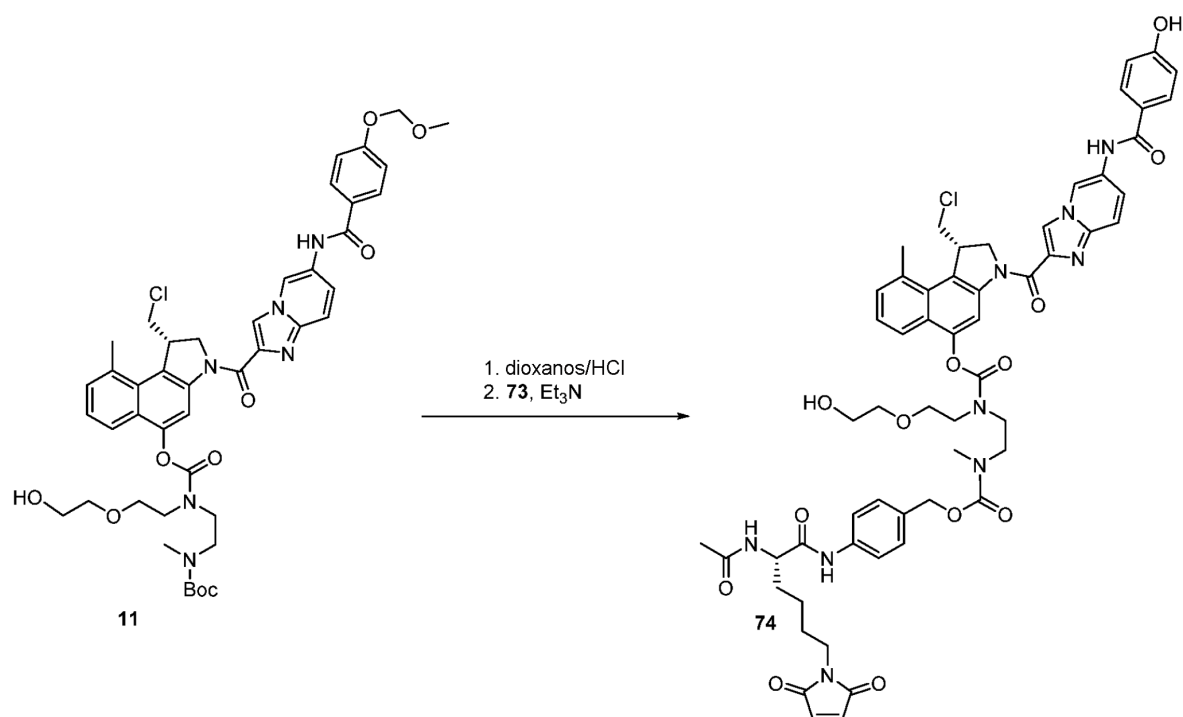
[0216]



- [0217] Una solución del compuesto **62** (110 mg, 0,12 mmol, 1 eq.) en cloroformo (3 ml) se enfrió a 0°C en un baño de hielo, se diluyó con TFA (3 ml) y se agitó durante 3 h. La mezcla reactiva se concentró al vacío, se coevaporó con tolueno y se secó al vacío. Luego, la sal de TFA resultante se disolvió en DMF seco (2 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron el conector activado **68** (65 mg, 0,13 mmol, 1,1 eq.) y Et₃N (33 µl, 0,23 mmol, 2 eq.) y la mezcla se agitó durante 3 h. La mezcla reactiva se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto bruto **69**, que se purificó por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El acetonitrilo se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó, el sólido obtenido se extrajo en dioxano/agua (6 ml, 2:1) y se liofilizó para producir la sal de TFA del compuesto conector-fármaco **69** (28 mg, 0,02 mmol, 21%) como un sólido blanco.
- MS (ESI) *m/z*; calculado: 1155,43 [M+H]⁺, hallado: 1155,65 [M+H]⁺

Compuesto conector-fármaco **74**

[0218]



[0219] Una solución del compuesto 11 (75 mg, 0,09 mmol, 1 eq.) en dioxano (2 ml) se diluyó con HCl 4 M en dioxano (6 ml) y se agitó durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío y se secó al vacío. La sal de HCl obtenida se disolvió en DMA (2 ml), se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se añadieron el compuesto **73** (56 mg, 0,10 mmol, 1,2 eq.) y Et₃N (24 µl, 0,17 mmol, 2 eq.) y la mezcla se agitó durante 1,5 h. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 a 7:3, v/v), las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío para producir el compuesto bruto **74**, que se purificó por HPLC preparatoria (Sunfire C-18, MeCN/MilliQ 0,1% m/m TFA). El acetonitrilo se evaporó y el residuo acuoso se liofilizó. El sólido obtenido se recogió en dioxano/agua (6 ml, 2:1) y se liofilizó para producir el compuesto conector-fármaco **74** (26 mg, 0,02 mmol, 27%) como un sólido blanco.

¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 1,15-1,28 (2H, m, CH₂Lys), 1,37-1,69 (4H, m, 2 x CH₂Lys), 1,86 (3H, s, CH₃Acetilo), 2,85 (3H, br s, ArCH₃), 2,85-3,00 (3H, d, NCH₃), 3,37 (2H, t, (C=O)₂NCH₂Lys), 3,36-4,05 (17H, m, CHCl, NCH₂, OCH₂), 4,29-4,36 (1H, m, α-CH₂Lys), 4,46-4,52 (1H, m, H1), 4,64-4,70 (1H, m, H2), 4,96-5,07 (3H, m, H2, Ar-CH₂), 6,92 (2H, d, H3''), 6,98 (2H, s, HC=CH), 7,15-7,59 (6H, m, H7, H8, H2'', H3''), 7,69-7,82 (3H, m, H6, H7', H8'), 7,92 (2H, d, H2''), 8,10 (1H, d, NH_{Lys}), 8,30-8,42 (1H, m, H4), 8,84 (1H, br s, H3'), 9,57 (1H, s, H5'), 9,96-10,04 (1H, m, NH_{PABA}), 10,24 (1H, br s, OH), 10,30 (1H, s, Ar-NHC(O)-Ar).

¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): δ = 22,9 (Ar-CH₃), 23,2 (CH₂Lys), 28,2 (CH₂Lys), 30,9 (CH₃Acetilo), 32,0 (CH₂Lys), 34,4, 35,0, 35,3 (NCH₃), 37,4 ((C=O)₂NCH₂Lys), 44,8 (C1), 46,7, 47,5, 47,7 (NCH₂), 47,9 (CH₂Cl), 53,7 (α-CH₂Lys), 54,9 (C2), 60,7, 60,7 (CH₂OH), 66,5 (ArCH₂), 68,5, 69,1 (OCH₂), 72,7, 72,9 (OCH₂), 111,0 (C4), 115,6 (C3''), 116,8 (C7'), 117,9 (C5'), 119,6 (C3', C2''), 121,3 (C6), 123,1 (C9b), 125,0 (C1''), 125,4 (C7, C8'), 126,3 (C6'), 126,5 (C5a), 128,7 (C3'''), 130,2 (C9a), 130,3 (C2''), 131,1 (C8), 132,2 (C4'''), 133,5, 133,6 (C9), 134,9 (HC=CH), 138,9 (C1'''), 140,9 (C2', C8a'), 142,0 (C3a), 148,5 (Ar-OC(O)N), 154,2, 154,4 (C5), 156,3 (Ar-CH₂OC(O)N), 161,4 (NC=O), 161,5 (C4''), 165,9 (Ar-NHC(O)-Ar), 169,9 (C=O_{Acetilo}), 171,3 (C=O_{Lys}), 171,4 (C=O_{maleimida}).

MS (ESI) *m/z*; calculado: 1114,41 [M+H]⁺, hallado: 1114,66 [M+H]⁺

Protocolos para la conjugación específica de sitio y de tipo salvaje

Protocolo general de conjugación para la conjugación a través de disulfuros endógenos parcialmente reducidos (conjugación de tipo salvaje (wt))

[0220] Una solución de anticuerpo (5-10 mg/ml en histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6) se diluyó con EDTA (25 mM en agua, 4% v/v). El pH se ajustó a -7,4 usando TRIS (1 M en agua, pH 8) después de lo cual se añadió TCEP (10 mM en agua, 1-3 equivalentes dependiendo del anticuerpo y la DAR deseada) y la mezcla resultante se incubó a RT durante 1-3 h. Se añadió DMA seguido de una solución de conector-fármaco (10 mM en DMA). La concentración final de DMA fue 5-10%. La mezcla resultante se incubó a RT en ausencia de luz durante 1-16 h. Para eliminar el exceso de conector-fármaco, se añadió carbón activo y la mezcla se incubó a RT durante 1 h. El carbón se eliminó usando un filtro de 0,2 µm de PES y el ADC resultante se formuló en histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6 usando un concentrador por centrifugación Vivaspin (30 kDa de corte, PES). Finalmente, la solución de ADC se sometió a filtración estéril usando un filtro de 0,22 µm de PES.

Protocolo general de conjugación específica de sitio

[0221] Se sintetizaron conjugados específicos de sitio según el procedimiento descrito en el protocolo A o el protocolo B.

1) Protocolo A

- 5 [0222] Una solución de anticuerpo con modificación de cisteínas (5-10 mg/ml en histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6) se diluyó con EDTA (25 mM en agua, 4% v/v). El pH se ajustó a -7,4 usando TRIS (1 M en agua, pH 8) después de lo cual se añadió TCEP (10 mM en agua, 20 equivalentes) y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 1-3 h. El TCEP en exceso se eliminó mediante o una columna de desalación PD-10 o un concentrador por centrifugación (filtro Vivaspin, 30 kDa de corte, PES) usando histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6.

- 15 [0223] El pH de la solución de anticuerpo resultante se elevó a -7,4 usando TRIS (1 M en agua, pH 8) después de lo cual se añadió ácido deshidroascórbico (10 mM en agua, 20 equivalentes) y la mezcla resultante se incubó a RT durante 1-2 h. A RT o 37°C, se añadió DMA seguido de una solución de conector-fármaco (10 mM en DMA). La concentración final de DMA fue 5-10%. La mezcla resultante se incubó a RT o 37°C en ausencia de luz durante 1-16 h. Para eliminar el exceso de conector-fármaco, se añadió carbón activo y la mezcla se incubó a RT durante 1 h. El carbón se eliminó usando un filtro de 0,2 µm de PES y el ADC resultante se formuló en histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6 usando un concentrador por centrifugación Vivaspin (30 kDa de corte, PES). Finalmente, la solución de ADC se sometió a filtración estéril usando un filtro de 0,22 µm de PES.

2) Protocolo B

- 20 [0224] Una solución de anticuerpo con modificación de cisteínas (500 µl, 40 mg/ml en histidina 15 mM, sacarosa 50 mM, polisorbato-20 al 0,01%, pH 6) se diluyó con histidina 100 mM, pH 5 (1300 µl). Se añadió ácido 2-(difenilfosfino)benzenosulfónico (DPPBS) (426 µl, 10 mM en agua, 32 equivalentes) y la mezcla resultante se incubó a RT durante 16-24 h. El DPPBS en exceso se eliminó mediante un concentrador por centrifugación (filtro Vivaspin, 30 kDa de corte, PES) usando histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6.

- 25 [0225] El pH de la solución de anticuerpo resultante se elevó a -7,4 usando TRIS (1 M en agua, pH 8). A RT o 37°C, se añadió DMA seguido de una solución de conector-fármaco (10 mM en DMA). La concentración final de DMA fue 5-10%. La mezcla resultante se incubó a RT o 37°C en ausencia de luz durante 1-16 h. Para eliminar el exceso de conector-fármaco, se añadió carbón activo y la mezcla se incubó a RT durante 1 h. El carbón se eliminó usando un filtro de 0,2 µm de PES y el ADC resultante se formuló en histidina 4,2 mM, trehalosa 50 mM, pH 6 usando un concentrador por centrifugación Vivaspin (30 kDa de corte, PES). Finalmente, la solución de ADC se sometió a filtración estéril usando un filtro de 0,22 µm de PES.

- 35 [0226] Usando los procedimientos generales de conjugación anteriores, se sintetizaron ADC con modificación de cisteínas y de tipo salvaje basados en los conectores-fármacos de la invención y el conector-fármaco vc-seco-DUBA (SYD980, compuesto conector-fármaco 1) y se caracterizaron usando la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) analítica, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y la cromatografía de fase hidrofóbica protegida (SHPC).

- 40 [0227] Como es evidente por la HIC analítica, había diferencias en los tiempos de retención (RT) para la especie DAR2 de los diferentes ADC (tablas 1A y 1B). De manera más interesante, la conjugación de un fármaco con un anticuerpo a través de un exoconector no lineal dio lugar a una reducción (drástica) en el tiempo de retención en comparación con los fármacos que se conjugaron a través de un conector lineal conocido. Esta reducción fue más pronunciada en los ADC que comprenden exoconectores no lineales donde el fármaco estaba posicionado más cerca al anticuerpo, es decir, el número de átomos en el conector entre el fármaco y el anticuerpo es inferior (número de átomos que aumenta desde 7 para el compuesto conector-fármaco 3 hasta 16 para el compuesto conector-fármaco 6).

- 45 [0228] Como se muestra en la WO2015/177360, la conjugación de un conector-fármaco en sitios específicos dentro de la cavidad del Fab o la cavidad del Fc de un anticuerpo reduce el tiempo de retención en comparación con los ADC que están conjugados a través de disulfuros endógenos parcialmente reducidos. La conjugación de los conectores-fármacos de la invención en estos sitios específicos redujo adicionalmente el tiempo de retención, es decir, disminuyó adicionalmente la diferencia en la hidrofobicidad entre un anticuerpo conjugado y uno no conjugado.

[0229] Para cuantificar adicionalmente este efecto, se introduce el término hidrofobicidad relativa, que se define como:

$$(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, ADC \text{ de referencia}} - RT_{DAR0, ADC \text{ de referencia}}).$$

- 5 En esencia, la hidrofobicidad relativa es una medida que, basándose en datos HIC, permite una comparación fácil entre la hidrofobicidad de los ADC que comprenden conectores-fármacos donde el conector es un conector lineal y los ADC que comprenden conectores-fármacos que tienen un exoconector no lineal. Los datos se resumen en las tablas 1A y 1B.

Tabla 1A. La hidrofobicidad relativa de los ADC que comprenden varios anticuerpos de tipo salvaje (wt) y varios compuestos conector-fármaco (LD) en la columna HIC analítica previamente especificada

Anticuerpo ¹	Mutación de Cys		LD	DAR	HMW (%) ³	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	Hidrofobicidad relativa ⁴
	HC	LC						
Trastuzumab	wt	wt	1 ²	1,7	1,1	9,9	6,9	1,0
Trastuzumab	wt	wt	3	1,9	2,4	8,5	6,9	0,5
Trastuzumab	wt	wt	4	2,3	4,0	8,9	6,9	0,7
Trastuzumab	wt	wt	5	1,9	2,5	9,2	6,9	0,8
Trastuzumab	wt	wt	6	2,1	1,9	9,9	6,9	0,8
Trastuzumab	wt	wt	7	2,1	3,6	9,5	6,9	0,9
Trastuzumab	wt	wt	8	1,9	2,8	9,3	6,9	0,8
Rituximab	wt	wt	1 ²	2,1	4,1	10,4	7,9	1,0
Rituximab	wt	wt	3	2,0	4,1	9,1	7,8	0,5
Rituximab	wt	wt	4	2,0	3,9	9,4	7,9	0,6
Rituximab	wt	wt	5	1,9	4,3	9,7	7,9	0,7
Rituximab	wt	wt	6	2,0	6,9	9,8	7,9	0,8
Rituximab	wt	wt	7	1,9	6,0	10,0	7,9	0,8
Rituximab	wt	wt	8	2,0	1,6	9,9	7,9	0,8
H8	wt	wt	1 ²	1,8	6,0	9,8	6,4	1,0
H8	wt	wt	3	1,8	1,3	8,3	6,4	0,6
H8	wt	wt	4	1,8	1,7	8,7	6,4	0,7
H8	wt	wt	5	1,8	1,4	9,0	6,4	0,8
H8	wt	wt	6	1,9	3,3	9,1	6,4	0,8
H8	wt	wt	7	1,9	1,3	9,1	6,4	0,8
H8	wt	wt	8	1,8	1,7	9,4	6,4	0,9
PSMA	wt	wt	1 ²	1,8	7,7	9,7	6,9	1,0
PSMA	wt	wt	3	1,7	4,6	8,5	7,2	0,5
PSMA	wt	wt	4	1,7	9,6	9,2	7,2	0,7
PSMA	wt	wt	5	1,7	5,1	9,5	7,2	0,8
PSMA	wt	wt	6	1,7	6,5	9,7	7,2	0,9

¹ Conjugación aleatoria -no específica de sitio-
² Conector-fármaco con conector lineal
³ HMW son especies de alto peso molecular, que reflejan la cantidad de agregados formados
⁴ Definida como $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, ADC \text{ de referencia}} - RT_{DAR0, ADC \text{ de referencia}})$, RT es el tiempo de retención; el anticuerpo respectivo unido al compuesto conector-fármaco 1 es el ADC de referencia

- 10 [0230] La figura 2 muestra gráficamente los datos de la tabla 1A. La hidrofobicidad (relativa) de los ADC aumenta con la longitud del conector, es decir, a menor número de átomos entre el átomo S del anticuerpo y el átomo O del fármaco, menor es la hidrofobicidad (relativa). Los ADC con el compuesto conector-fármaco 3 muestran la hidrofobicidad relativa más baja. Aunque los ADC con el compuesto conector-fármaco 7 tienen una hidrofobicidad

relativa inferior que los ADC de comparación con el compuesto conector-fármaco **1**, el grupo PEG polar unido al sitio de escisión en el compuesto conector-fármaco **7** no reduce adicionalmente la hidrofobicidad relativa del ADC, cuando se compara con los ADC que comprenden el compuesto conector-fármaco **4** que tiene un conector similar pero carece del grupo PEG.

5 Tabla 1B. La hidrofobicidad relativa de los ADC que comprenden anticuerpos anti-PSMA de tipo salvaje (wt) o con modificación de cisteínas y varios compuestos conector-fármaco (LD) en la columna HIC analítica previamente especificada

Anticuerpo	Mutación de Cys		LD	DAR	HMW (%) ³	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	Hidrofobicidad relativa ⁴
	HC	LC						
PSMA ¹	wt	wt	1 ²	1,8	7,7	9,7	6,9	1,0
PSMA ¹	wt	wt	3	1,7	4,6	8,5	7,2	0,5
PSMA ¹	wt	wt	4	1,7	9,6	9,2	7,2	0,7
PSMA ¹	wt	wt	5	1,7	5,1	9,5	7,2	0,8
PSMA ¹	wt	wt	6	1,7	6,5	9,7	7,2	0,9
PSMA-LC40	wt	P40C	1 ²	1,8	0,5	9,5	6,9	0,9
PSMA-LC40	wt	P40C	3	1,8	0,7	7,9	7,2	0,3
PSMA-LC40	wt	P40C	4	1,8	0,7	8,0	7,2	0,3
PSMA-LC40	wt	P40C	5	1,7	0,8	8,2	7,2	0,4
PSMA-LC40	wt	P40C	6	1,8	0,8	8,6	7,2	0,5
PSMA-LC41	wt	G41C	1 ²	1,8	0,6	8,7	6,9	0,6
PSMA-LC41	wt	G41C	3	1,7	1,1	7,4	7,2	0,1
Anticuerpo	Mutación de Cys		LD	DAR	HMW (%) ³	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	Hidrofobicidad relativa ⁴
	HC	LC						
PSMA-LC41	wt	G41C	4	1,7	0,9	7,5	7,2	0,1
PSMA-LC41	wt	G41C	5	1,5	0,7	7,9	7,2	0,3
PSMA-LC41	wt	G41C	6	1,8	1,2	8,2	7,2	0,4
PSMA-HC41	S41C	wt	1 ²	1,7	1,4	8,5	6,8	0,6
PSMA-HC41	S41C	wt	3	1,8	1,0	7,2	7,0	0,1
PSMA-HC41	S41C	wt	4	1,6	2,9	7,3	6,9	0,1
PSMA-HC41	S41C	wt	5	1,6	0,9	7,6	7,1	0,2
PSMA-HC41	S41C	wt	6	1,8	0,2	7,8	7,2	0,2
PSMA-HC41	S41C	wt	7	1,7	2,5	7,8	7,1	0,3
PSMA-HC41	S41C	wt	8	1,8	2,7	8,5	7,1	0,5
PSMA-HC41	S41C	wt	9	1,6	3,3	9,5	7,1	0,9
PSMA-HC41	S41C	wt	10	1,6	2,5	7,8	7,0	0,3
PSMA-HC41	S41C	wt	36	2,0	0,6	7,2	7,0	0,1
PSMA-HC41	S41C	wt	64	1,8	0,3	7,7	7,0	0,3
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	1 ²	1,8	0,9	11,3	6,8	1,6
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	3	1,6	1,0	9,1	7,0	0,8
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	4	1,7	0,7	9,7	7,0	1,0
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	5	1,2	1,3	10,5	7,2	1,2
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	6	1,6	0,8	10,7	7,2	1,3

¹Conjugación aleatoria -no específica de sitio-

² Conector-fármaco con conector lineal

³ HMW son especies de alto peso molecular, que reflejan la cantidad de agregados formados

⁴ Definida como $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, ADC \text{ de referencia}} - RT_{DAR0, ADC \text{ de referencia}})$, RT es el tiempo de retención; PSMA enlazado al compuesto conector-fármaco **1** es el ADC de referencia

⁵ ADC de comparación con conector-fármaco conjugado con un residuo de cisteína que apunta hacia afuera

[0231] Las figuras 3A-C y 4 muestran gráficamente los datos de la tabla 1B.

[0232] En la figura 3A, los conectores-fármacos en el eje horizontal están dispuestos en el orden de hidrofobicidad de conector-fármaco decreciente. El ADC de comparación es un ADC con el mismo anticuerpo de tipo salvaje o con modificación de cisteínas conjugado con el compuesto conector-fármaco lineal 1. La hidrofobicidad (relativa) de los ADC con conectores-fármacos de la invención disminuye con respecto al ADC de comparación. Esta disminución en la hidrofobicidad es más pronunciada en los ADC donde el conector-fármaco se conjuga en una cisteína posicionada en la cavidad del Fab.

[0233] En la figura 3B, las hidrofobicidades de ADC PSMA conjugados de tipo salvaje que comprenden conectores-fármacos de la invención y el conector-fármaco de referencia 1 se toman como los valores de referencia. Este gráfico visualiza de forma más clara las diferencias entre varios conectores-fármacos en un anticuerpo. Especialmente para los ADC donde los conectores-fármacos están conjugados en una cisteína posicionada en la cavidad del Fab, hay una diferencia relativamente grande en la hidrofobicidad relativa con los conectores-fármacos de la invención en comparación con el compuesto conector-fármaco 1 de referencia lineal.

[0234] La figura 3C muestra las diferencias en la hidrofobicidad relativa de los varios conjugados con respecto al ADC de referencia PSMA-LD1. La diferencia entre varios anticuerpos que comprenden el mismo conector-fármaco de la invención en una cisteína posicionada en la cavidad del Fab es pequeña, pero se observa una disminución significativa con respecto a los mismos anticuerpos que comprenden el compuesto conector-fármaco 1 de referencia lineal. Así, el efecto de protección potencial de la cavidad del Fab se usa óptimamente en combinación con los conectores no lineales y los conectores-fármacos de la invención.

[0235] La figura 4 es un cromatograma HIC que muestra la diferencia en la hidrofobicidad relativa de varios conjugados con respecto al anticuerpo desnudo de referencia PSMA-HC41. La hidrofobicidad (relativa) de los ADC con conectores-fármacos de la invención aumenta con respecto al anticuerpo desnudo. Sin embargo, este aumento es menor cuando la distancia entre el anticuerpo y el fármaco es menor, es decir, el número de átomos entre el átomo S del anticuerpo y el átomo O del fármaco es menor.

Unión celular

[0236] Tres ADC anti-PSMA, PSMA-LD1, PSMA-HC41-LD1 y PSMA-HC120-LD1 de comparación, tenían afinidades de unión iguales en células LNCaP-C4.2 que expresan PSMA (EC_{50} en el rango de 0,1-0,2 $\mu\text{g/ml}$) similares al anticuerpo de tipo salvaje, y los tres ADC fueron incapaces de unirse a células DU-145 negativas para PSMA ($EC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$).

[0237] Dos ADC anti-5T4, H8-LD1 y H8-HC40-LD1, tenían afinidades de unión iguales en células MDA-MB-468 que expresan 5T4 (EC_{50} en el rango de 0,1-1,2 $\mu\text{g/ml}$) similares al anticuerpo H8, y ambos ADC fueron incapaces de unirse a células SK-MEL-30 negativas para 5T4 ($EC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$).

[0238] Así, la unión de los ADC no se vio afectada por el conector-fármaco derivado de duocarmicina unido.

Citotoxicidad *in vitro*

[0239] Las potencias en las células LNCaP-C4.2 que expresan PSMA de los ADC anti-PSMA que comprenden los conectores-fármacos no lineales de la invención (IC_{50} en el rango de 0,2-2,1 nM, basado en equivalentes farmacológicos, véase la tabla 2A a continuación), ya sea de tipo salvaje o conjugados de manera específica de sitio, fueron similares a las potencias de los respectivos ADC anti-PSMA de comparación que comprenden el compuesto conector-fármaco 1 de referencia lineal.

[0240] Todos los ADC eran inactivos en células DU-145 negativas para PSMA ($IC_{50} > 70 \text{ nM}$), lo que indica la muerte selectiva de células tumorales a través del PSMA.

[0241] Los cuatro ADC de control sin unión de tipo salvaje y específicos de sitio fueron al menos 15 veces menos potentes que los respectivos ADC anti-PSMA que comprendían los conectores-fármacos no lineales de la presente invención.

Tabla 2A. Citotoxicidad *in vitro* de los ADC anti-PSMA en células tumorales humanas que expresan PSMA

Anticuerpo	Mutación de Cys		LD	Línea celular positiva para PSMA LNCaP-C4.2		
	HC	LC		IC ₅₀ (nM) ⁷	95% CI ³ (nM)	% de eficacia ⁴
PSMA ¹	wt	wt	1 ²	0,23	0,20-0,27	82
PSMA ¹	wt	wt	3	1,23	0,79-1,94	73
PSMA ¹	wt	wt	4	1,18	0,79-1,74	78
PSMA ¹	wt	wt	5	1,79	1,04-3,08	87
PSMA ¹	wt	wt	6	0,85	0,61-1,18	73
PSMA-LC40	wt	P40C	1 ²	0,30	0,23-0,37	80
PSMA-LC40	wt	P40C	3	0,49	0,34-0,70	75
PSMA-LC40	wt	P40C	4	0,37	0,27-0,49	78
PSMA-LC40	wt	P40C	5	0,41	0,32-0,52	78
PSMA-LC40	wt	P40C	6	0,39	0,31-0,48	77
PSMA-LC41	wt	G41C	1 ²	0,31	0,25-0,38	80
PSMA-LC41	wt	G41C	3	0,37	0,29-0,46	73
PSMA-LC41	wt	G41C	4	0,24	0,20-0,30	77
PSMA-LC41	wt	G41C	5	0,24	0,19-0,29	75
PSMA-LC41	wt	G41C	6	0,31	0,25-0,39	78
PSMA-HC41	S41C	wt	1 ²	0,25	0,21-0,28	78
PSMA-HC41	S41C	wt	3	1,4	0,79-2,50	89
PSMA-HC41	S41C	wt	4	0,48	0,40-0,58	88
PSMA-HC41	S41C	wt	5	0,26	0,22-0,31	77
PSMA-HC41	S41C	wt	6	0,47	0,39-0,58	79
PSMA-HC41	S41C	wt	7	0,37	0,29-0,46	86
PSMA-HC41	S41C	wt	8	0,52	0,42-0,66	88
PSMA-HC41	S41C	wt	36	>100	n.a. ⁶	65
PSMA-HC41	S41C	wt	64	2,07	0,97-4,44	80
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	1 ²	0,14	0,13-0,16	82
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	3	1,17	0,62-2,19	91
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	4	0,76	0,52-1,10	85
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	5	0,64	0,46-0,89	71
PSMA-HC120 ⁵	T120C	wt	6	0,47	0,38-0,60	74
Control sin unión ¹	wt	wt	1 ²	28,86	24,76-36,02	96
Control sin unión-HC41	P41C	wt	1 ²	>100	n.a.	n.a.
Fármaco libre				0,02	0,02-0,03	98

¹Conjugación aleatoria -no específica de sitio-² Conector-fármaco con conector lineal³ 95% CI es el intervalo de confianza al 95%⁴ El porcentaje de eficacia se dio a la concentración máxima evaluada (-100 nM) y se calculó dividiendo la luminiscencia medida para cada fármaco o ADC con la media promedio de las células no tratadas (sólo medio de cultivo) multiplicada por 100.⁵ ADC de comparación con conector-fármaco conjugado con un residuo de cisteína que apunta hacia afuera⁶ n.a. es no aplicable⁷ Los valores IC₅₀ relativos se calcularon como la concentración que da una respuesta a medio camino entre la parte inferior y la parte superior de la curva, cuando se usa una ecuación de respuesta a la dosis sigmoidea de regresión no lineal con pendiente variable para el ajuste de curvas en GraphPad Prism.

[0242] Las potencias de los ADC anti-HER2 de tipo salvaje que comprenden los conectores-fármacos de la invención fueron similares al ADC trastuzumab-LD1 en células SK-BR-3 que expresan HER2 (IC₅₀ entre 0,1 y 0,3 nM, Tabla 2B). Los ADC anti-HER2 fueron inactivos en células SW620 negativas para HER2 (IC₅₀ >100 nM).

[0243] Los tres ADC de control sin unión fueron al menos 200 veces menos potentes que los ADC anti-HER2.

5 Tabla 2B. Citotoxicidad *in vitro* de los ADC anti-HER2 en las células tumorales humanas que expresan HER2

Anticuerpo	Mutación de Cys		LD	Línea celular positiva para HER2 SK-BR-3		
	HC	LC		IC ₅₀ (nM) ⁶	95% CI ³ (nM)	% de eficacia ⁴
Trastuzumab ¹	wt	wt	1 ²	0,18	0,16-0,19	97
Trastuzumab ¹	wt	wt	3	0,29	0,27-0,31	97
Trastuzumab ¹	wt	wt	6	0,23	0,21-0,24	98
Control sin unión ¹	wt	wt	1 ²	168	17,11-1664	95
Fármaco libre				0,06	0,05-0,07	98

¹ Conjugación aleatoria -no específica de sitio-

² Conector-fármaco con conector lineal

³ 95% CI es el intervalo de confianza al 95%

⁴ El porcentaje de eficacia se dio a la concentración máxima evaluada (-100 nM) y se calculó dividiendo la luminiscencia medida para cada fármaco o ADC con la media promedio de las células no tratadas (sólo medio de cultivo) multiplicada por 100.

⁵ n.a. es no aplicable

⁶ Los valores IC₅₀ relativos se calcularon como la concentración que da una respuesta a medio camino entre la parte inferior y la parte superior de la curva, cuando se usa una ecuación de respuesta a la dosis sigmoidea de regresión no lineal con pendiente variable para el ajuste de curvas en GraphPad Prism.

[0244] Juntos, estos datos muestran que los ADC que comprenden los compuestos conector-fármaco de la invención tienen una potencia para matar células tumorales excelente. Además, el enlace específico de sitio de dichos conectores-fármacos en la región variable de la parte Fab no tiene un impacto en la citotoxicidad *in vitro* con respecto al enlace específico de sitio del compuesto conector-fármaco 1 de comparación lineal, que libera la misma unidad farmacológica de duocarmicina después de la escisión.

Modelo animal de xenoinjerto tumoral

[0245] La eficacia *in vivo* de cuatro ADC anti-PSMA se evaluó en el modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata LNCaP-C4.2. La línea celular LNCaP-C4.2 es una línea celular epitelial de carcinoma de próstata humana derivada de un xenoinjerto que se propagó en serie en ratones después de la regresión inducida por castración y recurrencia de la línea celular de xenoinjerto LNCaP-FGC dependiente de andrógenos precursora.

[0246] Se indujeron tumores subcutáneamente por inyección de 1x10⁷ células LNCaP-C4.2 en 200 µL de RPMI 1640 con matrigel (50:50, v:v) en el flanco derecho de ratones CB17-SCID macho. La implantación de células tumorales LNCaP-C4.2 se realizó de 24 a 72 horas después de una irradiación del cuerpo entero con una fuente γ (1,44 Gy, ⁶⁰Co, BioMep, Bretenières, Francia). Los tratamientos se empezaron cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100-200 mm³. Los ratones se asignaron aleatoriamente según su volumen tumoral individual en grupos y recibieron una inyección i.v. única de 2 mg/kg (figura 5A) o 5 mg/kg (figura 5B) de ADC anti-PSMA o vehículo en la vena caudal. Se monitorearon los cambios en los volúmenes tumorales. Los cuatro ADC tienen una DAR media de aproximadamente 1,6-1,8.

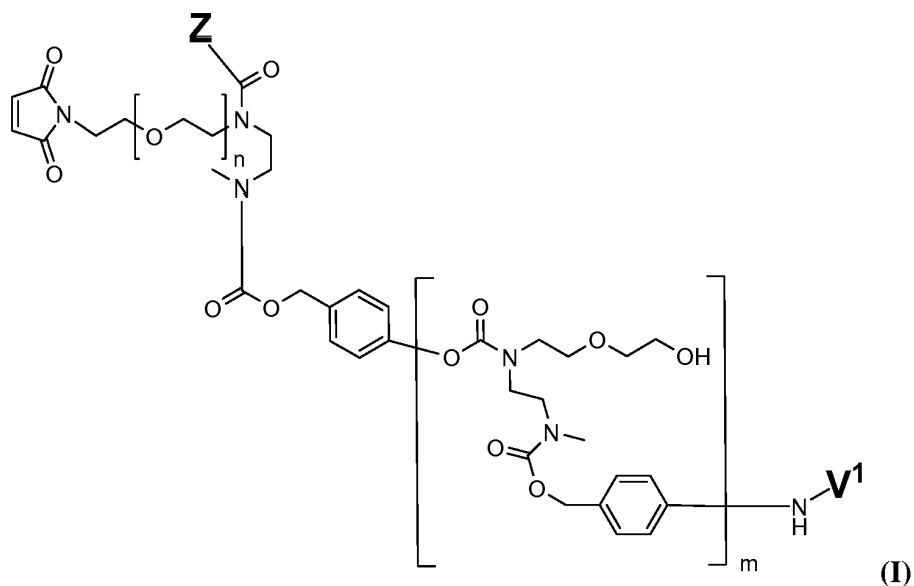
[0247] Se observó caquexia en todos los grupos; no se observó ninguna diferencia significativa en los efectos en los pesos corporales entre los cuatro ADC.

[0248] Las figuras 5A y 5B demuestran claramente que los ADC PSMA-H41C-LD4, -LD7 y -LD8 tienen una mejor eficacia *in vivo* que el ADC PSMA-H41C-LD1.

[0249] Juntos, estos datos muestran que los anticuerpos acoplados a los conectores-fármacos no lineales de la invención (dando lugar a ADC con una hidrofobicidad reducida) tienen propiedades *in vivo* ventajosas con respecto a su actividad antitumoral.

REIVINDICACIONES

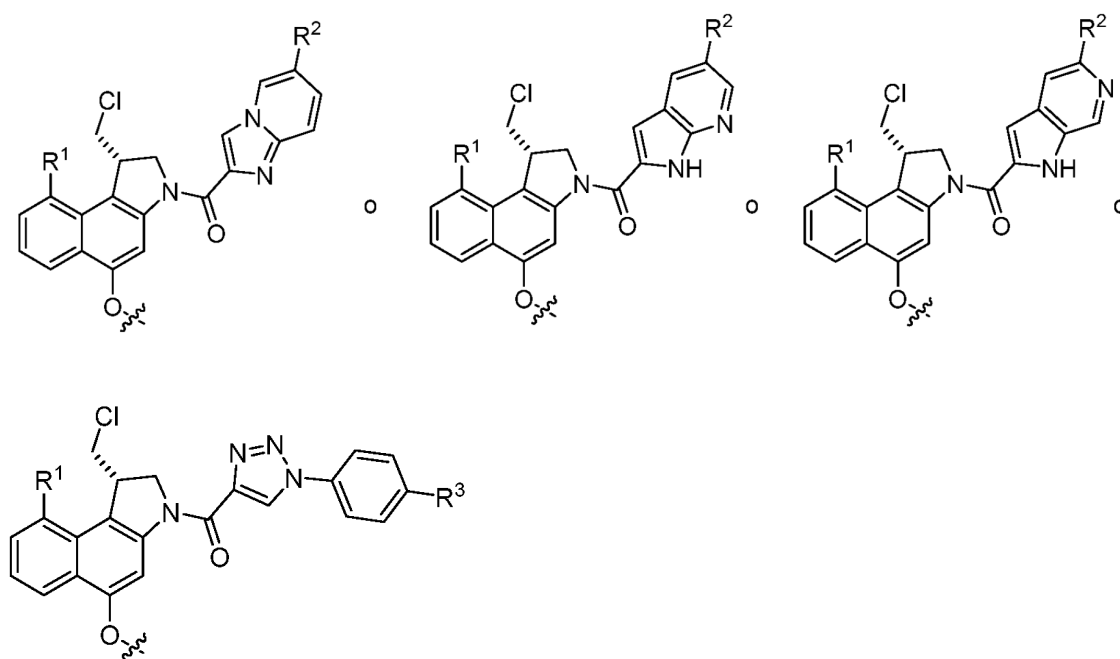
1. Compuesto conector-fármaco con la fórmula (I)



o sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, donde

- 5 **V¹** es una fracción escindible condicionalmente o transformable condicionalmente, que se puede escindir o transformar mediante un proceso químico, fotoquímico, físico, biológico o enzimático;
- Z** es un fármaco citotóxico que comprende un grupo hidroxilo fenólico a través del cual **Z** se une al conector, preferiblemente, **Z** es un derivado de duocarmicina o de dímero CBI (dímero 1,2,9,9a-tetrahidrociclopropa[c]benc[e]indol-4-ona), más preferiblemente, **Z** es un derivado de duocarmicina;
- 10 n es 0, 1, 2 o 3; y
m es 0 o 1.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde **Z** es

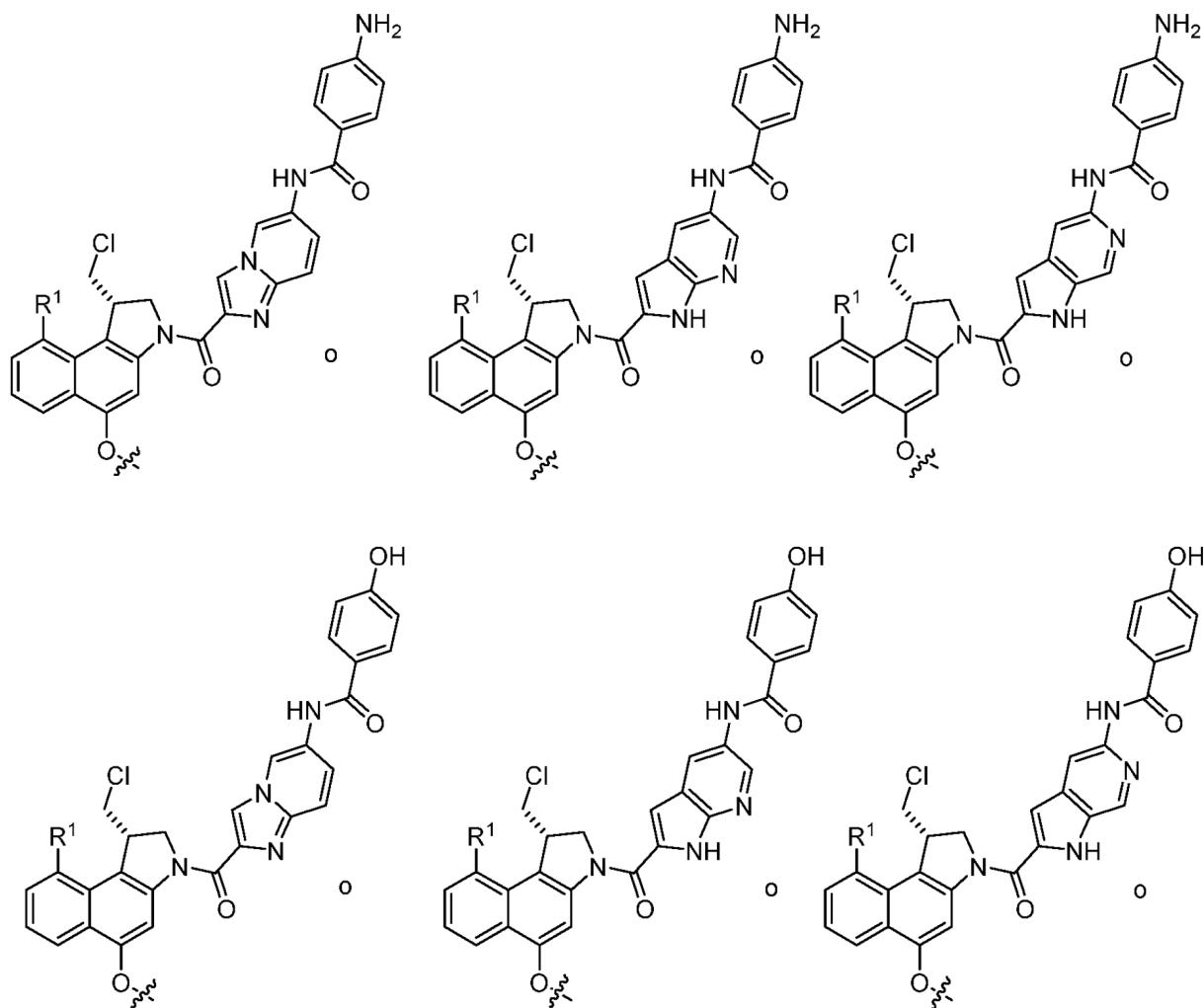


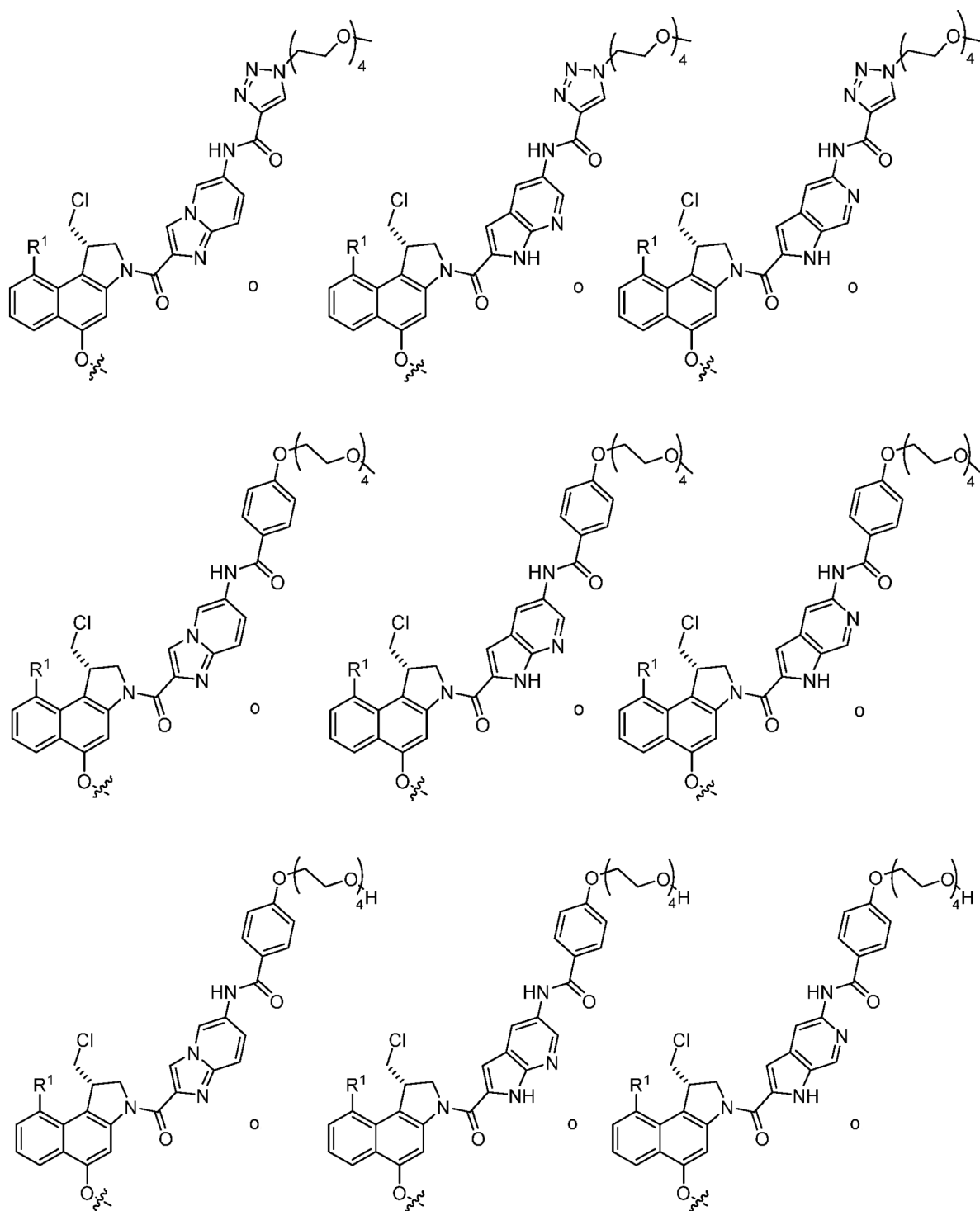
donde R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de entre H, OH, SH, NH_2 , N_3 , NO_2 , NO, CF_3 , CN, $C(O)NH_2$, $C(O)H$, $C(O)OH$, halógeno, R^a , SR^a , $S(O)R^a$, $S(O)_2R^a$, $S(O)OR^a$, $S(O)_2OR^a$, $OS(O)R^a$, $OS(O)_2R^a$, $OS(O)OR^a$, $OS(O)_2OR^a$, OR^a , NHR^a , $N(R^a)R^b$, $^+N(R^a)(R^b)R^c$, $P(O)(OR^a)(OR^b)$, $OP(O)(OR^a)(OR^b)$, $SiR^aR^bR^c$, $C(O)R^a$, $C(O)OR^a$, $C(O)N(R^a)R^b$, $OC(O)R^a$, $OC(O)OR^a$, $OC(O)N(R^a)R^b$, $N(R^a)C(O)R^b$, $N(R^a)C(O)OR^b$, $N(R^a)C(O)N(R^b)R^c$ y un grupo

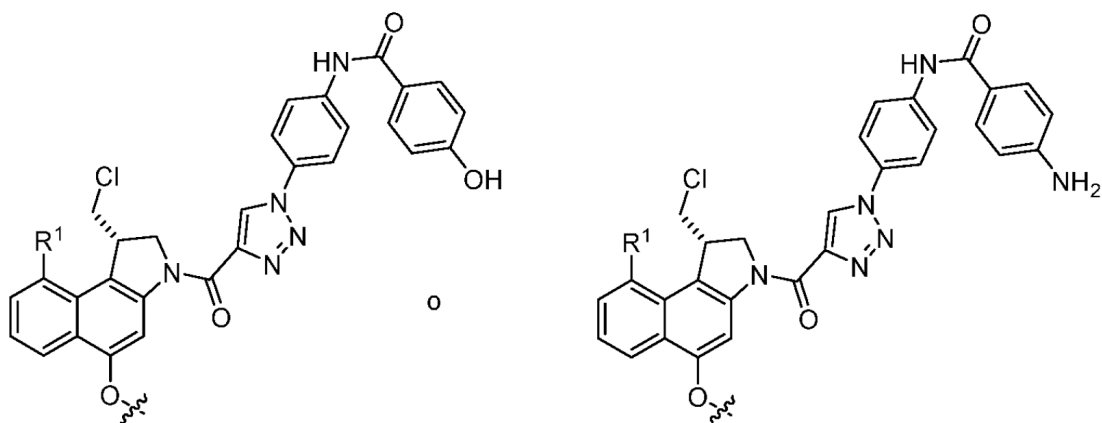
hidrosoluble, donde

R^a , R^b y R^c se seleccionan independientemente de entre H y $(CH_2CH_2O)_{aa}CH_2CH_2X^1R^{a1}$, alquilo C_{1-15} , heteroalquilo C_{1-15} , cicloalquilo C_{3-15} , heterocicloalquilo C_{1-15} , arilo C_{5-15} o heteroarilo C_{1-15} opcionalmente sustituidos, donde aa se selecciona de 1 a 1000, X^1 se selecciona de entre O, S y NR^{b1} , y R^{b1} y R^{a1} se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C_{1-3} , donde uno o más de los sustituyentes opcionales en R^a , R^b y/o R^c son opcionalmente un grupo hidrosoluble, donde dos o más de R^a , R^b y R^c están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos.

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, donde **Z** es

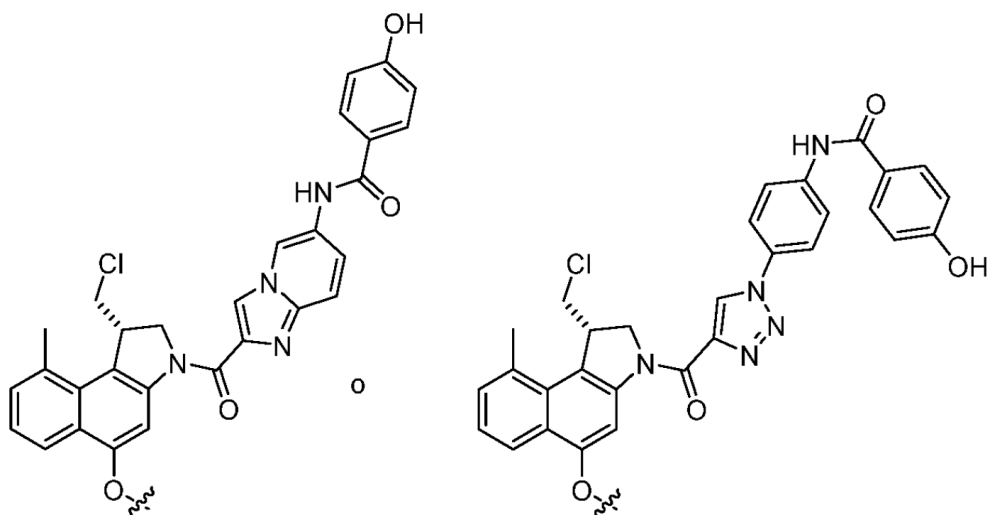






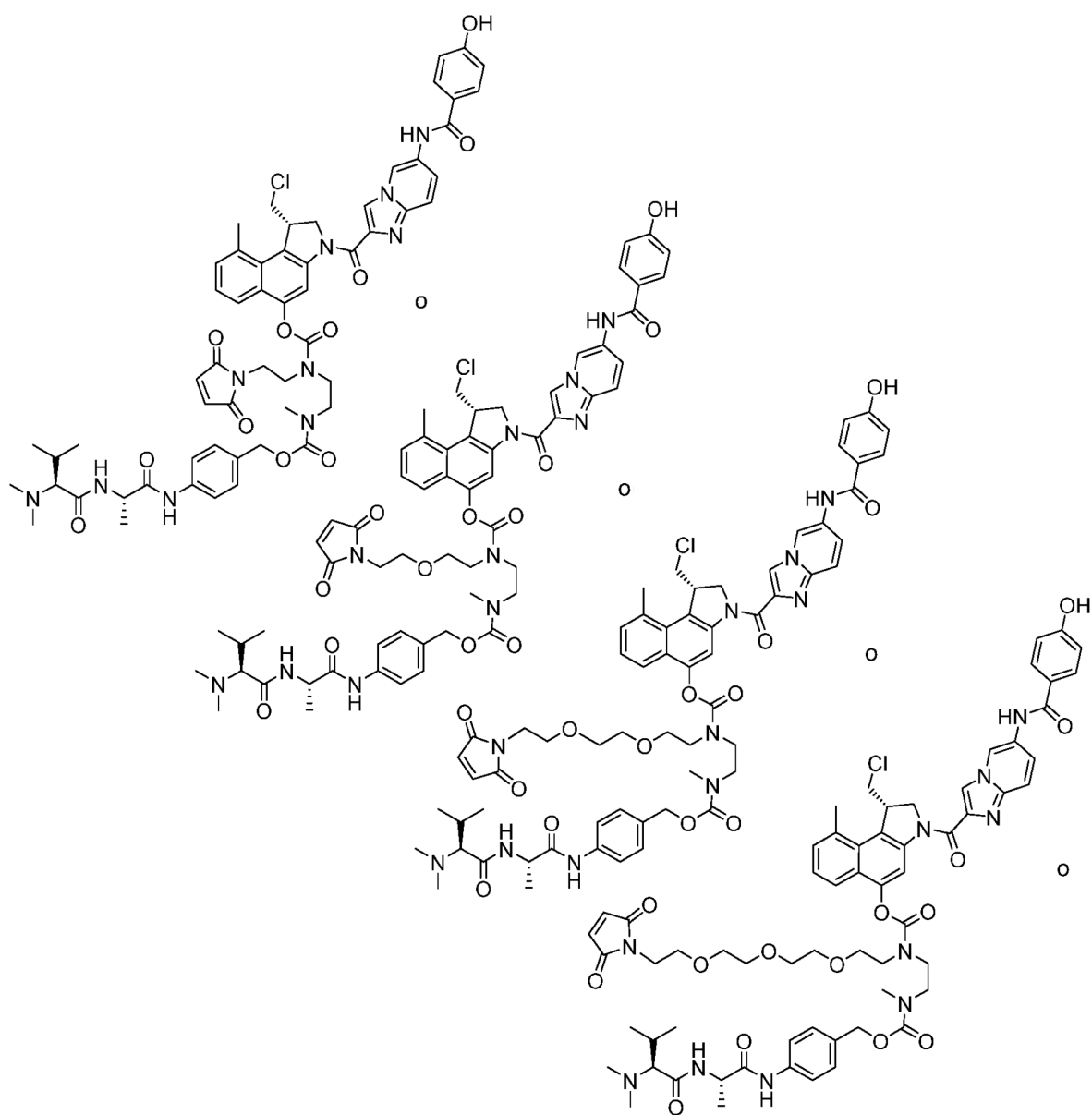
4. Compuesto según la reivindicación 2 o 3, donde R¹ se selecciona de entre H, metilo y metoxi.

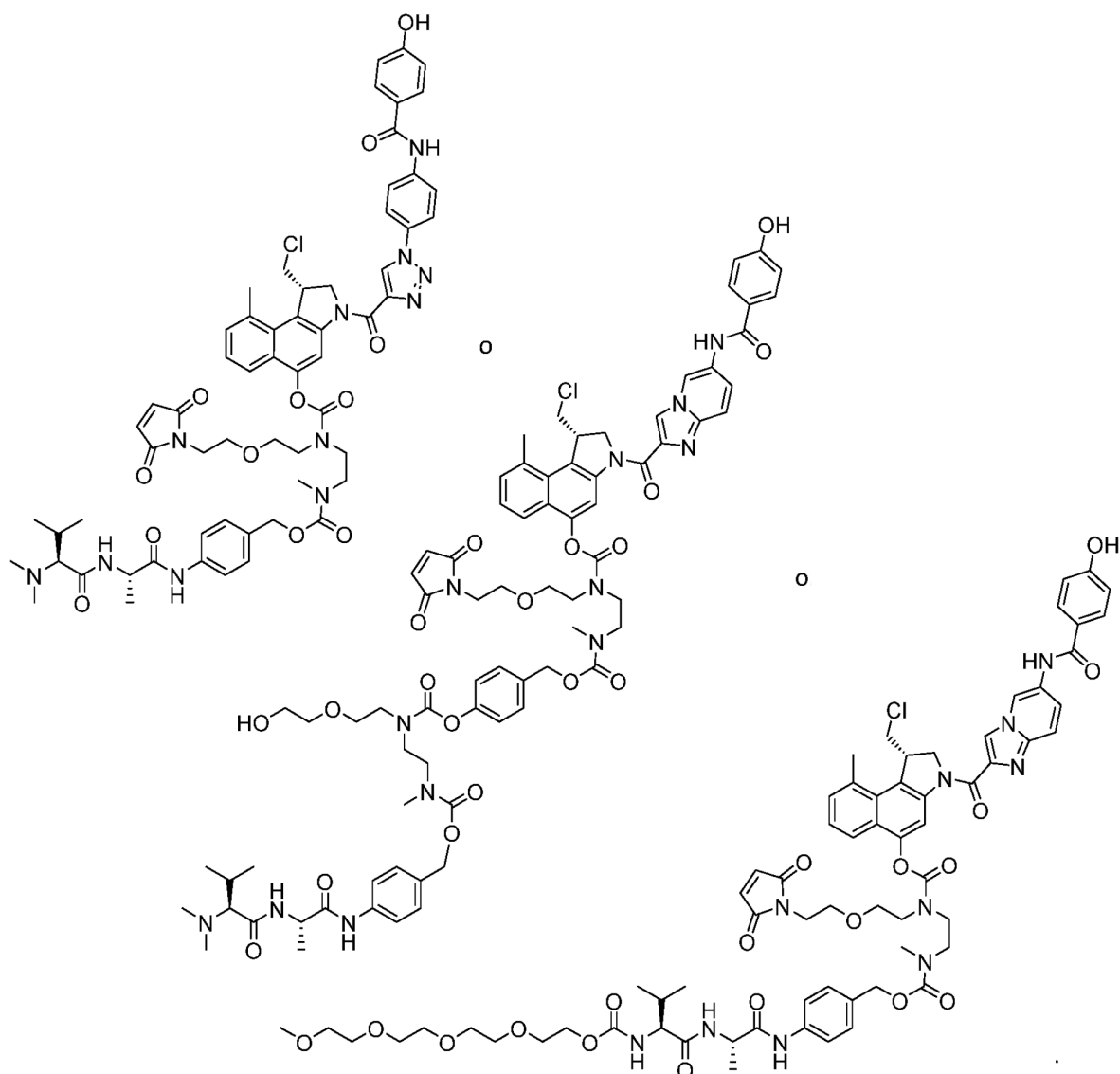
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde Z es



5 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde V¹ se selecciona de entre valilalanina, valil-lisina, valilcitrulina, fenil-alanil-lisina y alanil-fenil-alanil-lisina opcionalmente cubiertas, preferiblemente V¹ se selecciona de entre valilcitrulina y valilalanina opcionalmente cubiertas.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, seleccionado de





8. Conjugado anticuerpo-fármaco donde el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 está conjugado con un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo a través de un residuo de cisteína del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno.

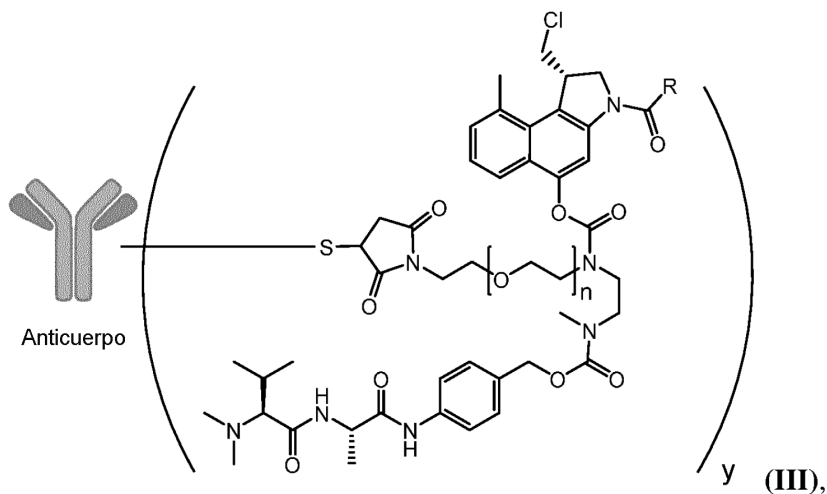
- 5 9. Conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 8, donde el compuesto está conjugado de manera específica de sitio a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo a través de una cisteína modificada en una o más posiciones de dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno seleccionada de
- 10 cadena pesada 152, 153, 155, 171, 247, 297, 339, 375 y 376 (según la numeración Eu); y
- cadena ligera 40, 41, 165 y 168 (según la numeración de Kabat).

10. Conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 9, donde el compuesto se conjuga de manera específica de sitio con un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo a través de una cisteína modificada en una o más posiciones de dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno seleccionada de

15 cadena pesada 40, 41 y 89 (según la numeración de Kabat); y

cadena ligera 40 y 41 (según la numeración de Kabat).

11. Conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 con la fórmula (III)



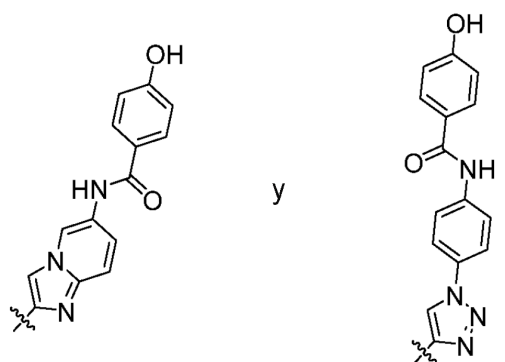
donde

Anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo;

n es 0, 1, 2 o 3;

y representa una DAR media de 1 a 6; y

R se selecciona de entre



12. Conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno se une a una diana antigénica seleccionada del grupo que consiste en anexina A1, CA242, CD19, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD44, CD47, CD56, CD70, CD74, CD79, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEACAM, CLL-1, c-MET, Cripto, DLL3, EGFR, EPCAM, EphA2, EphB3, ETBR, FAP, FcRL5, FGFR3, FOLR1, GCC, GPNMB, HER2, HMW-MAA, integrina, carbohidrato de tipo Lewis A, Lewis Y, LIV1, mesotelina, MN, MUC1, MUC16, NaPi2b, Nectina-4, PSMA, SLC44A4, STEAP-1, antígeno 5T4, Tag72, factor tisular, TF-Ag, TROP2 y VLA.

13. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 o composición farmacéutica según la reivindicación 13 para usar como un medicamento.

15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 o composición farmacéutica según la reivindicación 13 para usar en el tratamiento de tumores sólidos y neoplasias hematológicas humanas.

16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 o composición farmacéutica según la reivindicación 13 para usar en una terapia combinatoria con uno o más agentes terapéuticos diferentes.

Figura 1

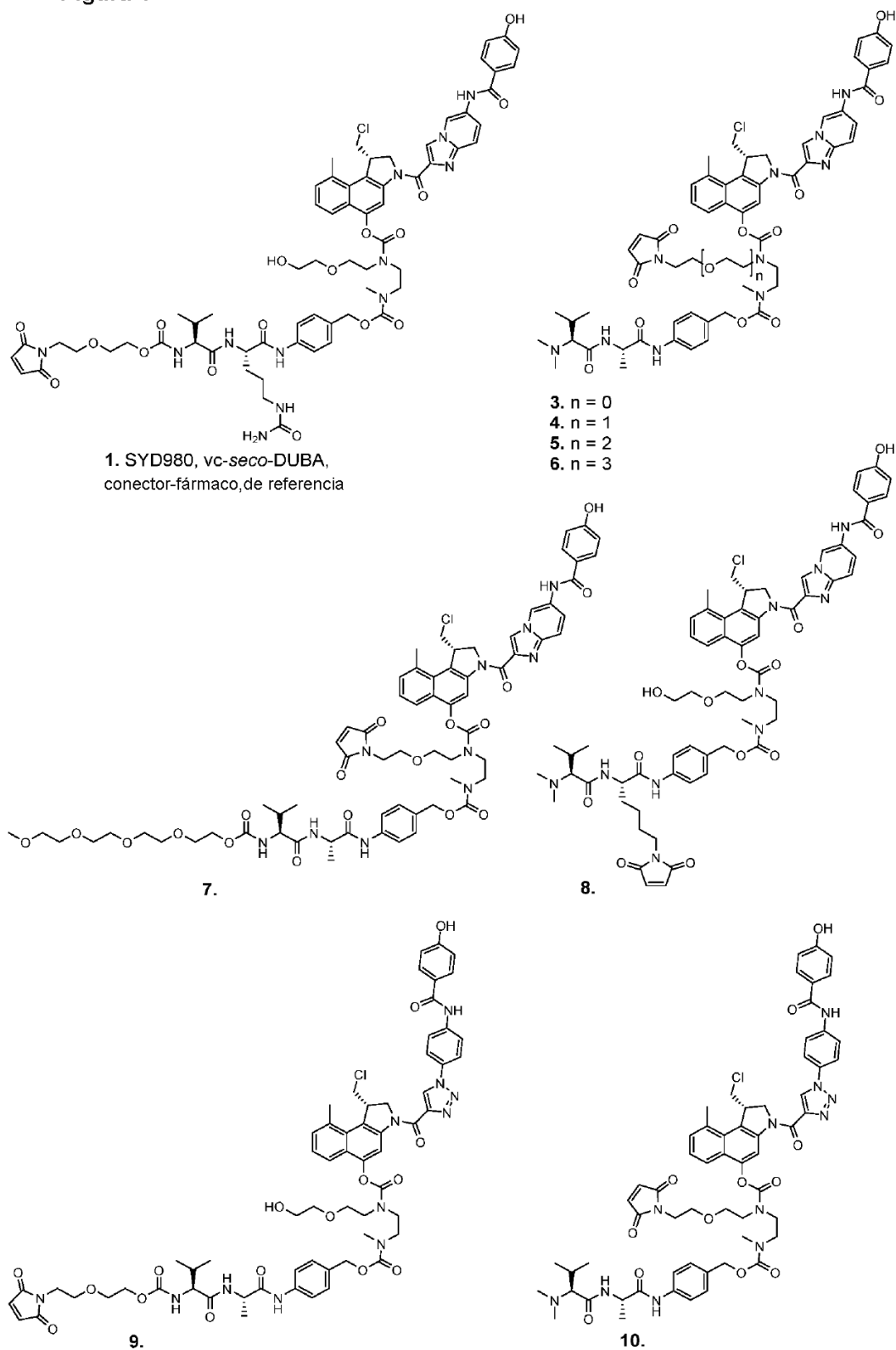
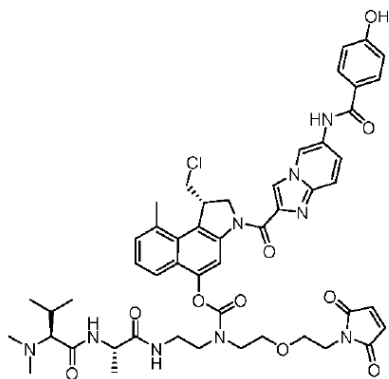
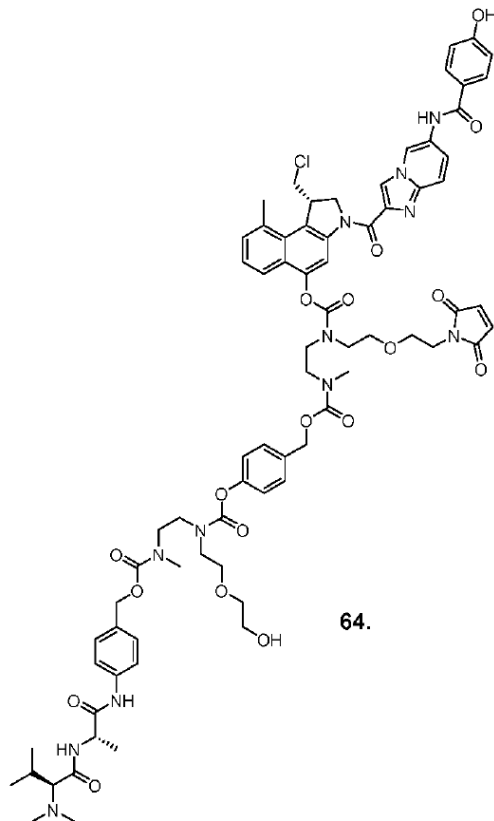


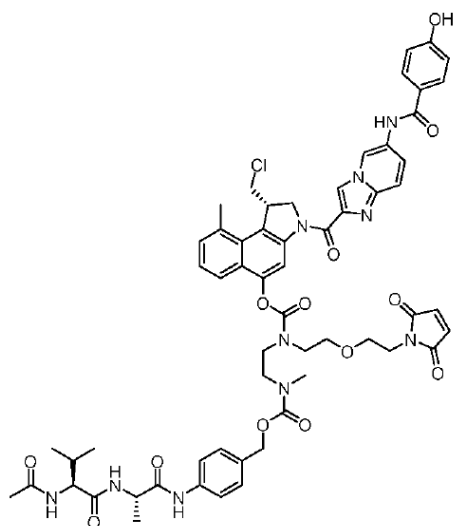
Figura 1 (continuación)



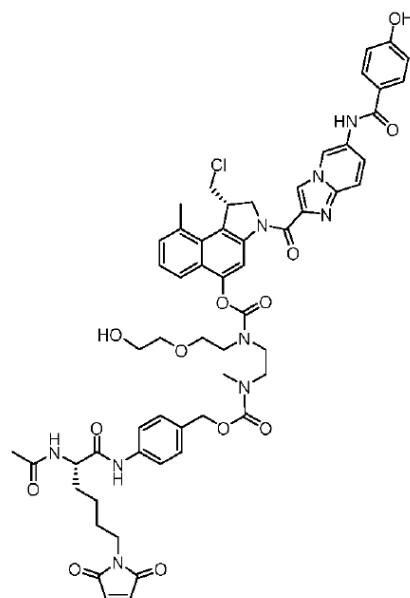
36.



64.



69.



74.

Figura 2

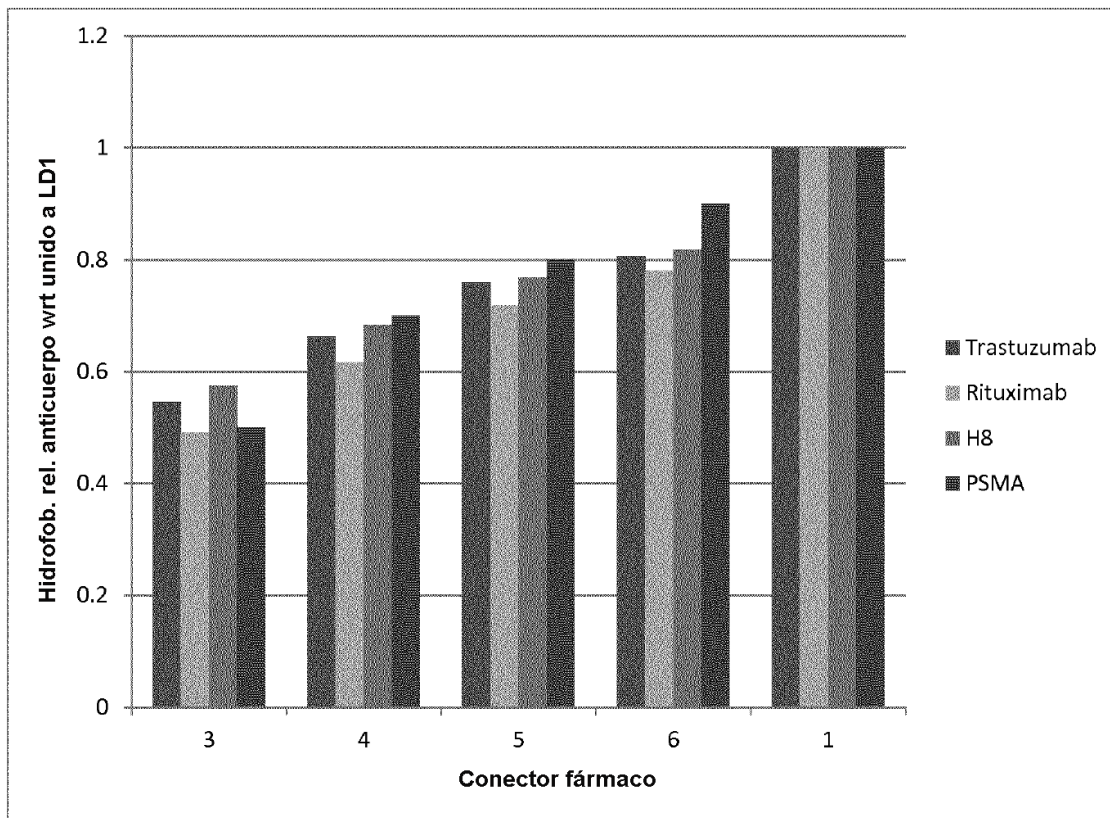


Figura 3A

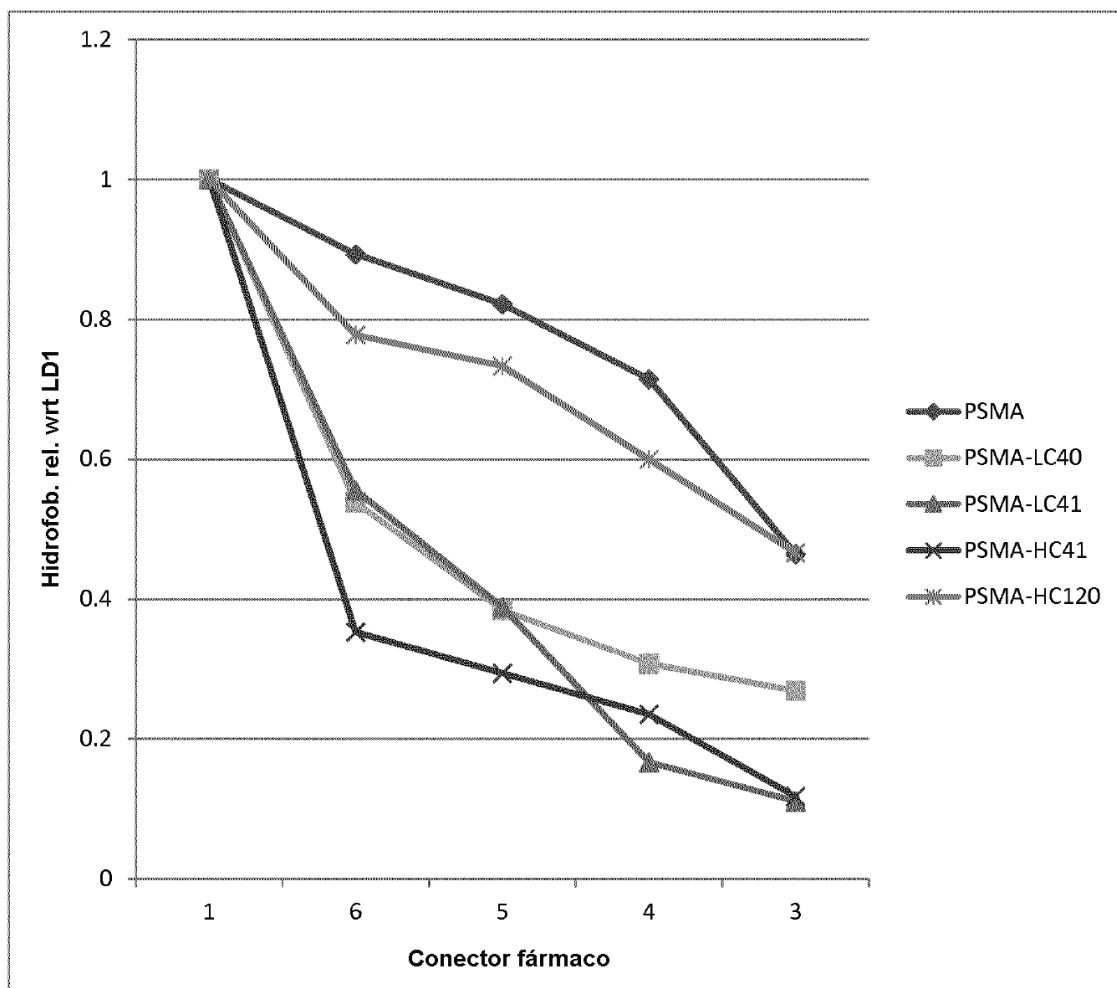


Figura 3B

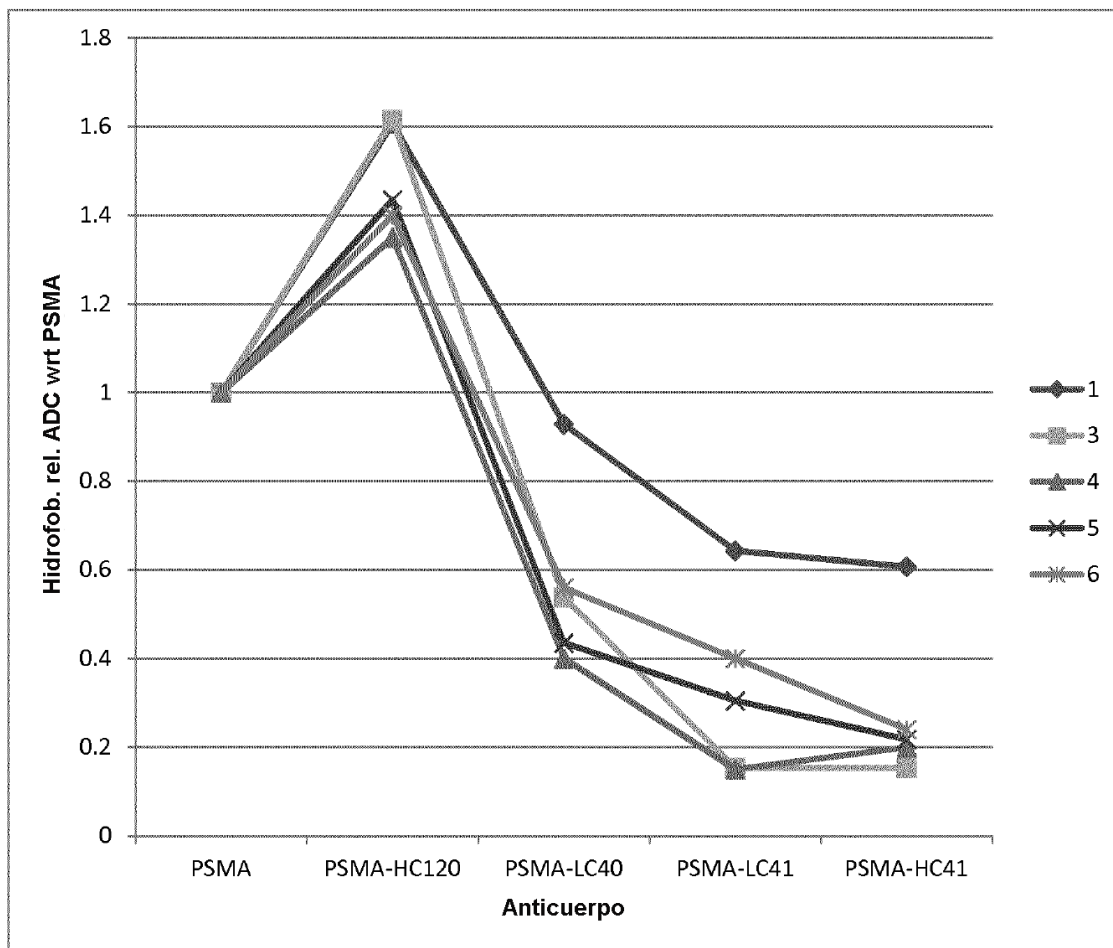


Figura 3C

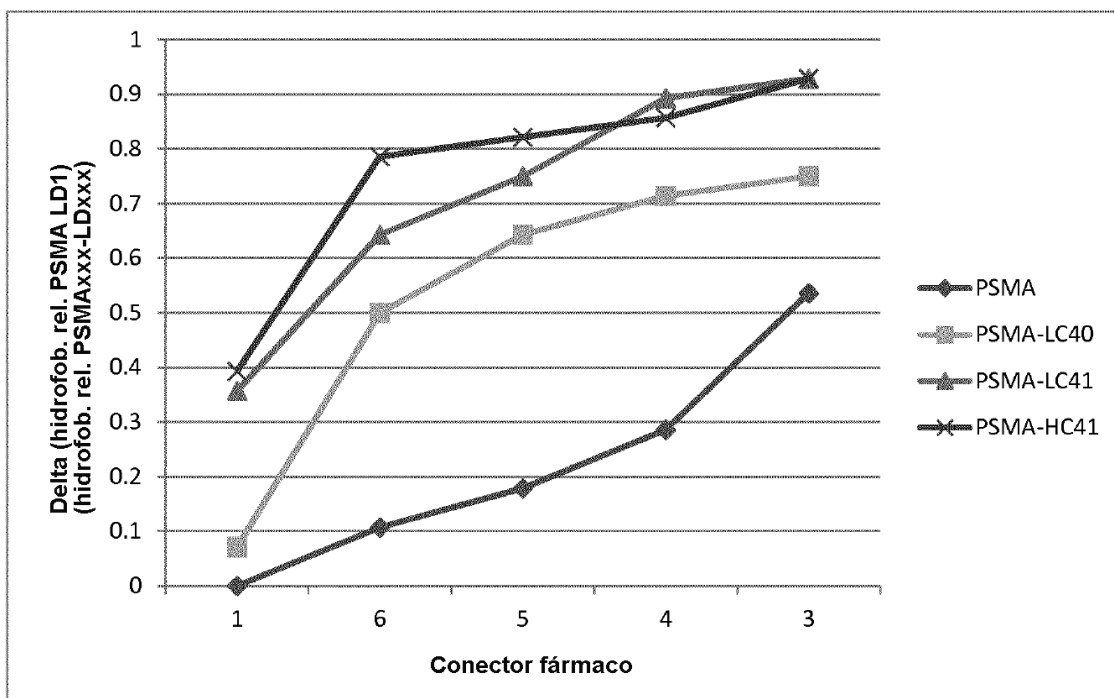


Figura 4

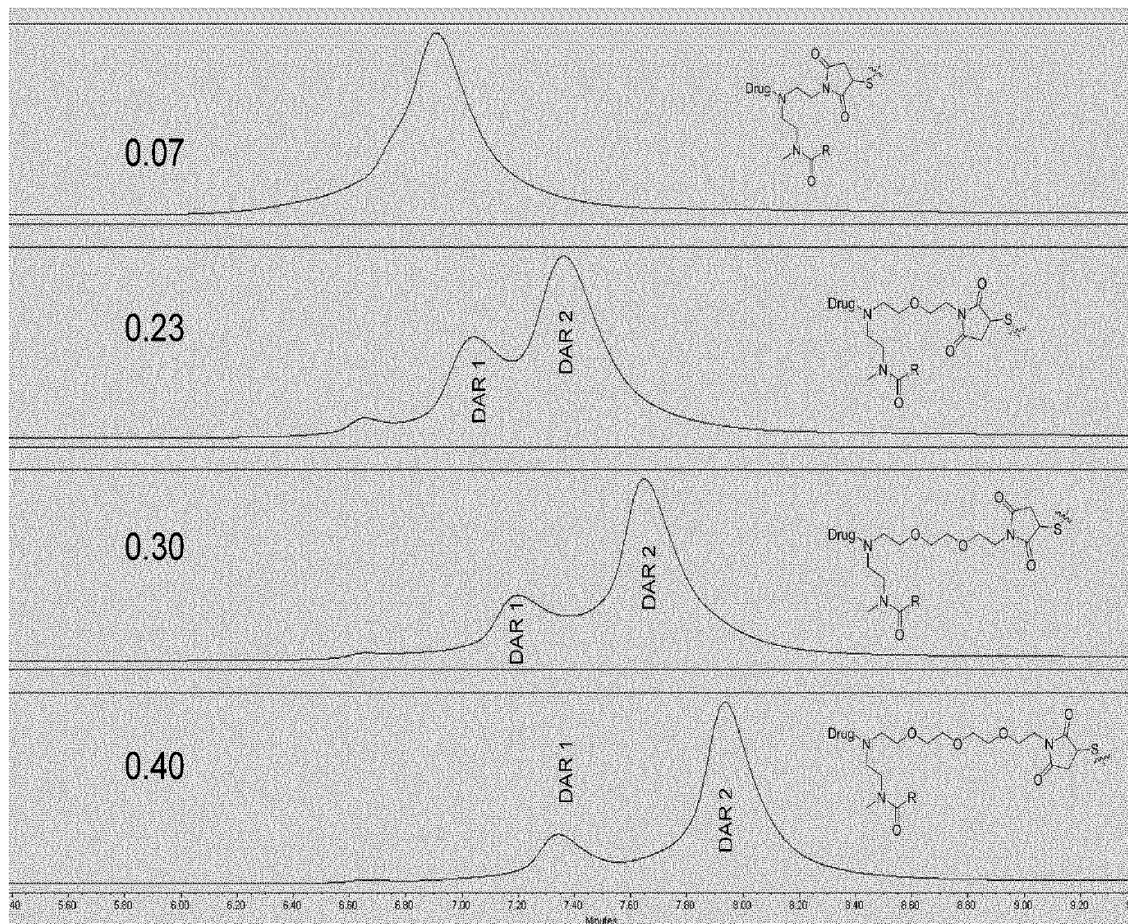


Figura 5A

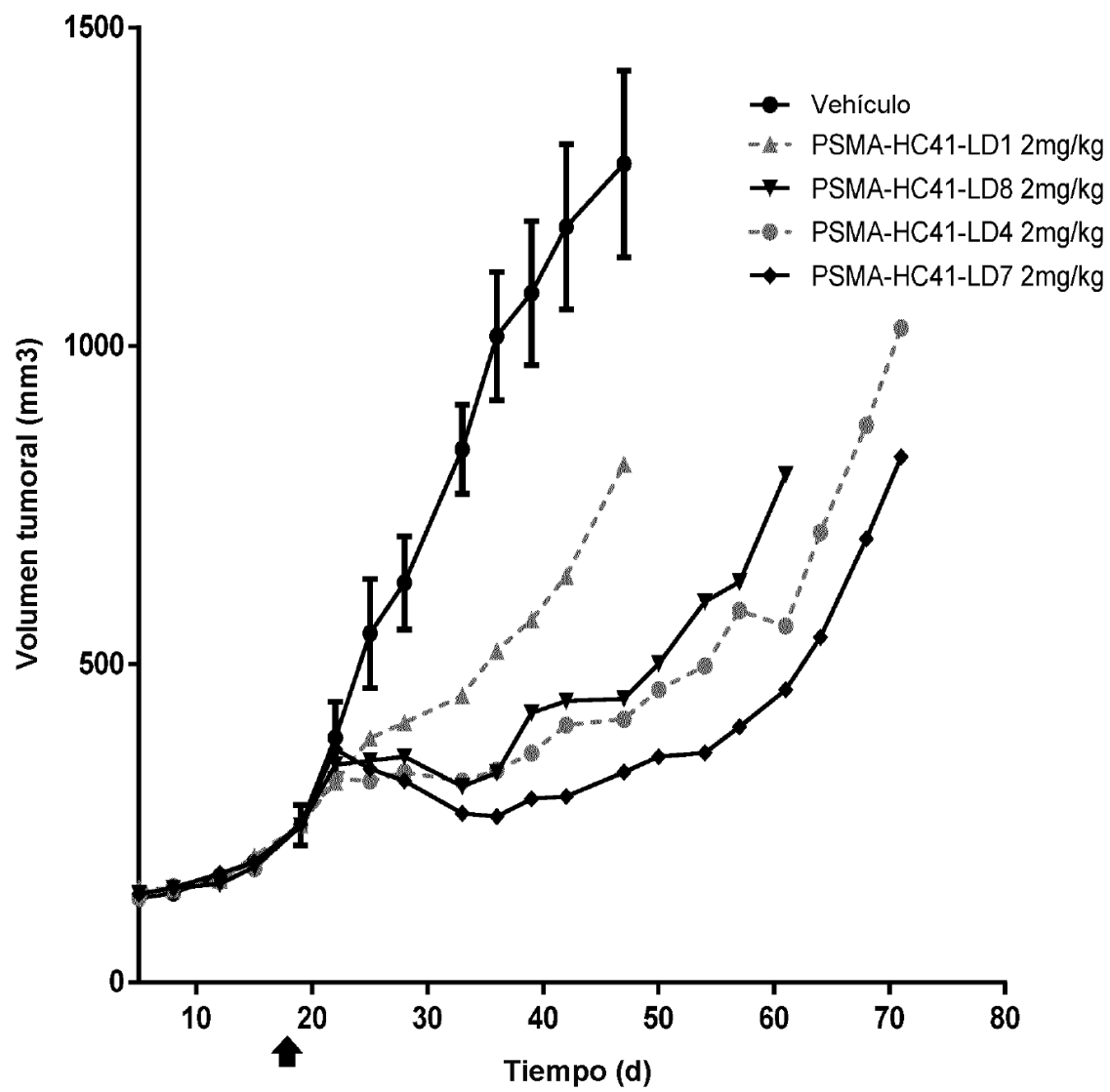


Figura 5B

