

CONJUGADOS QUE COMPRENDEN ENLAZADORES ESCINDIBLES

Referencia cruzada a solicitud de patente relacionada

Esta memoria descriptiva reivindica el beneficio de prioridad para las solicitudes de patente provisional de los EE. UU. núm. 63/519.567 (presentada el 15 de agosto de 2023) y 63/673.817 (presentada el 22 de julio de 2024). El texto completo de las solicitudes de patente antes referenciada se incorpora como referencia a esta memoria descriptiva.

Campo

Esta memoria descriptiva se relaciona con ciertos conjugados que comprenden enlazadores escindibles y un inhibidor de microtúbulos (MTI, por sus siglas en inglés), y con composiciones farmacéuticas que los contienen. Esta memoria descriptiva también se relaciona con el uso de los conjugados en métodos de tratamiento de enfermedades tales como el cáncer. Esta memoria descriptiva se relaciona además con los procesos y compuestos intermedios implicados en la preparación de los conjugados.

Antecedentes

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) son un método establecido para suministrar un fármaco a una diana biológica. Es posible usar un enlazador enzimáticamente escindible para liberar el fármaco libre en la diana, de manera que el fármaco libre pueda tener un efecto terapéutico. A través del perfil transcriptómico y proteómico de diversas líneas celulares de tumores sólidos, se ha identificado que la expresión de la β -glucuronidasa está regulada al alza y se localiza típicamente en el lisosoma. WO2007011968 y WO2015182984 describen ciertos

conjugados anticuerpo-fármaco que comprenden enlazadores escindibles con β -glucuronidasa.

Los microtúbulos son filamentos dinámicos de tubulina importantes para etapas clave de supervivencia en células en división de mamíferos. El microtúbulos diana con un

5 inhibidor de microtúbulos (MTI) se han usado ampliamente en el tratamiento de varios cánceres sólidos y neoplasias hematológicas, sin embargo, la terapia MTI frecuentemente se asocia con efectos secundarios no favorables (Dumontet *et al.*; Nature Reviews, 2010, Volume 9, Pages 790-803). En un intento de abordar esto, los MTI se han convertido en conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). Varios ADC
10 aprobados tienen un modo de acción de MTI (Yaghoubi *et al.*; Journal of Cellular Physiology, 2020, Volume 235, Pages 31-64). Varios sitios de unión pueden ser dirigidos con ligandos de interés, incluidos sitios de unión de colchicina, maitansina y vinca (*Chen et al.*; Molecules, 2017, Volume 2, Issue 1281).

15 Siguen siendo necesarios conjugados que tengan enlazadores escindibles con β -glucuronidasa que puedan suministrar selectivamente un fármaco a una diana biológica y que tengan propiedades fisicoquímicas favorables, que incluye solubilidad y lipofilia. Los conjugados de la descripción pueden usarse para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

Descripción general

20 En un primer aspecto, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM)



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde

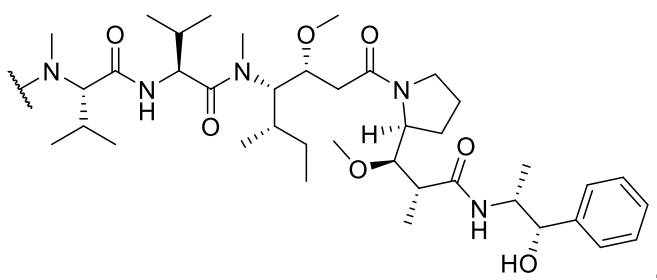
Ab es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este,

k es un número entero de 1 a 10,

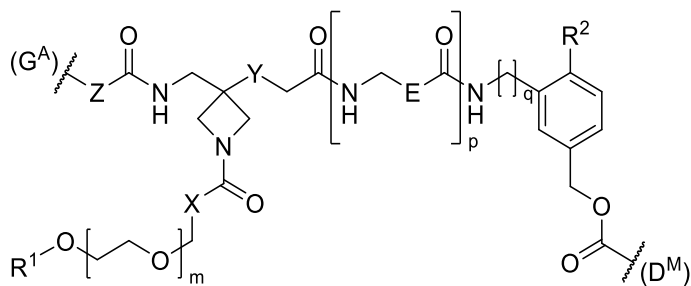
cada G^A es independientemente un grupo de conjugación conjugado al anticuerpo o

5 fragmento de unión al antígeno de este,

cada D^M es



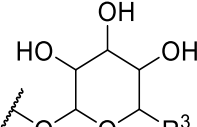
10 cada J^A es independientemente un grupo de la Fórmula (IMA)

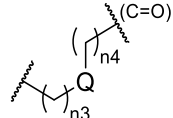
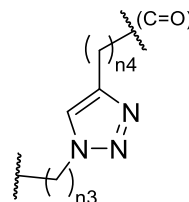
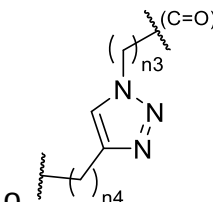


(IMA),

15 E es $(CH_2)_{n1}$, en donde $n1$ es 0, 1, 2 o 3,

R^1 es alquilo C_{1-4} o H,

R^2 es , en donde R^3 es CO_2H o CH_2OH ,

X es $(CH_2)_{n2}$, , , o , en donde $n2$ y $n4$ son 0, 1, 2 o 3, $n3$ es 1, 2 o 3, y Q es O o NR^A , en donde R^A es H, alquilo C_{1-4} o cicloalquilo C_{3-4} ,

Y es O o NR^B , en donde R^B es H, alquilo C_{1-4} o cicloalquilo C_{3-4} ,

5 Z es $(CH_2)_{n5}$, en donde $n5$ es 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

m es un entero de 2 a 17,

p es 1 o 0,

q es 1 o 0,

(G^A) indica el punto de acoplamiento a G^A y (D^M) indica el punto de acoplamiento a D^M .

10 En un aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en la terapia.

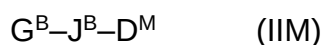
15 En un aspecto adicional se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento de cáncer.

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la elaboración de un medicamento.

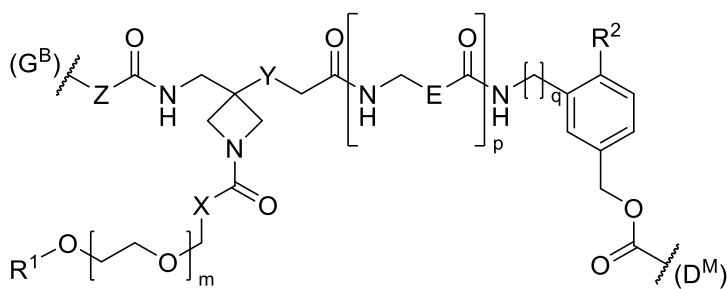
En un aspecto adicional se proporciona el uso de un conjugado de la Fórmula (IM) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

En un aspecto adicional se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un conjugado de la Fórmula (IM) o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En un aspecto adicional, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM)



o una sal de este, en donde G^B es un grupo de conjugación para la conjugación a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, J^B es un grupo de la Fórmula (IIMA)



(IIMA),

en donde D^M , E, R^1 , R^2 , X, Y, Z, m, p y q son como se definieron anteriormente para un conjugado de la Fórmula (IM), (G^B) indica el punto de acoplamiento a G^B , y (D^M) indica el punto de acoplamiento a D^M .

En un aspecto adicional, se proporcionan intermedios útiles para la síntesis de un compuesto de la Fórmula (IIM) o sal de este.

Un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede someterse a escisión enzimática para liberar un fármaco libre. Los conjugados

5 de la Fórmula (IM) pueden tener eficacia mejorada y/o propiedades físicas ventajosas (por ejemplo, mayor estabilidad, menor lipofilia, mayor solubilidad acuosa, mayor permeabilidad y/o menor unión a las proteínas plasmáticas), y/o perfiles de toxicidad favorables (por ejemplo, menor toxicidad fuera de la diana), y/o perfiles metabólicos o farmacocinéticos favorables, en comparación con otros conjugados. Los conjugados de
10 la Fórmula (IM) pueden exhibir una estabilidad coloidal mejorada en comparación con otros conjugados. Como tales, los conjugados de la Fórmula (IM) pueden ser especialmente adecuados para usar en la terapia, tal como el tratamiento del cáncer. Como se describe en la presente, los conjugados de la presente descripción pueden sufrir una escisión más lenta en presencia de β -glucuronidasa en relación con otros
15 conjugados. Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que una escisión más lenta del enlazador para liberar un fármaco libre puede dar lugar a una tolerabilidad mejorada del conjugado al reducir la proporción de fármaco libre liberado en el tejido fuera del objetivo.

Definiciones

20 Para que la presente memoria descriptiva pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definen explícitamente a continuación. Además, las definiciones se exponen según corresponda a lo largo de la descripción detallada. Cuando se proporcionan ejemplos de una definición, estos no son limitantes.

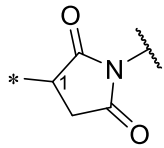
El prefijo C_{x-y} , donde x e y son números enteros, indica el rango numérico de átomos de carbono que están presentes en un grupo.

Como se usa en la presente, el término “alquilo” se refiere a un radical hidrocarburo saturado, lineal o ramificado que tiene el número especificado de átomos de carbono.

- 5 Los ejemplos de grupos alquilo C_{1-4} incluyen metilo (Me), etilo (Et), n-propilo (^{n} Pr), i-propilo (^{i} Pr), n-butilo (^{n} Bu), i-butilo (^{i} Bu), s-butilo (^{s} Bu), y t-butilo (^{t} Bu). Los ejemplos de grupos alquilo C_{1-6} incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo y n-hexilo.

- 10 Como se usa en la presente, el término “grupo de conjugación para la conjugación a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este” se refiere a un átomo o grupo de átomos capaz de formar un enlace covalente a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, a través de una reacción química.

El uso de “” en las fórmulas de esta memoria descriptiva indica el punto de acoplamiento al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. A manera de

- 15 ilustración,  indica que existe un enlace covalente que conecta el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, al átomo de carbono marcado con 1.

- Para evitar dudas, el uso de “” en las fórmulas de esta memoria descriptiva denota el punto de acoplamiento covalente a un grupo, donde el grupo es distinto del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este.
- 20

Las unidades, prefijos y símbolos se denotan en su forma aceptada del Sistema Internacional de Unidades (SI). Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y

- 5 científicos usados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que se refiere esta descripción. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2.^a ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revisada, 2000, Oxford
- 10 University Press, proporcionan a un experto en la técnica un diccionario general de muchos de los términos usados en esta descripción.

Descripción de las Figuras

A continuación se analizarán modalidades y experimentos que ilustran los principios de la descripción con referencia a las figuras adjuntas en las que:

- 15 La **Figura 1A** muestra la escisión enzimática de la carga útil del enlazador para **LP2** y **LP3** con β -glucuronidasa.

La **Figura 1B** muestra la escisión enzimática de la carga útil del enlazador para **LP2** y **LP3** con catepsina B.

- La **Figura 1C** muestra la escisión enzimática de la carga útil del enlazador para **LP2** y
- 20 **LP3** con elastasa de neutrófilos humanos.

La **Figura 1D** muestra la escisión enzimática de la carga útil del enlazador para **LP2**, **LP7** (Referencia) y **LP8** (Referencia) con elastasa de neutrófilos humanos.

La **Figura 1E** muestra la escisión enzimática de la carga útil del enlazador para **LP2**, **LP7** (Referencia) y **LP8** (Referencia) con β -glucuronidasa.

La **Figura 2A** muestra datos de citotoxicidad para **ADC1** (control) y **ADC2** en una línea celular 3D Her2+++ SKOV3.

- 5 La **Figura 2B** muestra datos de citotoxicidad para **ADC1** (control) y **ADC2** en una línea celular 3D Her2+++ SKOV3 GUSB KO (β -glucuronidasa inactiva).

La **Figura 2C** muestra datos de citotoxicidad para **ADC6** en una línea celular 3D Her2+++ SKOV3.

- 10 La **Figura 3A** muestra datos de citotoxicidad para **ADC1** (control) y **ADC2** en una línea celular 2D Her2+++ SKOV3.

La **Figura 3B** muestra datos de citotoxicidad para **ADC1** (control) y **ADC2** en una línea celular 2D Her2+++ SKOV3 GUSB KO (β -glucuronidasa inactiva).

La **Figura 4A** muestra datos de citotoxicidad para **ADC1** (control) y **ADC2** en una línea celular Her2+++ NCI-N87.

- 15 La **Figura 4B** muestra datos de citotoxicidad para **ADC1** (control) y **ADC2** en una línea celular Her2- MDAMB468.

La **Figura 4C** muestra datos de citotoxicidad para **ADC2**, **ADC4**, **ADC7** (Referencia) y **ADC8** (Referencia) en una línea celular Her2+++ NCI-N87.

- 20 La **Figura 4D** muestra datos de citotoxicidad para **ADC2**, **ADC4**, **ADC7** (Referencia) y **ADC8** (Referencia) en una línea celular Her2- MDAMB468.

La **Figura 4E** ilustra datos de citotoxicidad para **ADC5** y **ADC6** en una línea celular Her2+++ NCI-N87.

La **Figura 4F** muestra datos de citotoxicidad para **ADC5** y **ADC6** en una línea celular Her2- MDAMB468.

La **Figura 5** muestra una gráfica de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) (Ejecución 1) para **ADC2** (arriba), **ADC7** (Referencia) (centro) y

5 **ADC8** (Referencia) (abajo).

Descripción detallada

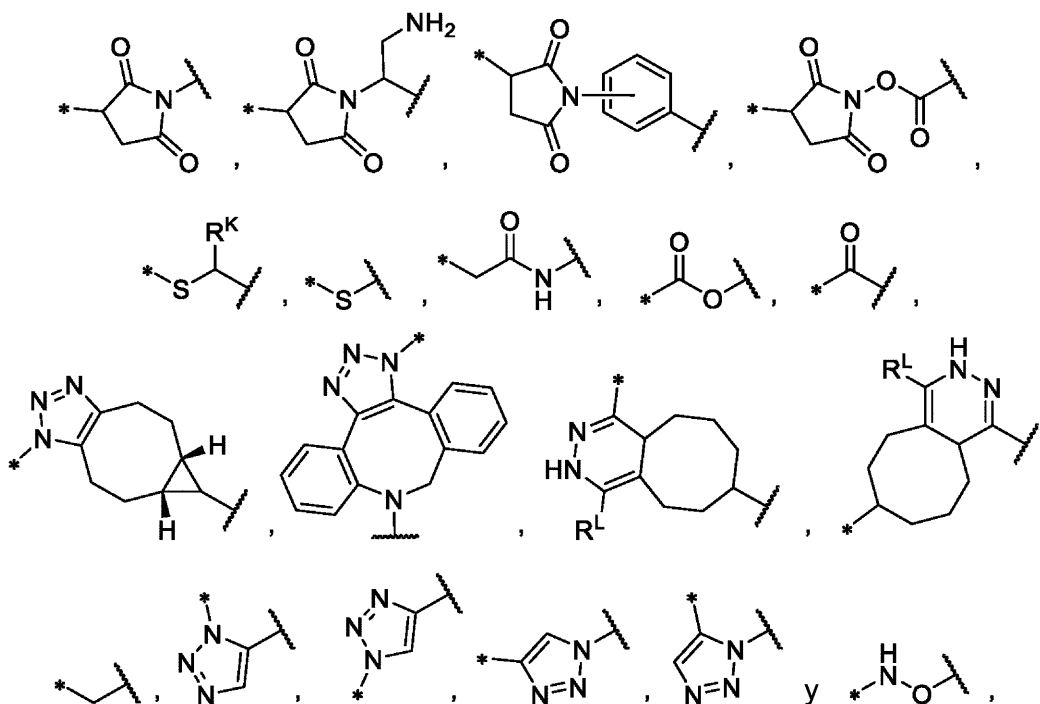
En un aspecto, esta memoria descriptiva proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se definió anteriormente.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

- 5 farmacéuticamente aceptable de este, en donde k es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En modalidades adicionales, k es un número entero de 2 a 10. En modalidades adicionales, k es un número entero de 2 a 8. En modalidades adicionales, k es 4. En modalidades adicionales, k es 8.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

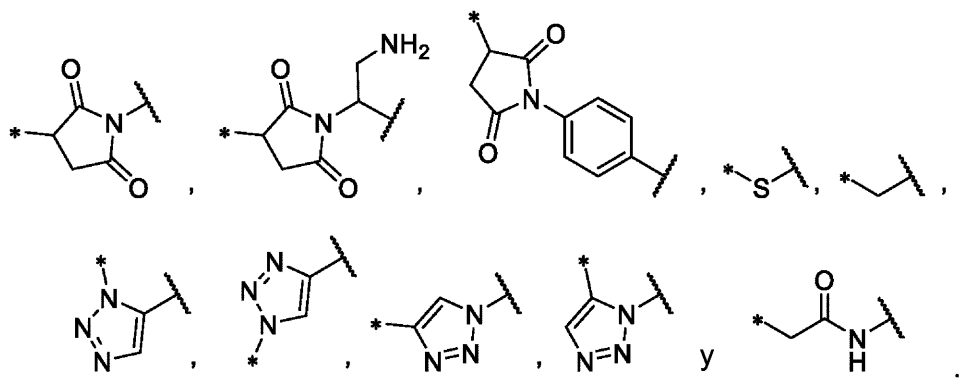
- 10 farmacéuticamente aceptable de este, en donde G^A se selecciona de



en donde R^K es H o CH_3 , R^L es alquilo C_{1-6} , y ---^* indica el punto de acoplamiento al anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este.

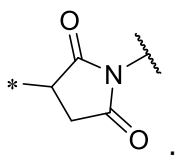
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde G^A se selecciona de

5



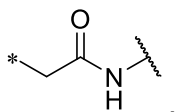
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde G^A es

10



En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde G^A es

15



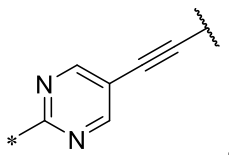
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde G^A es

5



En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde G^A es

10

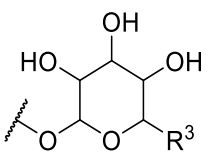


En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde E es $(CH_2)_{n1}$, en donde $n1$ es 0, 1, 2 o 3. En modalidades adicionales, E es un enlace covalente. En modalidades adicionales, E es CH_2 . En modalidades adicionales, E es $(CH_2)_2$. En modalidades adicionales, E es $(CH_2)_3$.

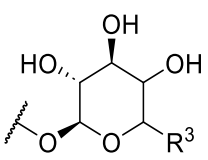
15

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R^1 es alquilo C_{1-4} . En modalidades adicionales, R^1 es alquilo C_{1-4} . En modalidades adicionales, R^1 es CH_3 .

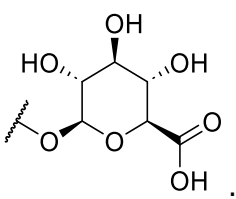
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde R^2 es , en donde R^3 es CO_2H o CH_2OH . En modalidades adicionales, R^3 es CO_2H .

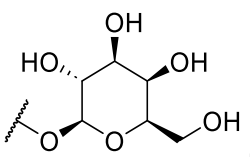
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

5 farmacéuticamente aceptable de este, en donde R^2 es , en donde R^3 es CO_2H o CH_2OH . En modalidades adicionales, R^3 es CO_2H .

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde R^2 es .

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

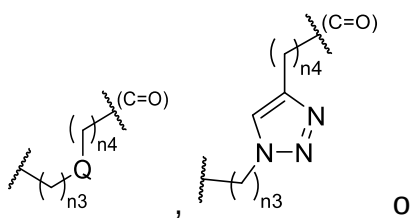
10 farmacéuticamente aceptable de este, en donde R^2 es .

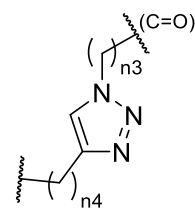
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde X es $(\text{CH}_2)_{n2}$, en donde $n2$ es 0, 1, 2 o 3. En modalidades adicionales, X es un enlace covalente. En modalidades adicionales, X es CH_2 . En modalidades adicionales, X es $(\text{CH}_2)_2$. En modalidades adicionales, X es

15 $(\text{CH}_2)_3$.

En las modalidades, se proporciona un conjugado de Fórmula (IM), o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde X es  o



, en donde n_4 es 0, 1, 2 o 3, n_3 es 1, 2 o 3, y Q es O o NR^A , y en donde

R^A es H, alquilo C_{1-4} o cicloalquilo C_{3-4} . Como se usa en la presente $(\text{C}=\text{O})$ indica el punto

5 de acoplamiento a $\text{C}=\text{O}$.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde Y es O.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde Y es NR^B , en donde R^B es H, alquilo

10 C_{1-4} o cicloalquilo C_{3-4} . En modalidades adicionales, Y es NH.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde Z es $(\text{CH}_2)_{n_5}$, en donde n_5 es 1, 2, 3, 4

o 5. En modalidades adicionales, Z es CH_2 . En modalidades adicionales, Z es $(\text{CH}_2)_2$.

En modalidades adicionales, Z es $(\text{CH}_2)_3$. En modalidades adicionales, Z es $(\text{CH}_2)_4$. En

15 modalidades adicionales, Z es $(\text{CH}_2)_5$.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde m es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16 o 17. En modalidades adicionales, m es un número entero de 6 a 16. En

modalidades adicionales, m es un número entero de 7 a 15. En modalidades

5 farmacéuticamente aceptable de este, en donde p es 1.

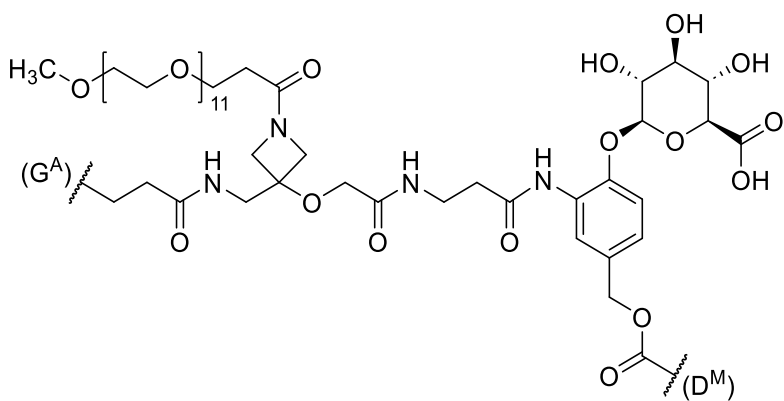
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde q es 1.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada J^A es un grupo de la Fórmula (IMB)

COC(=O)C1=CC=C(C=C1)CNC(=O)CCNC(=O)C2OC(=O)N2C(=O)CCNC(=O)CC(C)(C)C

(IMB).

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada J^A es un grupo de la Fórmula (IMB1)

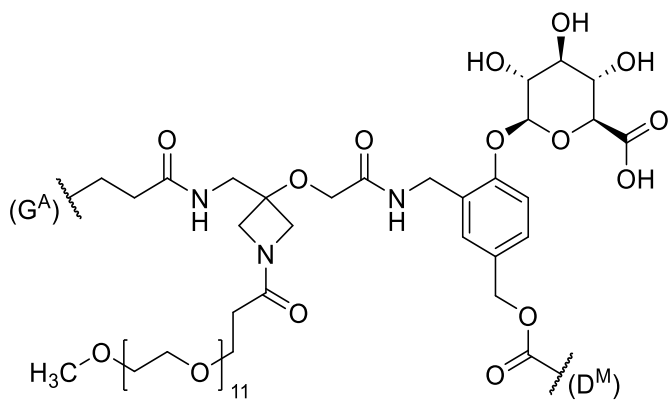


5

(IMB1).

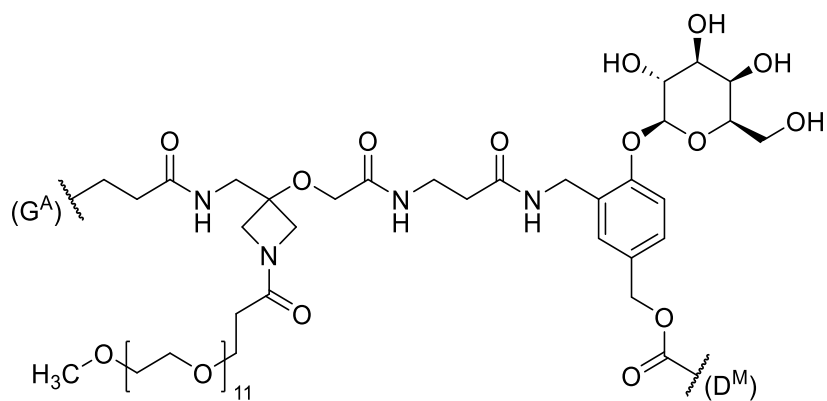
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada J^A es un grupo de la Fórmula

10 (IMB2)



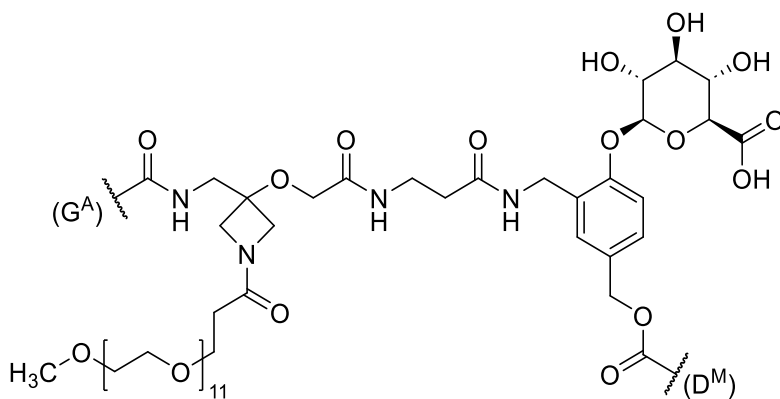
(IMB2).

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada J^A es un grupo de la Fórmula (IMB3)



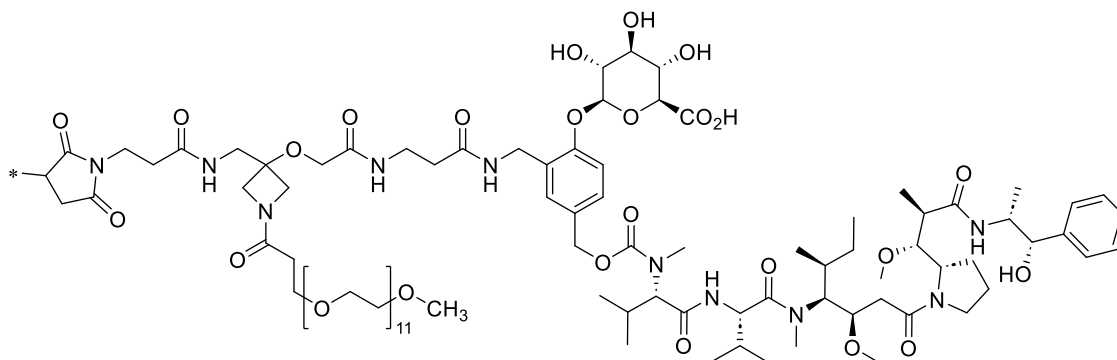
(IMB3).

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada J^A es un grupo de la Fórmula



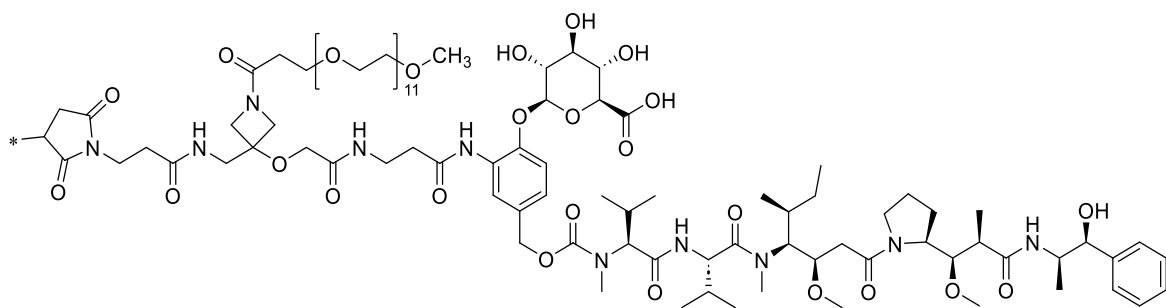
(IMB4).

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada ($G^A-J^A-D^M$) es



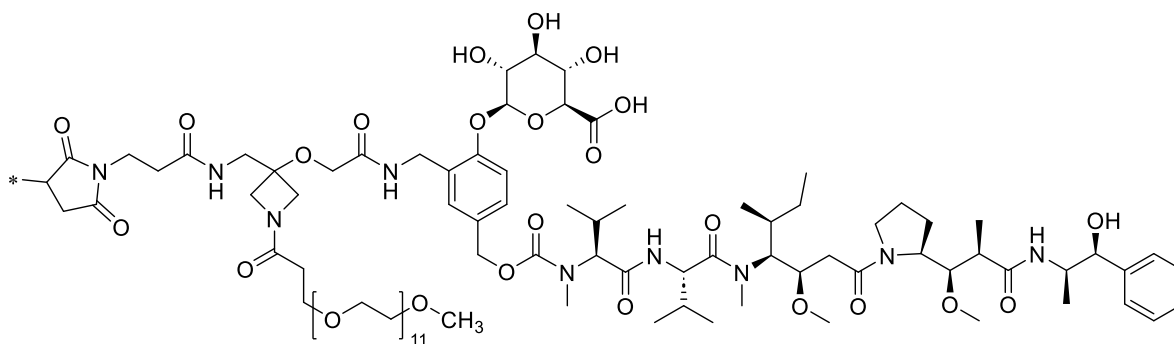
5

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada ($G^A-J^A-D^M$) es



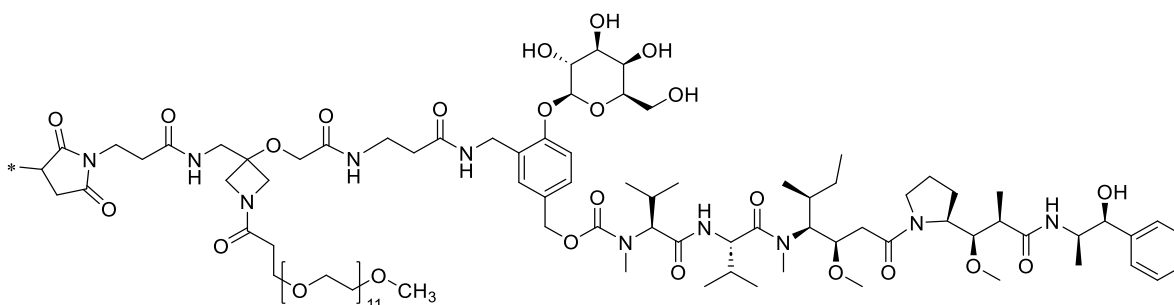
10

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada ($G^A-J^A-D^M$) es



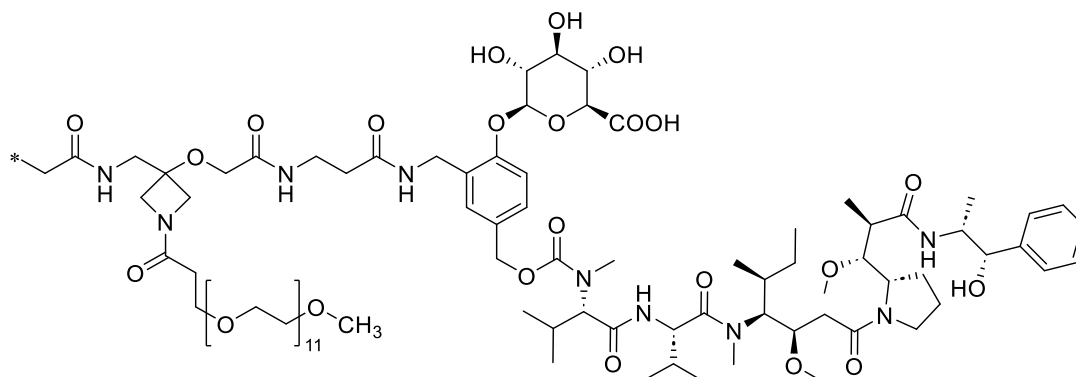
En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada ($G^A-J^A-D^M$) es

5

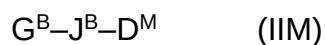


En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada ($G^A-J^A-D^M$) es

10



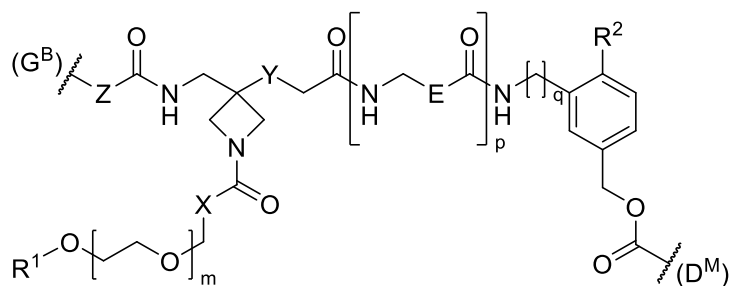
En un aspecto adicional, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM)



5

o una sal de este, en donde G^B es un grupo de conjugación para la conjugación a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este,

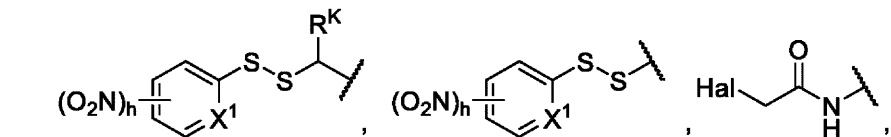
J^B es un grupo de la Fórmula (IIMA)



(IIMA),

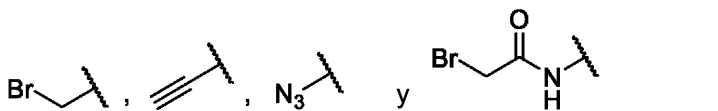
en donde D^M , E , R^1 , R^2 , X , Y , Z , m , p y q son como se definen en cualquier modalidad de un conjugado de la Fórmula (IM) descrito en la presente, (G^B) indica el punto de acoplamiento a G^B , y (D^M) indica el punto de acoplamiento a D^M .

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este, en donde G^B se selecciona de

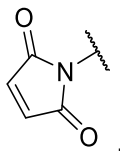


6.

- en donde G^B se selecciona de

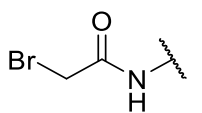


- en donde G^B es



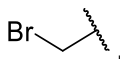
En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este,

5 en donde G^B es



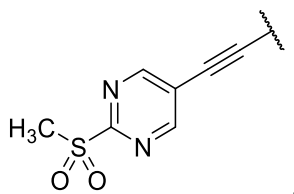
En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este,

10 en donde G^B es

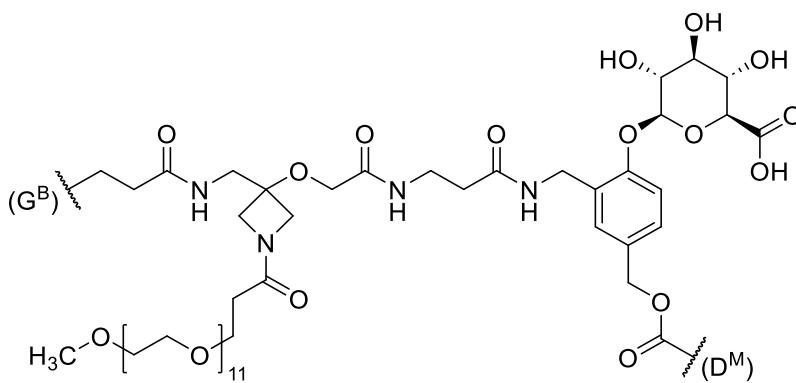


En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este,

15 en donde G^B es



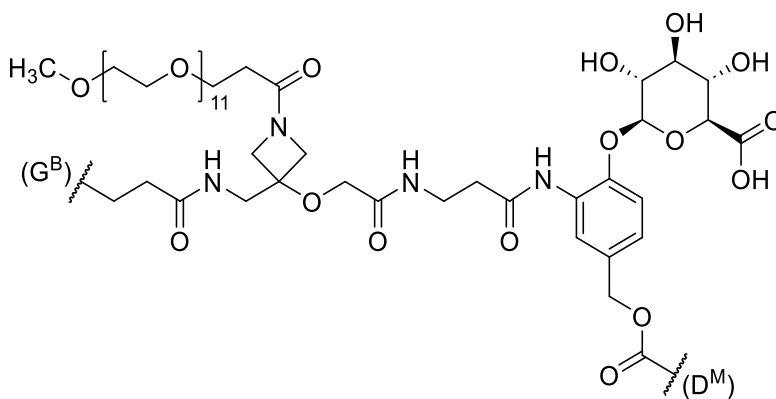
En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM) o una sal de este, en donde J^B es un grupo de la Fórmula (IIMB)



5

(IIMB).

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM) o una sal de este, en donde J^B es un grupo de la Fórmula (IIMB1)

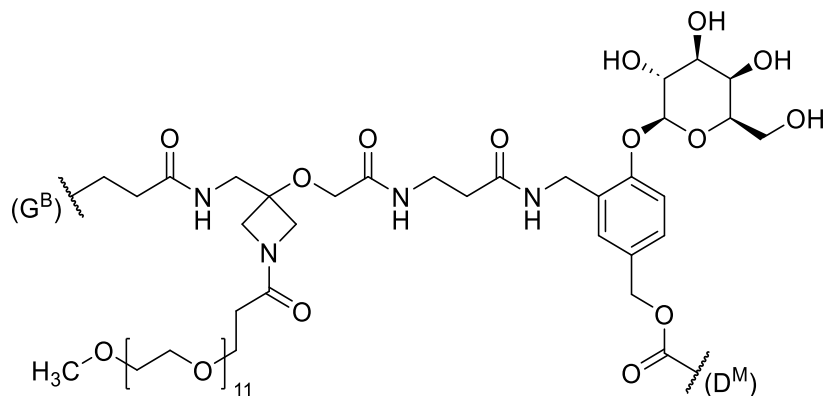


10

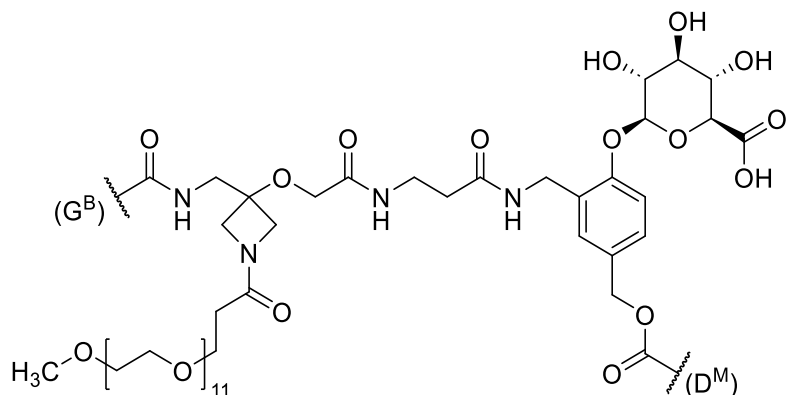
(IIMB1).

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM) o una sal de este, en donde J^B es un grupo de la Fórmula (IIMB2)

5 En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM) o una sal de este, en donde J^B es un grupo de la Fórmula (IIMB3)



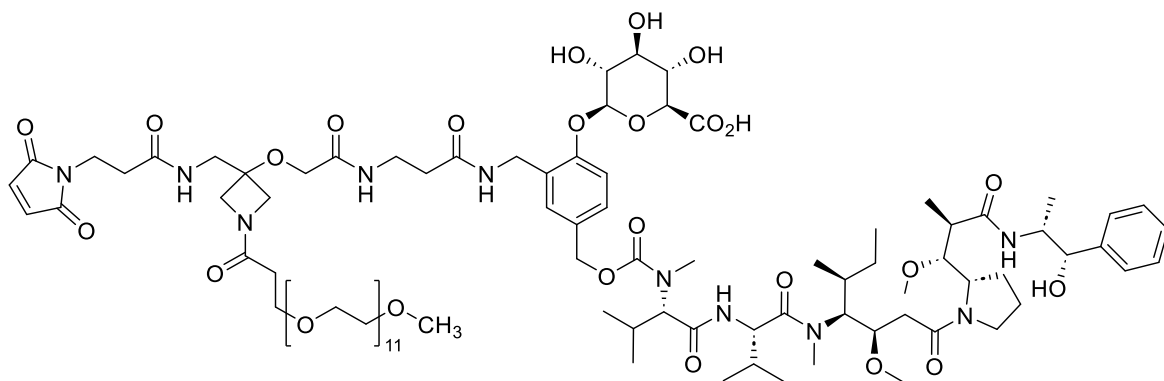
En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM) o una sal de este, en donde J^B es un grupo de la Fórmula (IIMB4)



(IIMB4).

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este,

5 que es;

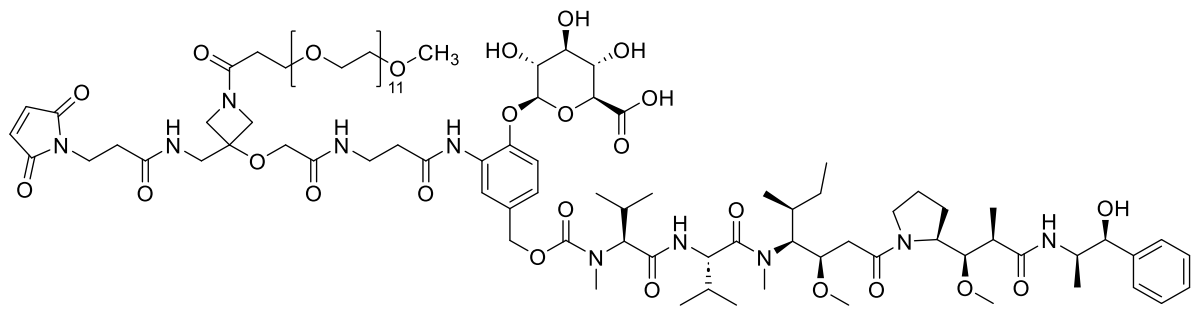


ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-
 10 3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-
 il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)-
 2-((3-(2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-
 (2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidin-3-

il)oxi)acetamido)propanamido)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico, o una sal de este.

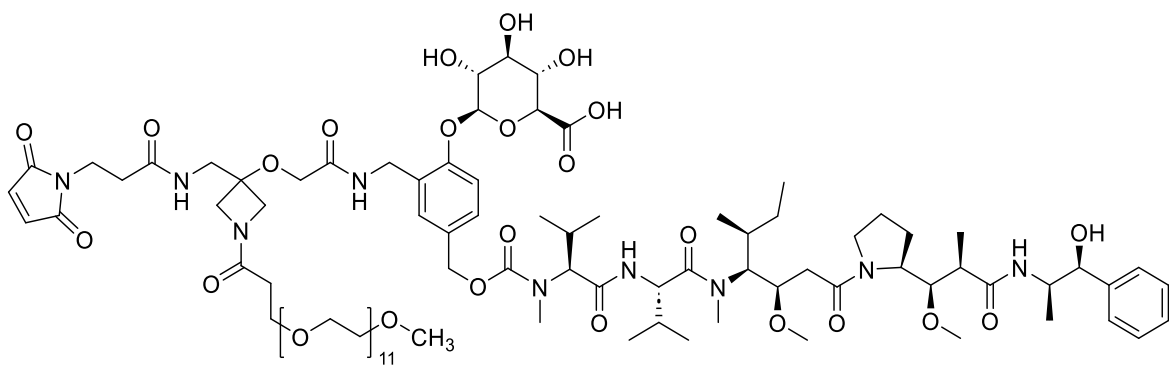
En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este, que es;

5



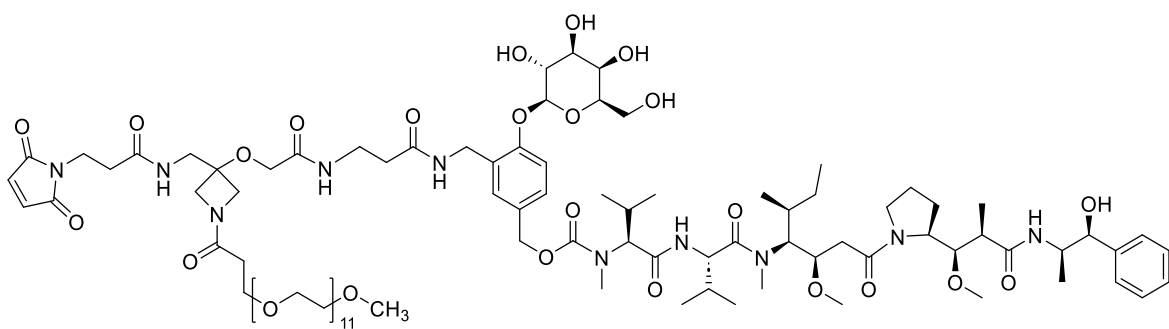
ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)-2-(3-(2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidin-3-il)oxi)acetamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico, o una sal de este.

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este, que es;



ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)-2-((2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oi)azetidín-3-il)oxi)acetamido)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico, o una sal de este.

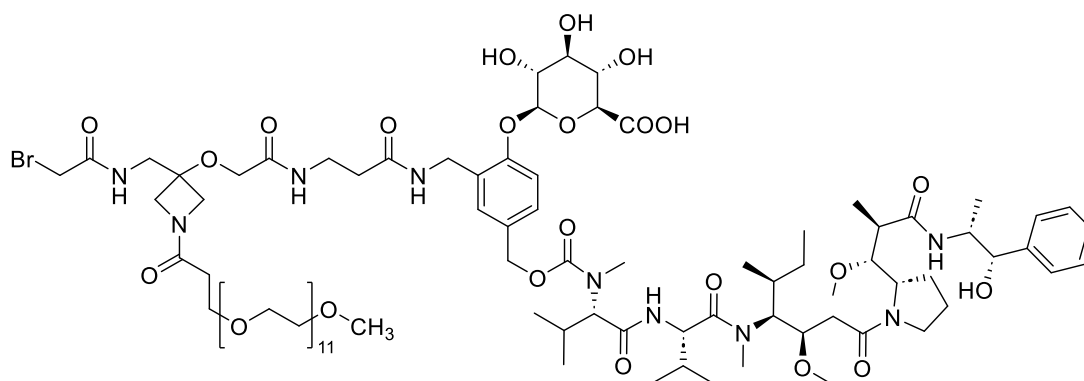
En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este, que es;



3-((3-(2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oil)azetidin-3-il)oxi)acetamido)propanamido)metil)-4-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)bencilo ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-
5 ((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato, o una sal de este.

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IIM), o una sal de este, que es;

10

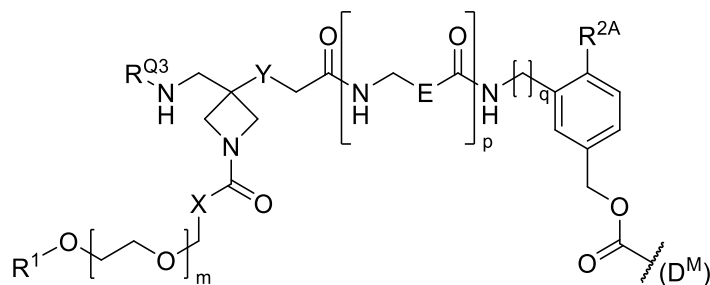


ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((3-(2-((3-((2-bromoacetamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oil)azetidin-3-
15 il)oxi)acetamido)propanamido)metil)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico, o una sal de este.

En un aspecto adicional, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM)

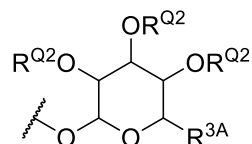


5 o una sal de este, en donde J^{IVM} es un grupo de Fórmula (IVMA)



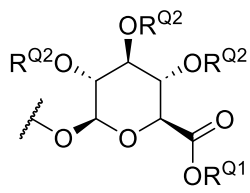
(IVMA),

10 en donde D^M , E , R^1 , X , Y , m , p y q son como se definen en cualquiera de las modalidades de un conjugado de Fórmula (IM) descrito en la presente, R^{2A} es

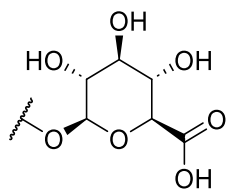


, en donde R^{3A} es CO_2R^{Q1} o CH_2OR^{Q2} , R^{Q1} es H o R^{P1} , cada R^{Q2} es independientemente H o R^{P2} y R^{Q3} es H o R^{P3} , en donde R^{P1} es un ácido carboxílico que protege grupo, cada R^{P2} es independientemente un grupo protector de alcohol y
 15 R^{P3} es un grupo protector de amina, y (D^M) indica el punto de acoplamiento a D^R .

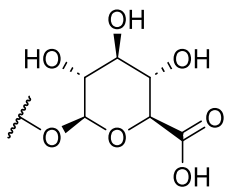
En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este,



en donde R^{2A} es . En modalidades adicionales, R^{2A} es

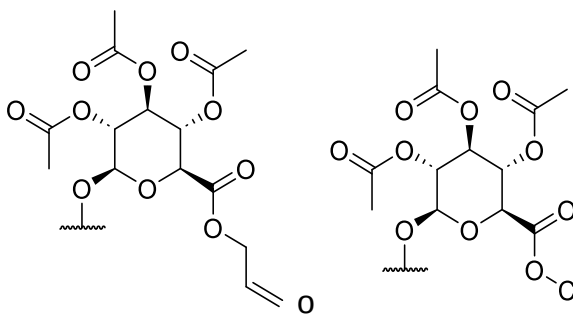


En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este,



5 en donde R^{2A} es OH y R^{Q3} es H.

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este,



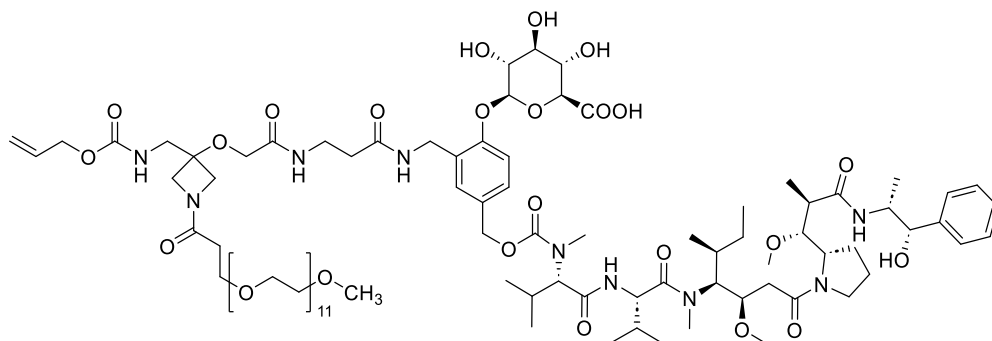
en donde R^{2A} es $C(O)OCH_2CH=CH_2$. En modalidades, R^{Q3} es

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este,

10 que es

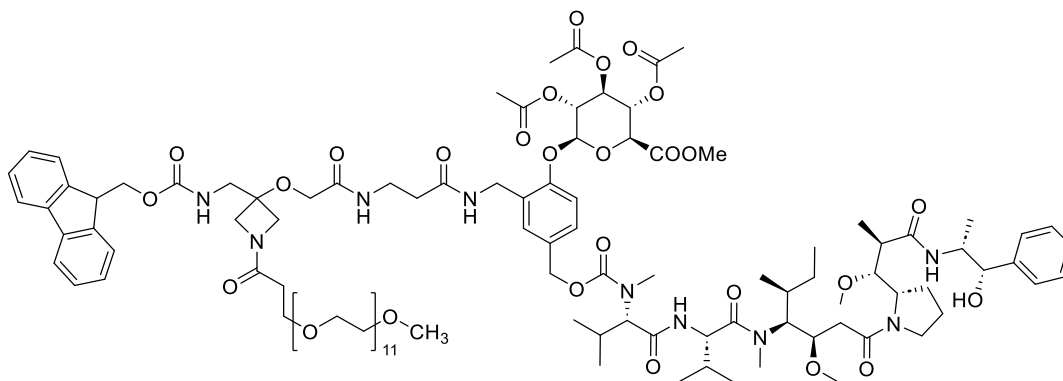
(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oil)azetidin-3-

10 En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este, que es



ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-[[3-[[2-[3-[(aliloxicarbonilamino)metil]-1-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]azetidin-3-il]oxiacetil]amino]propanoilamino]metil]- 4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1R,2S)-2-hidroxi-1-metil-2-fenil-etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxo-propil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxo-butil]-metil-carbamoil]-2-metil-propil]carbamoil]-2-metil-propil]-metil-carbamoil]oximetil]fenoxi]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico, o una sal de este.

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este, que es

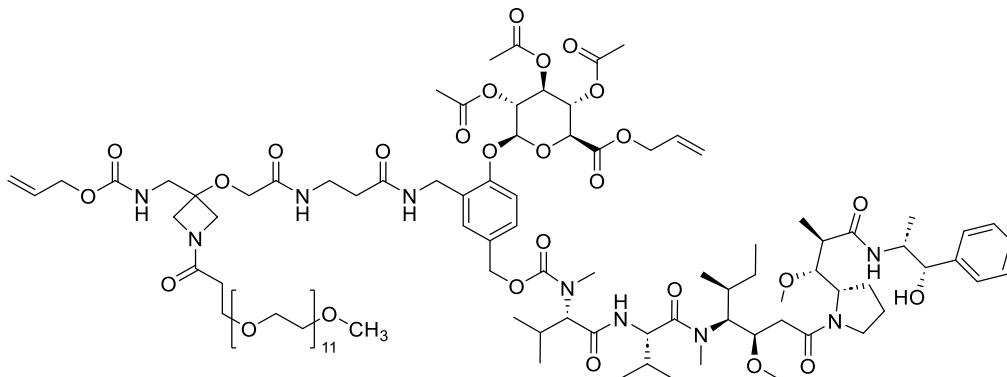


triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((3-(2-((3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaocotriacontan-38-yl)azetidin-3-il)oxi)acetamido)propanamido)metil)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-

diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo, o una sal de este.

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este, que es

5



alilo (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[[3-[[2-[3-[(aliloxicarbonilamino)metil]-1-[3-[2-

10 [2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]azetidín-3-il]oxiacetil]amino]propanoilamino]metil]-4-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*,2*R*)-4-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[[[(1*R*,2*S*)-2-hidroxi-1-metil-2-fenil-etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxo-propil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1*S*)-1-metilpropil]-4-oxo-butil]-metil-carbamoil]-2-metil-propil]carbamoil]-2-metil-propil]-metil-carbamoil]oximetil]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato, o una sal de este.

15

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este, en donde R^{P1} se selecciona de bencilo, alilo y alquilo C₁₋₄. En modalidades adicionales, R^{P1} es alilo. En modalidades adicionales, R^{P1} es metilo.

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este, en donde cada R^{P2} se selecciona independientemente de bencilo, acetilo y $CH_2CH=CH_2$. En modalidades adicionales, cada R^{P2} es acetilo.

En modalidades, se proporciona un compuesto de la Fórmula (IVM), o una sal de este, 5 en donde R^{P3} se selecciona de $C(O)OCH_2CH=CH_2$, trifluoroacetilo, terc-butiloxicarbonilo (Boc), benciloxicarbonilo (Cbz), bencilo, 2,4-dimetoxibencilo y fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). En modalidades, R^{P3} es $C(O)OCH_2CH=CH_2$. En modalidades adicionales, R^{P3} es Fmoc.

La presente memoria descriptiva pretende incluir todos los isótopos de átomos que se 10 encuentran en los presentes compuestos y conjugados. Se entenderá que los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico, pero diferentes números de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Los isótopos de carbono incluyen ^{13}C y ^{14}C . Los isótopos de nitrógeno incluyen ^{15}N .

Los compuestos descritos en la presente pueden contener uno o más centros quirales. 15 En consecuencia, si se desea, tales compuestos pueden prepararse o aislarse como estereoisómeros puros, es decir, como enantiómeros individuales, diastereoisómeros o como una mezcla enriquecida de manera estereoisomérica. Todas estas mezclas de estereoisómeros (y enriquecidas) se incluyen dentro del alcance de las modalidades, a menos que se indique de cualquier otra manera. Los estereoisómeros (o mezclas 20 enriquecidas) puros pueden prepararse usando, por ejemplo, materiales de partida ópticamente activos o reactivos estereoselectivos bien conocidos en la técnica.

Alternativamente, las mezclas racémicas de tales compuestos pueden separarse

usando, por ejemplo, cromatografía en columna quiral, agentes de resolución quiral y lo similar.

A menos que se indique explícitamente la estereoquímica en una estructura química o nombre químico, la estructura química o nombre químico pretende abarcar todos los

5 estereoisómeros, diastereoisómeros, conformeros, rotámeros y tautómeros posibles del compuesto representado. Por ejemplo, un compuesto que contiene un átomo de carbono quiral está destinado a abarcar tanto el enantiómero (R) como el enantiómero (S), así como mezclas de los enantiómeros, que incluye mezclas racémicas; y un compuesto que contiene dos carbonos quirales está destinado a abarcar todos los
10 enantiómeros y diastereoisómeros que incluye (R,R), (S,S), (R,S) y (S,R).

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un conjugado de la Fórmula (IM)

es, por ejemplo, una sal de adición de ácido. Una sal de adición de ácido de un

conjugado de la Fórmula (IM) puede formarse poniendo el compuesto en contacto con un ácido inorgánico u orgánico adecuado en condiciones conocidas por el experto. Una

15 sal de adición de ácido puede formarse, por ejemplo, usando un ácido inorgánico seleccionado de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

También puede formarse una sal de adición de ácido usando un ácido orgánico

seleccionado de ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido acético, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido tartárico,

20 ácido láctico, ácido pirúvico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido para-toluenosulfónico.

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un conjugado de la Fórmula (IM),

es, por ejemplo, una sal de adición de base. Una sal de adición de base de un

conjugado de la Fórmula (IM) puede formarse poniendo el compuesto en contacto con una base inorgánica u orgánica adecuada en condiciones conocidas por el experto.

Una sal de adición de base puede ser, por ejemplo, una sal de metal alcalino (tal como una sal de sodio, potasio o litio) o una sal de metal alcalinotérreo (tal como una sal de calcio), que se puede formar usando un hidróxido o alcóxido de metal alcalino o alcalinotérreo (p. ej., un etóxido o metóxido). También se puede formar una sal de adición de base usando una amina orgánica adecuadamente básica (p. ej., una sal de colina o meglumina).

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada adicional de un conjugado de la Fórmula (IM) es, por ejemplo, una sal formada dentro del cuerpo de un paciente después de la administración de un conjugado de la Fórmula (IM) al paciente.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término “composición farmacéutica” se refiere a una preparación que se encuentra en forma tal que permita la actividad biológica del principio activo, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un paciente al que se le administraría la composición. Tales composiciones pueden ser estériles. Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente memoria descriptiva comprenderá un conjugado de la Fórmula (IM) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un excipiente, portador, regulador o estabilizador farmacéuticamente aceptable. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, *p. ej.*, cutánea, subcutánea, o intravenosa.

En modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un portador estéril no tóxico farmacéuticamente aceptable. En modalidades adicionales, el portador es una solución salina fisiológica, regulador no tóxico, o conservante. Las formulaciones adecuadas para usar en los métodos terapéuticos descritos en la presente se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22.^a ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012), cuyo contenido se incorpora como referencia.

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina regulada con fosfato, dextrosa, glicerol y etanol, así como cualquier combinación de estos. En modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más agentes isotónicos. En modalidades adicionales, el uno o más agentes isotónicos se seleccionan de un azúcar, un polialcohol y cloruro de sodio.

En modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este,

contenido dentro de una o más formulaciones seleccionadas de una cápsula, una tableta, una suspensión acuosa, una solución, un aerosol nasal, y un polvo liofilizado que puede reconstituirse para formar una suspensión o solución antes de usarse.

En modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un

- 5 conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, un regulador, un surfactante y/o un agente estabilizador. En modalidades adicionales, el regulador es un regulador de acetato, fosfato o citrato. En modalidades adicionales, el surfactante es polisorbato. En modalidades adicionales, el agente estabilizador es albúmina humana.

- 10 La composición farmacéutica que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede administrarse a un paciente por cualquier vía de administración sistémica o local apropiada. Por ejemplo, la administración puede ser oral, bucal, sublingual, oftálmica, intranasal, intratraqueal, pulmonar, tópica, transdérmica, urogenital, rectal, subcutánea, intravenosa, intraarterial,
- 15 intraperitoneal, intramuscular, intracraneal, intratecal, epidural, intraventricular o intratumoral.

La composición farmacéutica que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede formularse para administrarse por cualquier medio apropiado, por ejemplo, mediante parches epidérmicos o

- 20 transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, o geles; mediante nebulizadores, vaporizadores, o inhaladores; mediante inyección o infusión; o en la forma de cápsulas, tabletas, soluciones líquidas o suspensiones en agua o medios no acuosos, gotas, supositorios, enemas, aerosoles, o polvos. La vía de administración más adecuada en

cada caso dependerá de la condición física y mental del sujeto, la naturaleza y gravedad de la enfermedad, y las propiedades deseadas de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para administración oral pueden estar en

5 la forma de tabletas, cápsulas, polvos o líquidos. Una tableta puede comprender un portador sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o
10 polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un portador sólido tal como gelatina.

Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la afección, el conjugado de la Fórmula (IM), o una sal de farmacéuticamente aceptable de este, estará en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la
15 técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, reguladores, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

En un aspecto, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal
20 farmacéuticamente aceptable de este, para usar en la terapia.

En un aspecto, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento del cáncer.

Donde se menciona “cáncer”, este incluye tanto el cáncer no metastásico como el cáncer metastásico, de tal manera que tratar el cáncer implica el tratamiento de tumores primarios y también de metástasis tumorales.

El término “terapia” pretende tener su significado normal de tratar una enfermedad
5 para aliviar total o parcialmente uno, algunos o todos sus síntomas, o para corregir o compensar la patología subyacente. El término “terapia” también incluye “profilaxis” a menos que existan indicaciones específicas de lo contrario. Los términos “terapéutico” y “terapéuticamente” deben interpretarse de manera correspondiente.

El término “profilaxis” pretende tener su significado normal e incluye profilaxis primaria
10 para prevenir el desarrollo de la enfermedad y profilaxis secundaria en donde la enfermedad ya se ha desarrollado y el paciente está protegido temporal o permanentemente contra la exacerbación o empeoramiento de la enfermedad o el desarrollo de nuevos síntomas asociados con la enfermedad.

El término “tratamiento” se usa como sinónimo de “terapia”. Similarmente, el término
15 “tratar” puede considerarse como “aplicar terapia” donde “terapia” es como se define en la presente.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento del cáncer HER2 positivo.

20 En un aspecto, se proporciona el uso de un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en la presente, en la elaboración de un medicamento, tal como un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Términos como “que trata” o “tratamiento” se refieren tanto a (1) medidas terapéuticas
5 que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado como (2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o retrasan el desarrollo de una afección o trastorno patológico dirigido. Por lo tanto, entre los que necesitan tratamiento se encuentran aquellos que ya tienen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos
10 en quienes se va a prevenir el trastorno. En ciertos aspectos, un sujeto es “tratado” exitosamente por cáncer de acuerdo con los métodos de la presente descripción si el paciente muestra, p. ej., remisión total, parcial, o transitoria de cierto tipo de cáncer. El término “cantidad efectiva” significa una cantidad de un ingrediente activo que es suficiente para modificar de manera significativa y positiva los síntomas y/o condiciones
15 a tratar (p. ej., proporcionar una respuesta clínica positiva). La cantidad efectiva de un ingrediente activo para usar en una composición farmacéutica variará con la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente, el(los) ingrediente(s) activo(s) particular(es) que se esté(n) empleando, el(los) excipiente(s)/portador(es) farmacéuticamente
20 aceptable(s) particular(es) utilizado(s), y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del médico tratante.

El término “paciente” se refiere a cualquier animal (p. ej., un mamífero), incluyendo, pero no se limita a, humanos, primates no humanos, roedores y lo similar, que va a ser

el receptor de un tratamiento particular. En modalidades, el término “paciente” se refiere a un sujeto humano.

En modalidades, se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un conjugado de la

- 5 Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde el cáncer es un cáncer HER2 positivo.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y una sustancia antitumoral adicional para el tratamiento conjunto del cáncer.

- 10 En modalidades, se proporciona una combinación para usar en el tratamiento del cáncer que comprende un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un agente antitumoral adicional.

En modalidades, se proporciona un conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con un agente antitumoral

- 15 adicional.

En la presente, donde se usa el término “tratamiento conjunto” en referencia a un tratamiento combinado, debe entenderse que este puede referirse a la administración simultánea, separada o secuencial. En un aspecto, “tratamiento conjunto” se refiere a la administración simultánea. En otro aspecto, “tratamiento conjunto” se refiere a la

20 administración separada. En un aspecto adicional, “tratamiento conjunto” se refiere a la administración secuencial.

En modalidades, se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un conjugado de la

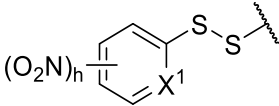
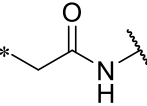
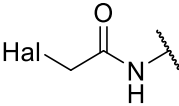
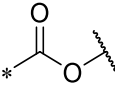
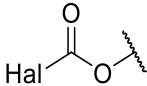
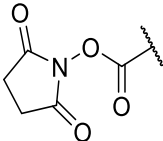
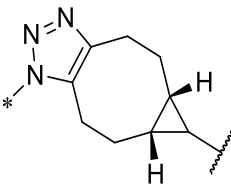
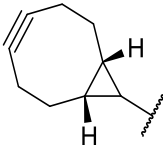
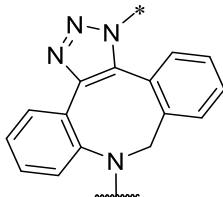
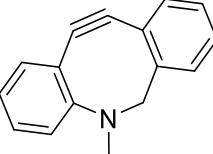
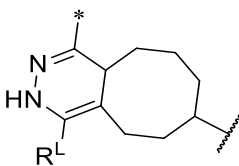
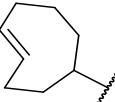
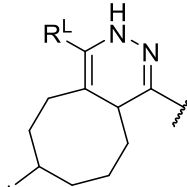
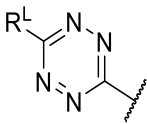
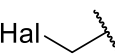
Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y administrar de manera simultánea, separada o secuencial al menos una sustancia antitumoral adicional a dicho paciente, donde las cantidades del conjugado de la Fórmula (IM), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y la sustancia antitumoral adicional son

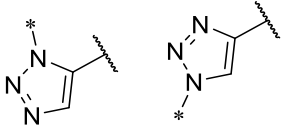
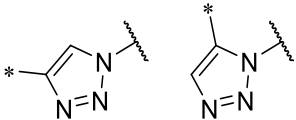
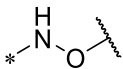
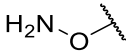
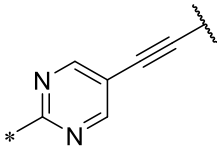
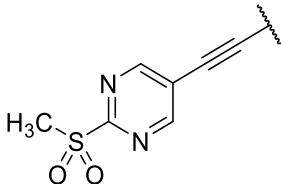
5 conjuntamente efectivas para producir un efecto anticancerígeno.

Conjugación

Los ejemplos de G^A y G^B incluyen, pero no se limitan a, los siguientes, en donde X^1 es CH o N, h es 0 o 1, R^K es H o CH_3 , Hal es Cl, Br o I, R^L es alquilo C_{1-6} , y ---^* indica el punto de acoplamiento al anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este.

G^A	G^B

Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con,

5 un antígeno particular.

En modalidades, el anticuerpo se aísla o es recombinante. “Aislado”, cuando se usa en la presente se refiere a un polipéptido, p. ej., un anticuerpo, que se ha identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular a partir del cual se expresó.

Normalmente, se preparará un anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación. Por lo tanto, un “anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo que está
10 sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes.

En modalidades, el anticuerpo comprende al menos dos “cadenas ligeras” (LC, por sus siglas en inglés) y dos “cadenas pesadas” (HC, por sus siglas en inglés). Las cadenas

ligeras y las cadenas pesadas de tales anticuerpos son polipéptidos que consisten en varios dominios. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como “VH”) y una región constante de cadena pesada (abreviada en la presente como “CH”). La región constante de cadena pesada

5 comprende los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3 (clases de anticuerpos IgA, IgD, e IgG) y opcionalmente el dominio constante de cadena pesada CH4 (clases de anticuerpos IgE e IgM). Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera (abreviado en la presente como “VL”) y un dominio constante de cadena ligera (abreviado en la presente como “CL”).

10 En modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. Un anticuerpo “intacto” o “de longitud completa”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que tiene dos polipéptidos de cadena pesada (H) y dos polipéptidos de cadena ligera (L) interconectados mediante enlaces disulfuro.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena

15 ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, bien sea sola o en combinación. Las regiones variables VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés).

20 En modalidades, cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera.

La unión entre un anticuerpo y su antígeno o epítipo diana es mediada por las CDR. El término “epítipo” se refiere a una región proteica diana (p. ej., polipéptido) capaz de unirse a (p. ej., unirse mediante) un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la descripción. Las CDR son los principales determinantes de la especificidad del

5 antígeno. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5.^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)).

10 Además, a veces se usan combinaciones de estos dos enfoques en la técnica para determinar las CDR.

Los “dominios constantes” (o “regiones constantes”) de la cadena pesada y de la cadena ligera no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a una diana, sino que tienen diversas funciones efectoras. Las regiones constantes de los

15 anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Existen cinco clases principales de región constante de cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE e IgM, cada una con funciones efectoras características

20 designadas por el isotipo. Las moléculas de Ig interactúan con múltiples clases de receptores celulares. Por ejemplo, las moléculas de IgG interactúan con tres clases de receptores Fcγ (FcγR) específicos para la clase IgG de anticuerpo, a saber, FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies

celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen fagocitosis y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, eliminación de complejos inmunes, lisis de células diana recubiertas de anticuerpos por células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o ADCC, por sus siglas en inglés), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas. Se ha reportado que las secuencias importantes para la unión de IgG a los receptores FcγR están ubicadas en los dominios CH2 y CH3.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un isotipo IgG. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede ser cualquier subclase de IgG, por ejemplo, isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se basa en un isotipo IgG1.

Los términos “región Fc”, “parte Fc” y “Fc” se usan indistintamente en la presente y se refieren a la porción de una inmunoglobulina nativa que está formada por dos cadenas

Fc. Cada “cadena Fc” comprende un dominio constante CH2 y un dominio constante CH3. Cada cadena Fc también puede comprender una región bisagra. Una región Fc nativa es homodimérica. En modalidades, la región Fc puede ser heterodimérica debido a que puede contener modificaciones para imponer la heterodimerización de Fc. La región Fc contiene la entidad carbohidrato y los sitios de unión para el complemento y los receptores Fc (incluido el receptor FcRn), y no tiene actividad de unión al antígeno.

Fc puede referirse a esta región de forma aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión Fc. Se han encontrado polimorfismos en una serie de sitios del dominio Fc, que incluye, pero sin limitarse a,

las posiciones EU 270, 272, 312, 315, 356, y 358, lo que da lugar a variaciones menores entre las secuencias descritas en la presente solicitud y las secuencias conocidas en la técnica. Como resultado, cada región Fc de IgG de origen natural se denomina un “dominio Fc de IgG silvestre” o “dominio Fc de IgG WT” (es decir,

5 cualquier alelo). Las secuencias de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 humanas pueden obtenerse en una variedad de bases de datos de secuencias, que incluye la base de datos UniProt (www.uniprot.org) con los números de acceso P01857 (IGHG1_HUMAN), P01859 (IGHG2_HUMAN), P01860 (IGHG3_HUMAN), y P01861 (IGHG4_HUMAN), respectivamente.

10 En modalidades, el anticuerpo de la descripción es un anticuerpo monoclonal. Un “anticuerpo monoclonal” (mAb, por sus siglas en inglés) se refiere a una población homogénea de anticuerpos implicada en el reconocimiento y unión altamente específicos de un único determinante antigénico, o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos

15 contra diferentes determinantes antigénicos. El término “anticuerpo monoclonal” puede abarcar tanto los anticuerpos monoclonales de longitud completa como los fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes de cadena única (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento del

20 antígeno. Además, “anticuerpo monoclonal” se refiere a tales anticuerpos producidos en cualquier número de maneras que incluye, pero sin limitarse a, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, y animales transgénicos. En modalidades, el

anticuerpo de la descripción es un anticuerpo monoclonal aislado. En modalidades adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

En modalidades, el anticuerpo de la descripción es un anticuerpo de longitud completa descrito anteriormente. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un fragmento de

5 unión al antígeno. El término “fragmento de unión al antígeno” como se usa en la presente incluye cualquier configuración natural o construida artificialmente de un polipéptido de unión al antígeno que comprende una, dos o tres CDR de cadena ligera, y/o una, dos o tres CDR de cadena pesada, en donde el polipéptido es capaz de unirse al antígeno.

10 En modalidades, el fragmento de unión al antígeno de la descripción es un fragmento Fab. El anticuerpo de acuerdo con la descripción también puede ser un Fab', un Fv, un scFv, un Fd, un dominio V NAR, un IgNAR, un intracuerpo, un IgG CH2, un minicuerpo, un anticuerpo de dominio único, un Fcab, un scFv-Fc, F(ab')2, un di-scFv, un acoplador biespecífico de células T (BITE), un F(ab')3, un tetracuerpo, un triacuerpo, un
15 diacuerpo, un DVD-Ig, un (scFv)2, un mAb2 o una DARPin.

Los términos “fragmento Fab” y “Fab” se usan indistintamente en la presente y contienen una única cadena ligera (*p. ej.*, un dominio constante CL y un VL) y una única cadena pesada (*p. ej.*, un dominio constante CH1 y un VH). La cadena pesada de un fragmento Fab no es capaz de formar un enlace disulfuro con otra cadena pesada.

20 Un “fragmento Fab” contiene una única cadena ligera y una única cadena pesada pero además del CH1 y el VH, un “fragmento Fab” contiene la región de la cadena pesada entre los dominios CH1 y CH2 que se requiere para la formación de un enlace disulfuro

entre cadenas. Por lo tanto, dos “fragmentos Fab” pueden asociarse a través de la formación de un enlace disulfuro para formar una molécula F(ab')₂.

Un “fragmento F(ab')₂” contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena incluye una porción de la región constante necesaria para la formación de un
5 enlace disulfuro entre cadenas entre dos cadenas pesadas.

Un “fragmento Fv” contiene solo las regiones variables de la cadena pesada y ligera. No contiene regiones constantes.

Un “anticuerpo de dominio único” es un fragmento de anticuerpo que contiene una única unidad de dominio de anticuerpo (*p. ej.*, VH o VL).

10 Un “Fv monocatenario” (“scFv”, por sus siglas en inglés) es un fragmento de anticuerpo que contiene el dominio VH y VL de un anticuerpo, unidos entre sí para formar una cadena única. Se usa comúnmente un enlazador polipeptídico para conectar los dominios VH y VL del scFv.

Un “scFv en tándem”, también conocido como un TandAb, es una molécula de Fv
15 monocatenario formada mediante la unión covalente de dos scFv en una orientación en tándem con un enlazador peptídico flexible.

Un “acoplador biespecífico de células T” (BiTE) es una proteína de fusión que consiste en dos fragmentos variables de cadena única (scFv) en una única cadena peptídica.

Uno de los scFv se une a las células T a través del receptor CD3, y el otro a un
20 antígeno de células tumorales.

Un “diacuerpo” es un pequeño fragmento de anticuerpo bivalente y biespecífico que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL) conectados

mediante un enlazador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena (Kipriyanov, *Int. J. Cancer* 77 (1998), 763-772). Esto obliga al emparejamiento con los dominios complementarios de otra cadena y promueve el ensamblaje de una molécula dimérica con dos sitios

5 funcionales de unión al antígeno.

Una “DARPin” es una molécula biespecífica de repetición de anquirina. Las DARPin se derivan de proteínas de anquirina naturales, que pueden hallarse en el genoma humano y son uno de los tipos más abundantes de proteínas de unión. Un módulo de las genotecas de DARPin se define mediante secuencias de proteínas de repetición de

10 anquirina naturales, usando 229 repeticiones de anquirina en el diseño inicial y otras 2200 en el refinamiento posterior. Los módulos sirven como bloques de construcción para las genotecas de DARPin. Los módulos de las genotecas se asemejan a las secuencias del genoma humano. Una DARPin se compone de 4 a 6 módulos. Debido a que cada módulo tiene aproximadamente 3,5 kDa, el tamaño de una DARPin promedio

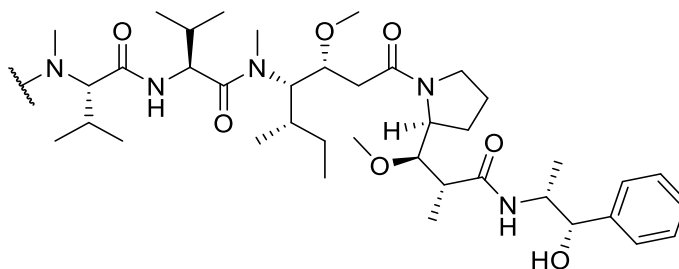
15 es 16-21 kDa. La selección de aglutinantes se realiza mediante presentación en ribosomas, que está completamente libre de células y se describe en He M. y Taussig MJ., *Biochem Soc Trans.* 2007, Nov;35(Pt 5):962-5.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede modificarse además para que contenga entidades químicas adicionales que no forman

20 parte normalmente de la proteína. Esas entidades derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la vida media biológica o la absorción de la proteína. Las entidades también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y lo

similar. Puede hallarse una descripción general de esas entidades en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22.^a ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

D^M



Como se usa en la presente, D^M es

- 5 Un conjugado de la Fórmula (IM) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede someterse a escisión para liberar el fármaco libre que es MMAE ((S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida). La MMAE es un inhibidor de
- 10 microtúbulos (MTI).

Ejemplos

La memoria descriptiva se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Información general

- 15 Los reactivos y disolventes (todos anhidro de grado HPLC) se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin ninguna purificación adicional a menos que se indique de cualquier otra manera. Todos los reactivos se pesaron y se manipularon en el aire a menos que se indique de cualquier otra manera. La salmuera se refiere a una solución saturada de NaCl. La concentración bajo presión reducida se refiere al uso de
- 20 un evaporador rotatorio. Los reactivos pegilados se obtuvieron de PUREPEG. Mc-vc-

PAB-MMAE (maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenzoiloxycarbonil-MMAE, CAS: 646502-53-6) se obtuvo de Med Chem Express y se denominará **LP1**. En general, los ejemplos y los compuestos Intermedios se nombran usando CHEMDRAW PROFESSIONAL versión 22.2.0.3300 de PERKINELMER.

5 Lista de abreviaturas

ADC: Conjugación anticuerpo-fármaco; All: Alilo; Alloc: aliloxycarbonilo; TFA: ácido trifluoroacético; FA: Ácido fórmico; FC: cromatografía ultrarrápida; Fmoc: fluorenilmetiloxycarbonilo; DCM: diclorometano; DBA: dibencilidenacetona; DIPEA: diisopropiletilamina; DMF: N,N-dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; dppf: 1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno; ESI: ionización por electropulverización; HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; HATU: hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido; HOPO: 1-Hidroxi-2-piridona; mAb: anticuerpo monoclonal; MS tamices moleculares; RT: tiempo de retención; Tf: triflato; THF: tetrahidrofurano; UHPLC: cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento; V: Volúmenes.

Cromatografía ultrarrápida en columna

Método A

La cromatografía ultrarrápida se realizó usando una BIOTAGE ISOLERA y se comprobó la pureza de las fracciones mediante cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés). La TLC se realizó usando gel de sílice MERCK KIESELGEL 60 F254, con indicador fluorescente en placas de aluminio. La visualización de TLC se logró con luz UV. Se compraron solventes de cromatografía y se usaron sin purificación

adicional de VWR U.K. Este método se aplicó a los Intermedios **5-8** y **22-26**, a menos que se indique lo contrario.

Método B

La purificación cromatográfica de productos se realizó con un sistema CHEETAH

- 5 MP200 con detección UV integrada, usando cromatografía en columna sobre (A) geles de sílice (40-60 μm), se eluyó con éter de petróleo y acetato de etilo o diclorometano y metanol, (B) C18 esférico (20-35 μm), se eluyó con agua y acetonitrilo con ácido fórmico (0,1 %) o ácido trifluoracético (0,05 %) o modificador de amonio de formato (10 mmol). Este método se aplicó a todos los demás no indicados en FC método A, a
- 10 menos que se indique lo contrario.

Condiciones de LC/MS

Método A

La espectrometría de masas por electropulverización en modo positivo se realizó

usando un WATERS ACQUITY H-CLASS SQD2. Las fases móviles usadas fueron el

- 15 solvente A (agua con 0,1 % de ácido fórmico) y solvente B (acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico). La composición inicial de 5 % de B se mantuvo durante 25 segundos, se aumentó después de 5 % de B a 100 % de B durante un período de 1 minuto 35 segundos. La composición se mantuvo durante 50 segundos a 100 % de B, se regresó después a 5 % de B en 5 segundos y se mantuvo allí durante 5 segundos. La duración
- 20 total del gradiente fue 3,0 minutos. La velocidad de flujo fue 0,8 ml/minuto. La detección fue a 254 nm. Columnas: WATERS ACQUITY UPLC BEH SHIELD RP18 1,7 μm 2,1 x 50 mm a 50 °C equipadas con precolumna WATERS ACQUITY UPLC BEH SHIELD

RP18 VANGUARD, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 5 mm. Este método se aplicó a los **Intermedios 20, 21, 24-26 y 37**, a menos que se indique lo contrario.

Método B

Las muestras se analizaron usando un QEXACTIVE ORBITRAP (THERMO) acoplado
5 a una DIONEX ULTIMATE 3000 UPLC (THERMO) equipada con una columna
ACQUITY UPLC CSH C18 RP (2,1 mm x 50 mm, partícula 1,7 µm ((Waters))). Las
temperaturas del automuestreador y la columna se fijaron en 50 °C y 10 °C
respectivamente. Se inyectaron cinco µl de muestra 200 µM disuelta en
acetonitrilo/agua 1:1 v/v en columna y se separaron durante 9 minutos (muestras
10 reducidas) o 10 minutos (muestras intactas) usando un gradiente de 5-100 % de fase
móvil B (0,1 % de +FA en acetonitrilo) en fase móvil A (0,1 % de TFA en agua) a
0,5 ml/min. Los ajustes para la fuente de electropulverización calentada fueron los
siguientes: velocidad de flujo de gas envolvente 50, velocidad de flujo de gas auxiliar 15
y voltaje de pulverización 3,5 kV. El nivel de RF se estableció en 50. La temperatura
15 capilar y la temperatura del calentador de gas auxiliar se fijaron en 350 °C y 400 °C
respectivamente. La traza UV se registró a 223 nm y 330 nm. Se adquirieron espectros
de masas de escaneo completo en modo positivo con resolución de 70000, objetivo
AGC establecido en 3E6, tiempo máximo de inyección establecido en 200 ms y rango
de masa de 150 – 2000 m/z. Los espectros de fragmentación se obtuvieron usando
20 todo el modo de fragmentación iónico para 133-2000 m/z con energía de colisión
normalizada escalonada de 15, 28 y 45. Los datos adquiridos se analizaron con
THERMO XCALIBUR QUAL BROWSER (versión 3.1.66.10). Este método se usó para
los **Intermedios 5-8 y 22-23 y LP2-LP8**, a menos que se indique lo contrario.

Método C

Las muestras se analizaron usando un SHIMADZU LCMS-2020 con ionización por electropulverización en modo de detección de iones positivos con bomba 20ADXR, automuestreador SIL-20ACXR, horno de columna CTO-20AC, detector PDA M20A y

5 detector LCMS 2020 MS. LC se ejecutó en dos configuraciones: 1) Columna Halo C18 (2,0 μ m 3,0 x 30 mm) en combinación con un gradiente (5-100 % de B en 1,2 minutos) de agua y FA (0,1 %) (A) y CH₃CN y FA (0,1 %) (B) a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min; 2) Columna POROSHELL HPH C18 (2,7 μ m 3,0 x 50 mm) en combinación con un gradiente (5-95 % de B en 2 minutos) de regulador acuoso de carbonato de

10 amonio/amoniaco 46 mM a pH 10 (A) y MeCN (B) a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min; 3) Columna Halo C18 (2,0 μ m 3,0 x 30 mm) en combinación con un gradiente (5-95 % de B en 2 minutos) de agua y TFA (0,05 %) (A) y CH₃CN y TFA (0,05 %) a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min (B). La temperatura del horno de columna (CTO-20AC) fue de 40,0 °C. El volumen de inyección fue de 1 μ l. La detección

15 de PDA (SPD-M20A) estuvo en el rango de 190-400 nm. El detector MS, que se configuró con ionización por electropulverización como fuente ionizable; Modo de adquisición: Escaneo; Flujo de gas de nebulización: 1,5 L/min; Flujo de gas de secado: 15 l/min; Voltaje del detector: Tensión de sintonización $\pm$ 0,2 kv; Temperatura DL: 250 °C; Temperatura del bloque térmico: 250 °C; Rango de escaneo: 90,00 –

20 900,00 m/z. Este método se aplicó a todos los demás intermedios no indicados en el método LCMS A o B, a menos que se indique lo contrario.

Condiciones de HPLC

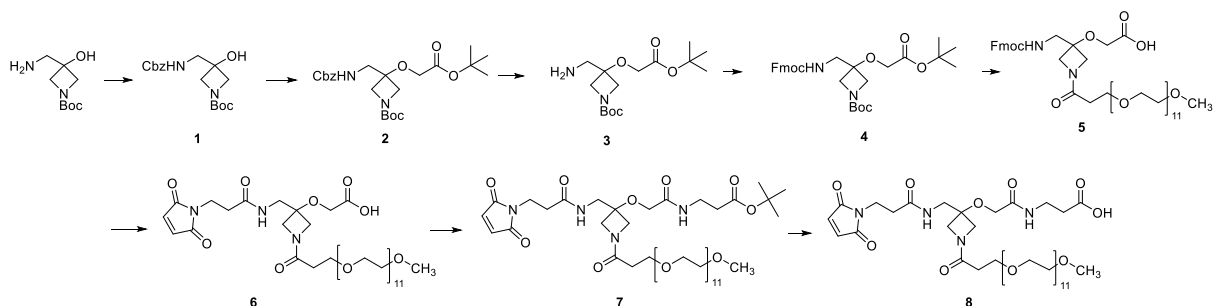
Método A

La cromatografía de líquidos ultrarrápida (UFLC, por sus siglas en inglés) de alto rendimiento en fase inversa se realizó en una máquina SHIMADZU PROMINENCE usando una columna PHENOMENEX GEMINI NX 5 μ C18 (a 50 °C) de dimensiones: 150 x 21,2 mm. Los eluyentes usados fueron el solvente A (H₂O con 0,1 % de ácido fórmico) y el solvente B (CH₃CN con 0,1 % de ácido fórmico) o el solvente A (H₂O con 0,1 % de ácido trifluoroacético) y el solvente B (CH₃CN con 0,1 % de ácido trifluoroacético), usado para los intermedios **35**, **36** y **LP2-LP5**, a menos que se indique lo contrario.

Método B

La HPLC preparativa se realizó con un sistema WATERS MASSLYNX con detección de MS integrada y equipado con columnas Prep C18 OBD 5 μ m 30 x 150 mm de XBRIDGE o XSELECT CSH. Alternativamente, se usó GILSON GX-281 con detección UV integrada, equipado con XBRIDGE o SUNFIRE C18 10 μ m, 19 x 150 ID o 19 x 250 mm. Como eluyente (ácido) se aplicaron gradientes de agua/MeCN/ácido FA (95/5/0,1) o agua/ 0,05 % de TFA (A) y MeCN/ MeOH (B) o 0,05 % de amoniaco en agua/10 mmol NH₄HCO₃ (A) y MeCN/ MeOH (B). Este método se utilizó para el intermedio **20**.

Síntesis del Intermedio 8



Etapas 1

Se añadió 3-(aminometil)-3-hidroxiacetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (10 g, 49,44 mmol) se añadió a N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (19,17 g, 148,33 mmol) y N-(benciloxicarbonilo)succinimida (14,79 g, 59,33 mmol) en THF (150 ml) bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 3 horas. El solvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de sílice, gradiente de elución de 0 a 10 % de MeOH en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar 3-((((benciloxi)carbonil)amino)metil)-3-hidroxiacetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**Intermedio 1**, 13,00 g, 78 %) como un aceite amarillo. *m/z* (ES⁺), [M+H]⁺ = 337; TFA, HPLC *t*R = 0,903 min.

Etapas 2

Se añadió el **Intermedio 1** (13 g, 38,65 mmol) a 2-bromoacetato de *tert*-butilo (9,05 g, 46,38 mmol) e hidruro de sodio (1,855 g, 77,29 mmol) en THF (150 ml) bajo nitrógeno a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua (50 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml), la capa superior se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar el aceite amarillo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de elución de 0 a 50 % de EtOAc en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar 3-((((benciloxi)carbonil)amino)metil)-3-(2-(*tert*-butoxi)-2-oxoetoxi)acetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**Intermedio 2**, 9,00 g, 51,7 %) como un aceite incoloro. *m/z* (ES⁺), [M+H]⁺ = 451; TFA, HPLC *t*R = 1,125 min.

Etapas 3

El **Intermedio 2** (**2**, 9 g, 19,98 mmol) se añadió al polvo catalizador de paladio ROYER™ (CAS 7440-05-3, 6,07 g, 19,98 mmol) en THF (120 ml) bajo hidrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 6 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de sílice y se lavó con THF (3 x 50 ml). El solvente se eliminó a presión reducida para proporcionar 3-(aminometil)-3-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetoxi)azetidina-1-carboxilato de terc-butilo (**Intermedio 3**, 6,00 g, 85 %) como un aceite amarillo. m/z (ES+), [M+H]⁺ = 317; TFA, HPLC tR = 0,882 min.

Etapas 4

El **intermedio 3** (5 g, 15,80 mmol) se añadió a cloroformato de 9-fluorenilmetilo (6,13 g, 23,70 mmol) y N, N-diisopropiletilamina (6,13 g, 47,41 mmol) en THF (50 ml) bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 3 horas. El solvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de elución de 0 a 50 % de EtOAc en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar 3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-3-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetoxi)azetidina-1-carboxilato de terc-butilo (**4**, 3,66 g, 43,0 %) como un sólido blanco. m/z (ES+), [M+H]⁺ = 539; TFA, HPLC tR = 1,230 min.

Etapas 5

Al **Intermedio 4** (615 mg, 1,14 mmol) en DCM (4 ml) se le añadió TFA (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un producto crudo que se usó sin purificación adicional. Se añadió una solución de 1-[(38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctriacontan-38-Il)oxi]-2,5-pirrolidindiona

(708 mg, 1,03 mmol) y DIPEA (0,397 ml, 2,28 mmol) en DMF (5 ml) en ácido 2-((3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)azetidin-3-il)oxi)acético crudo (436 mg, 1,14 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa (5-60 % de MeCN en agua +0,1 % de FA) para dar ácido 2-((3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctriacontan-38-ol)azetidin-3-il)oxo)acético (**Intermedio 5**, 654 mg, 66,5 %) como un aceite incoloro. LCMS (15 min): 6,43 min; 954,7 [M+H]⁺

Etapas 6

Al **Intermedio 5** (615 mg, 1,14 mmol) en DCM (4 ml) se le añadió dietilamina (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un producto crudo que se usó sin purificación adicional. Al ácido 2-((3-(aminometil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctriacontan-38-ol)azetidin-3-il)oxi)acético crudo (504 mg, 0,69 mmol) se añadió 2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoato (367 mg, 1,38 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0,240 ml, 1,38 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía de fase inversa (5-50 % de MeCN en agua +0,1 % de FA) para dar ácido 2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctriacontan-38-ol)azetidin-3-il)oxi)acético (**Intermedio 6**, 280 mg, 46,0 %) como un aceite incoloro. LCMS (15 min): 4,66 min; 881. [M+H]⁺

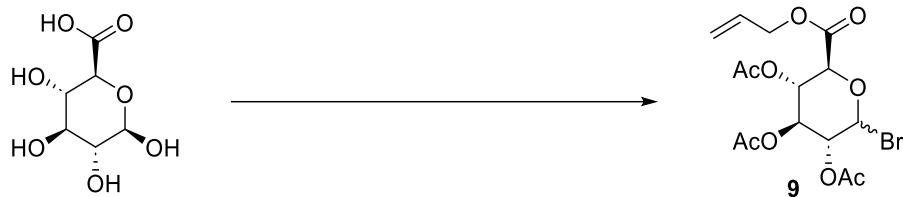
Etapas 7

A la solución agitada del **Intermedio 6** (1 g, 1,13 mmol) en DCM (20 ml) se añadió clorhidrato de 3-aminopropanoato de terc-butilo (410 mg, 2,3 mmol) al matraz. Después se añadió HATU (860 mg, 2,3 mmol), DIEA (590 mg, 4,6 mmol) y DMF (5 ml) al matraz y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc(20 ml) y después se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (10 ml), ácido cítrico acuoso (1M, 10 ml), salmuera (10 ml). Después de secarse sobre sulfato de sodio, y filtrarse, la solución se concentró a sequedad para proporcionar 3-(2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oil)azetidin-3-il)oxi)acetamido)propanoato de terc-butilo se obtuvo como un aceite (**Intermedio 7**, 500 mg, 43,7 %). MS ESI: $[M+H]^+$ m/z 1009,4.

Etapas 8

A la solución del **Intermedio 7** (550 mg, 0,5 mmol) en el solvente mixto de DCM (11 ml) se añadió TFA (5,5 ml) a 20 °C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de que el material de partida se consumió completamente, la solución de reacción se concentró a sequedad al vacío. El residuo crudo se purificó mediante columna de gel de sílice con 0-15 % de MeOH en DCM para proporcionar ácido 3-(2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oil)azetidin-3-il)oxi)acetamido)propanoico como un aceite (**Intermedio 8**, 200 mg, 38,5 %). MS ESI: $[M+H]^+$ m/z 953,4.

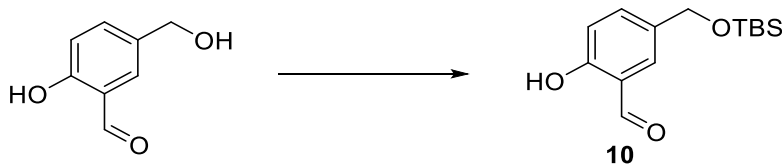
Intermedio 9



Se añadió gota a gota 2,3,4,6,7,8,9,10-octahidropirimido[1,2-a]azepina (26,5 ml, 177,35 mmol) a un matraz de fondo redondo de 1 l que contenía ácido

- 5 (2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (31,3 g, 161,22 mmol) en DMF (100 ml) a 21 °C. A continuación, se añadió 3-bromoprop-1-eno (16,72 ml, 193,47 mmol) a la mezcla de reacción gota a gota durante 10 minutos y la reacción se agitó a 21 °C durante 24 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se trató con piridina (104 ml, 1289,60 mmol). Se añadió después anhídrido acético
- 10 (244 ml, 2579,20 mmol) a la mezcla de reacción. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se ejecutó durante 2 horas a 21 °C. La mezcla de reacción se concentró a vacío reducido y la piridina restante se eliminó azeotrópicamente con tolueno (1 x 100 ml). El material crudo se diluyó con DCM (65 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió después ácido bromhídrico al 30 % en ácido acético (175 ml, 3226,03 mmol) a la
- 15 mezcla de reacción a 0 °C. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se ejecutó durante 2 horas 30 minutos a 21 °C. Se evaporó el solvente, el compuesto se purificó después mediante cromatografía ultrarrápida en columna en fase normal para proporcionar triacetato de (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((aliloxi)carbonil)-6-bromotetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 9**, 33 g, 48 % de rendimiento) como un material
- 20 translúcido beige. LCMS (ESI) m/z 445,0 (M + Na)+.

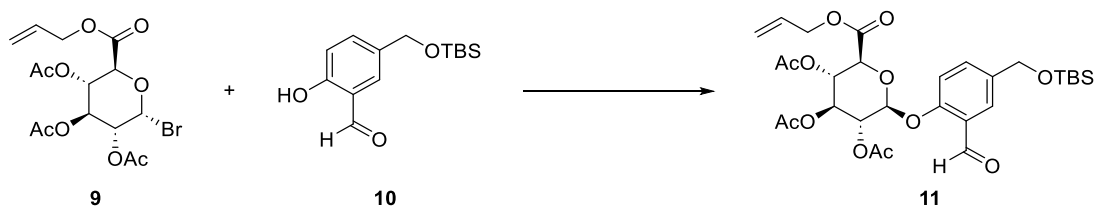
Intermedio 10



Se añadió TBS-Cl (20,80 g, 138,02 mmol) en DCM (25 ml) gota a gota a 1H-imidazol

- 5 (17,90 g, 262,90 mmol) y 2-hidroxi-5-(hidroximetil)benzaldehído (20 g, 131,45 mmol) en DCM (500 ml) a 0 °C durante un período de 2 horas bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua (500 ml), se extrajo con DCM (2 x 300 ml), la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar 5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-hidroxi-
 10 hidroxibenzaldehído (**Intermedio 10**, 35,0 g, 100 %) como un material incoloro. m/z (ES⁺), [M+Na]⁺ = 289; NH₄HCO₃, HPLC tR = 1,505 min.

Intermedio 11



15

A un matraz de fondo redondo de 500 ml secado al vacío se le añadieron tamices moleculares (microesferas de 4 Å, 5,0 g), óxido de plata (29,2 g, 125,8 mmol) y acetonitrilo (150 ml), produciendo una suspensión negra. A esta suspensión se le añadió una solución del **Intermedio 9** (10,7 g, 25,2 mmol) en acetonitrilo (50 ml)

durante 20 min seguido de la adición del **Intermedio 10** (13,6 g, 51,1 mmol) en acetonitrilo (50 ml) en una porción. La mezcla resultante se agitó vigorosamente a 20 °C durante 16 h. Después de 16 h, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de 5 cm de Celite y se enjuagó con diclorometano (3 x 25 ml). El solvente se evaporó, el compuesto se purificó después mediante cromatografía ultrarrápida en columna en fase normal para proporcionar triacetato de (2S,3S,4S,5R,6S)-2-((aliloxi)carbonil)-6-(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-formilfenoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo como un material blanco (**Intermedio 11**, 5,2 g, 34 % de rendimiento). LCMS (ESI) m/z 626,3 (M + NH₄)⁺.

10 **Intermedio 12**

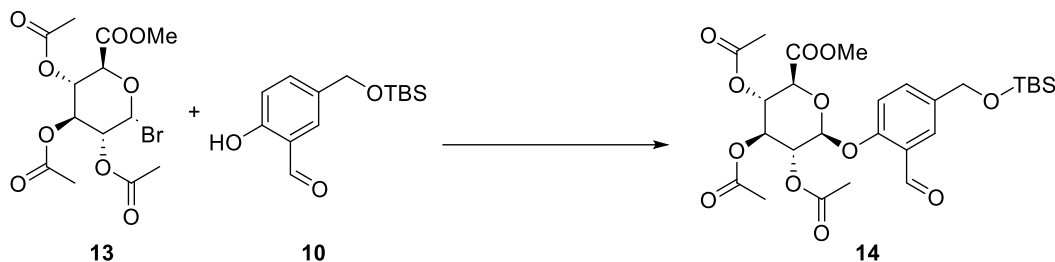


A una solución del **Intermedio 11** (5,2 g, 8,6 mmol) en acetonitrilo (40 ml) se le añadió carbamato de *terc*-butilo (3,8 g, 32,3 mmol), ácido trifluoroacético (2,0 ml, 25,9 mmol), y trietilsilano (4,1 ml, 25,8 mmol). Se agitó durante 2 h a 20 °C, el solvente se evaporó después. Al aceite incoloro resultante se le añadió 1,4-dioxano (8 ml) y HCl (4,0 M en 1,4-dioxano, 50 ml, 200 mmol). La mezcla se agitó a 20 °C durante 30 min, se evaporó el solvente. El polvo blanco resultante se disolvió en DMSO (3 ml) se pasó después a través de resina de intercambio catiónico pretratada con metanol (WATERS PORAPAK CX). El compuesto deseado se eluyó de la resina con metanol para proporcionar

triacetato de (2S,3S,4S,5R,6S)-2-((aliloxi)carbonil)-6-(2-(aminometil)-4-(hidroximetil)fenoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo como un material blanco (**Intermedio 12**, 2,5 g, 80 % en 2 etapas). LCMS (ESI) m/z 496,5 (M + H)+.

Intermedio 14

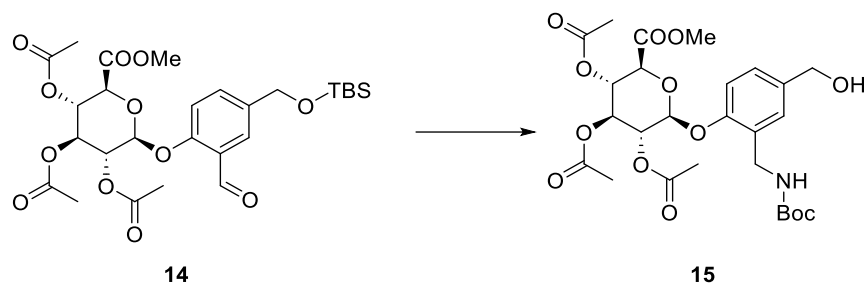
5



Se añadió óxido de plata(I) p.a. (52,2 g, 225,22 mmol) a tamices moleculares 4 Å (30 g), triacetato de (2R,3R,4S,5S,6S)-2-bromo-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 13**, 44,7 g, 112,61 mmol), **Intermedio 10** (15 g, 56,30 mmol) en MeCN (500 ml) a 0 °C durante un período de 2 horas bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 16 horas. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de elución de 0 a 30 % de EtOAc en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-formilfenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 14**) como un material amarillo pálido. m/z (ES+), [M+Na]⁺ = 605; TFA, HPLC tR = 1,071 min.

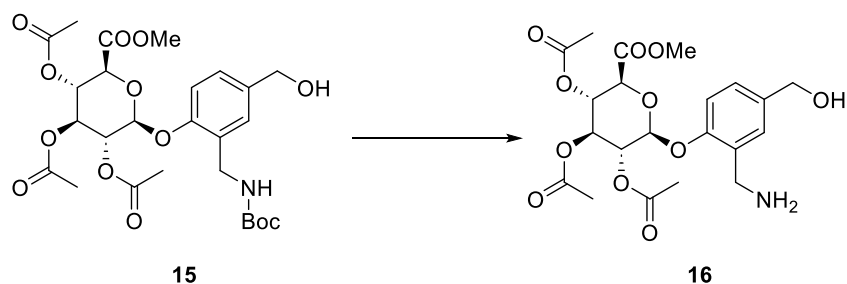
Intermedio 15

20



Se añadió TFA (8 ml) a Et₃SiH (32 ml), carbamato de terc-butilo (15,28 g, 130,43 mmol) y el **Intermedio 14** (20 g, 34,32 mmol) en MeCN (200 ml) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ saturado (200 ml), se extrajo con EtOAc (2 x 300 ml), la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar un residuo incoloro. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de elución de 0 a 50 % de THF en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(((terc-butoxicarbonil)amino)metil)-4-(hidroximetil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 15**, 18,80 g, 96 %) como un material amarillo pálido. m/z (ES⁺), [M+Na]⁺ = 592; TFA, HPLC tR = 1,088 min.

Intermedio 16



Intermedio 15 (10 g, 17,56 mmol) en HCl/1,4-dioxano (40 ml)/1,4-dioxano (40 ml) a 25 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 1 hora. El solvente se eliminó a presión reducida para proporcionar clorhidrato de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(aminometil)-4-(hidroximetil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-
 5 2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 16**) como un material blanco. m/z (ES+), [M+H]⁺ = 470; TFA, HPLC tR = 0,587 min.

Intermedio 17

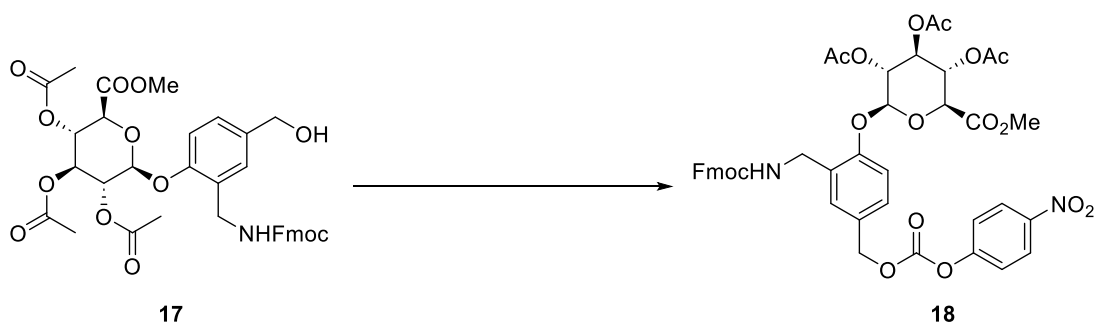


10

El **Intermedio 16** (1 g, 1,98 mmol), (9H-fluoren-9-il)metilcarbonocloridato (0,767 g, 2,97 mmol) y DIPEA (1,036 ml, 5,93 mmol) en DCM (10 ml) se agitó a TA durante 3 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua (50 ml), se extrajo con DCM (2 x 50 ml), la capa orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para
 15 proporcionar un residuo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de elución de 0 a 80 % de éter de petróleo en EtOAc. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-4-(hidroximetil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 17**,

0,952 g, 69,6 %) como un material blanco. m/z (ES+), $[M+H]^+ = 692$; TFA, HPLC $t_R = 0,880$ min.

Intermedio 18

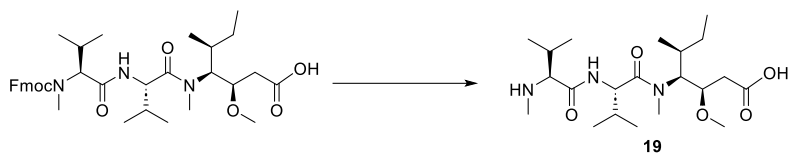


5

El **Intermedio 17** (3,5 g, 5,06 mmol), carbonato de bis(4-nitrofenilo) (1,693 g, 5,57 mmol) y DIEA (1,326 ml, 7,59 mmol) en DMF (35 ml) se agitó a TA durante 3 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua (50 ml), se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml), y la capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó para proporcionar el residuo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de sílice, gradiente de elución 0 a 100 % de EtOAc en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 18**, 3,68 g, 85 %) como un material blanco. m/z (ES+), $[M+H]^+ = 857$; fa, HPLC $t_R = 1,007$ min.

15

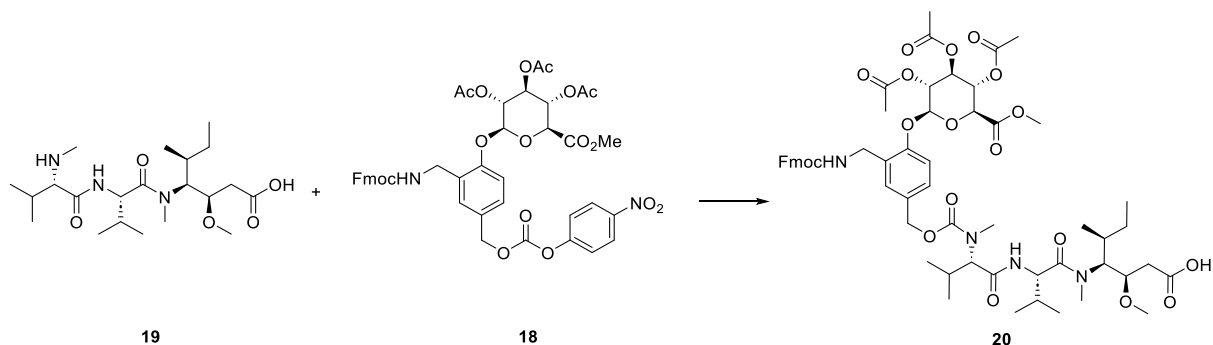
Intermedio 19



El ácido (5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-1-(9H-fluoren-9-il)-5,8-diisopropil-12-metoxi-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (12 g,

- 5 18,81 mmol) en trimetilamina (80 ml) se agitó a 70 °C durante 3 °C horas. El solvente se eliminó a presión reducida. El precipitado se recogió mediante filtración, se lavó con éter de petróleo (100 ml) y se secó al vacío para proporcionar ácido (3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoico (**Intermedio 19**, 5,80 g, 74,2 %) como un sólido blanco. LCMS (3
- 10 minutos): Sin PDA; 416 [M+H]⁺.

Intermedio 20

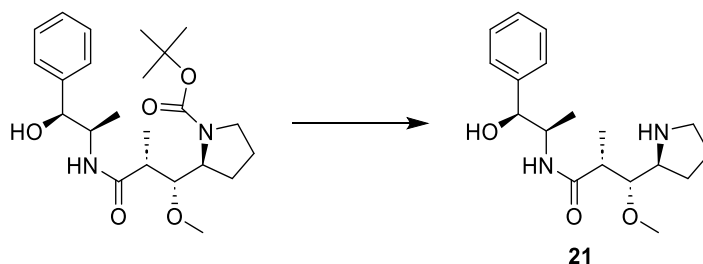


- 15 El **Intermedio 18** (1,5 g, 1,75 mmol), el **Intermedio 19** (0,728 g, 1,75 mmol), DIPEA (0,917 ml, 5,25 mmol) y 2-hidroxipiridina-N-óxido (0,195 g, 1,75 mmol) en DMA (200 ml) se agitaron a TA durante 18 horas. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml), las capas orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se

evaporaron para proporcionar un material amarillo. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (Columna: columna XBRIDGE Prepl fenilo OBD, 30*150 nm 5 um; Fase móvil A: Agua (10 mmol/LNH₄HCO₃), Fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 60 ml/min; gradiente: isocrático 54-59; Longitud de onda:

- 5 220/254 nm; RT1 (min): 15. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar ácido (5S,8S,11S,12R)-1-(3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)-11-((S)-sec-butil)-5,8-diisopropil-12-metoxi-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**Intermedio 20**,
10 1,400 g, 70,6 %) como un material. m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 1134; FA, HPLC tR = 1,197 min.

Intermedio 21



15

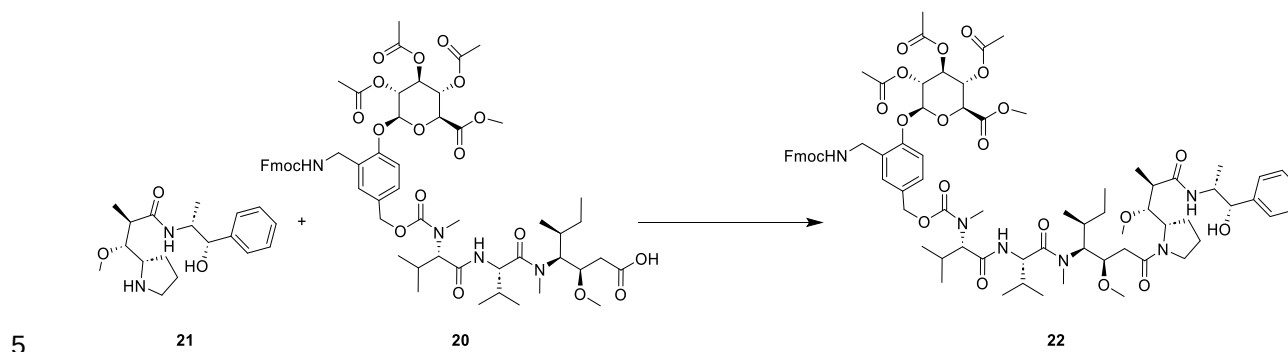
A (S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo (256 mg, 0,61 mmol) en DCM (2 ml) se le añadió TFA (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar un (2R,3R)-N-

- 20 ((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)-3-metoxi-2-metil-3-((S)-pirrolidin-2-il)propanamida

crudo (**Intermedio 21**) que se usó sin purificación. LCMS (3 min): 0,55 min; 322,0

[M+H]⁺

Intermedio 22



Al **Intermedio 21** crudo (234 mg, 0,73 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió el **Intermedio 20** (486 mg, 0,429 mmol), HATU (269 mg, 0,71 mmol) y DIPEA (0,360 ml, 2,07 mmol).

La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla

10 de reacción se concentró a presión reducida para obtener un crudo. La purificación

mediante cromatografía en columna (0-6 % de MeOH en DCM) dio triacetato de

(2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-4-

((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-

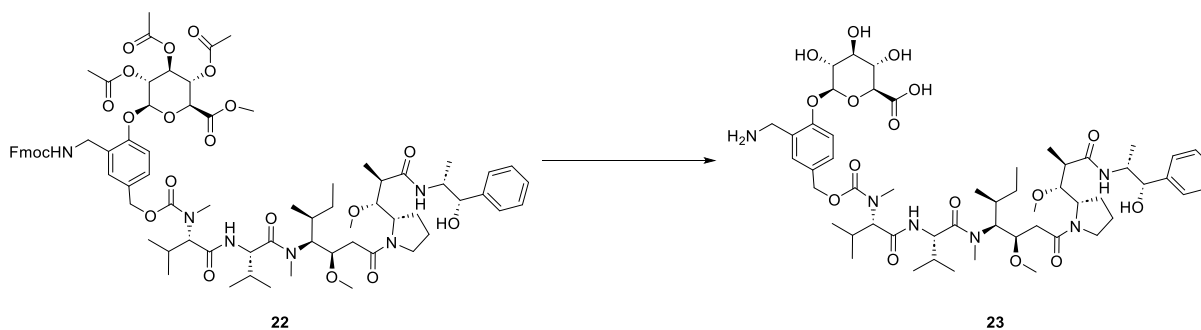
fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-

15 diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-6-

(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 22**, 552 mg, 90 %) como un

material incoloro. LCMS (15 min): 8,99 min; 1436,9 [M+H]⁺

Intermedio 23

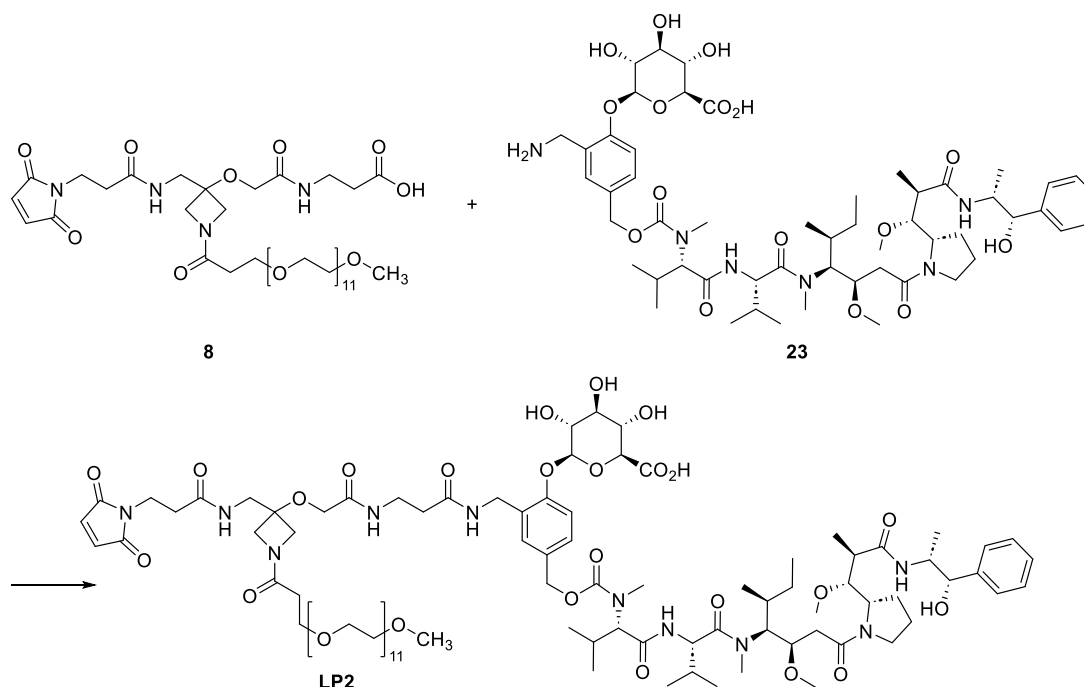


Al **Intermedio 22** (552 mg, 0,38 mmol) en MeOH (8 ml) y agua (2 ml) se le añadió carbonato de potasio (531 mg, 3,84 mmol). La mezcla de reacción se agitó a

5 temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió ácido acético (1,1 ml) y la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en fase inversa (C18, 120 g, 5-40 % de MeCN en agua +0,1 % de FA, 25 CV) para dar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(aminometil)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**Intermedio 23**, 259 mg, 62,8 %) como un

10 material blanco. LCMS (15 min): 5,57 min; 1074,9 [M+H]⁺.

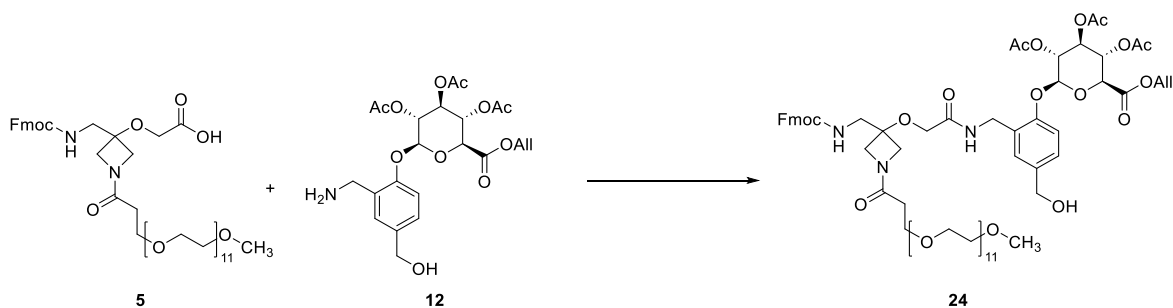
Síntesis de LP2



A la solución del **Intermedio 8** (460 mg, 0,5 mmol) en DMF (4,6 ml) se le añadió la solución del **Intermedio 23** (520 mg, 0,48 mmol), HBTU (275 mg, 0,49 mmol) y DIEA (187 mg, 0,48 mmol) a -15 a -10 °C. Después de agitar durante 10 minutos, el residuo crudo se inactivó con HCl en 1,4-dioxano. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna: columna inversa C18; gradiente: MeCN en agua (0,1 A% de FA): 25-40 %) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butyl)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)-2-((3-(2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidin-3-il)oxi)acetamido)propanamido)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico como un sólido amarillo claro. (**LP2**, 190 mg, rendimiento: 20 %).

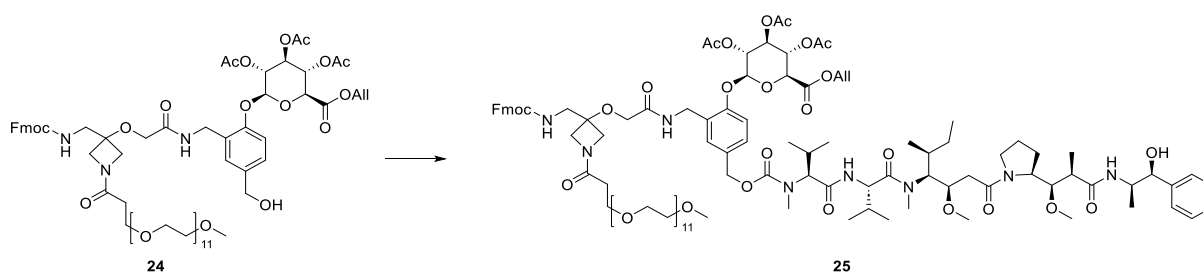
MS ESI: $[M/2+H]^+$ m/z 1004,4.

Intermedio 24



- 5 El **Intermedio 5** (200 mg, 0,21 mmol) y el **Intermedio 12** (109 mg, 0,22 mmol) se agitaron en DMF (5 ml) con hexafluorofosfato de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (V) (88 mg, 0,23 mmol) durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción cruda se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna (diclorometano: metanol de 0 a 10 %) para proporcionar triacetato de
- 10 (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((2-(((3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidin-3-il)oxi)acetamido)metil)-4-(hidroximetil)fenoxi)-6-((aliloxi)carbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 24**, 200 mg, 66 % de rendimiento). LCMS (3 min): 1,88 min; 1431,5 [M+H]⁺, 1453,3 [M+Na]⁺.

15 Intermedio 25



El **Intermedio 24** (200 mg, 0,14 mmol) se disolvió en DMF (5 ml). Se añadió carbonato de bis(4-nitrofenil) (85 mg, 0,28 mmol) en una porción seguido de la adición de N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0,073 ml, 0,42 mmol) y se agitó durante la noche a 25 °C. Se

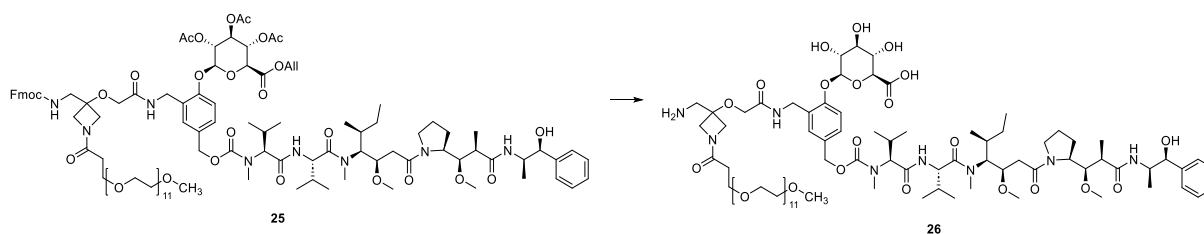
5 añadieron 500 mg adicionales de carbonato de bis(4-nitrofenil) y la reacción se dejó agitar a 25 °C durante 3 h. La reacción cruda se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna (diclorometano: metanol de 0 % a 5 %). El intermedio aislado se disolvió en DMF (5 ml) seguido de la adición de (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-

10 2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida (100 mg, 0,14 mmol), 2-hidroxipiridina 1-óxido (16,31 mg, 0,15 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0,073 ml, 0,42 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a 25 °C. La reacción cruda se concentró a presión reducida y después se purificó mediante cromatografía en columna

15 (diclorometano:metanol de 0 % a 5 %) para obtener triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((2-((3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oi)azetidin-3-il)oxi)acetamido)metil)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-

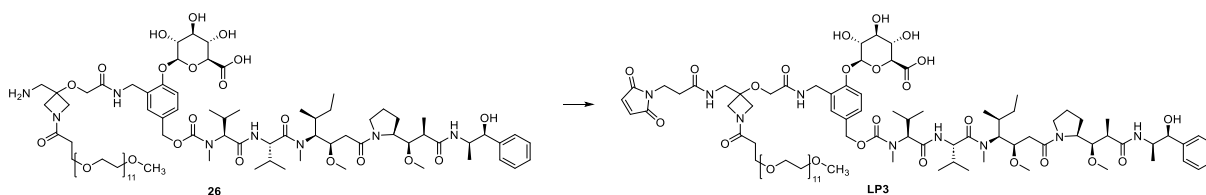
20 2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-6-(((E)-prop-1-en-1-il)oxi)carbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 25**, 200 mg, 65 % de rendimiento). LCMS (3 min): 2,05 min; 1088,5 [M+2H]²⁺.

Intermedio 26



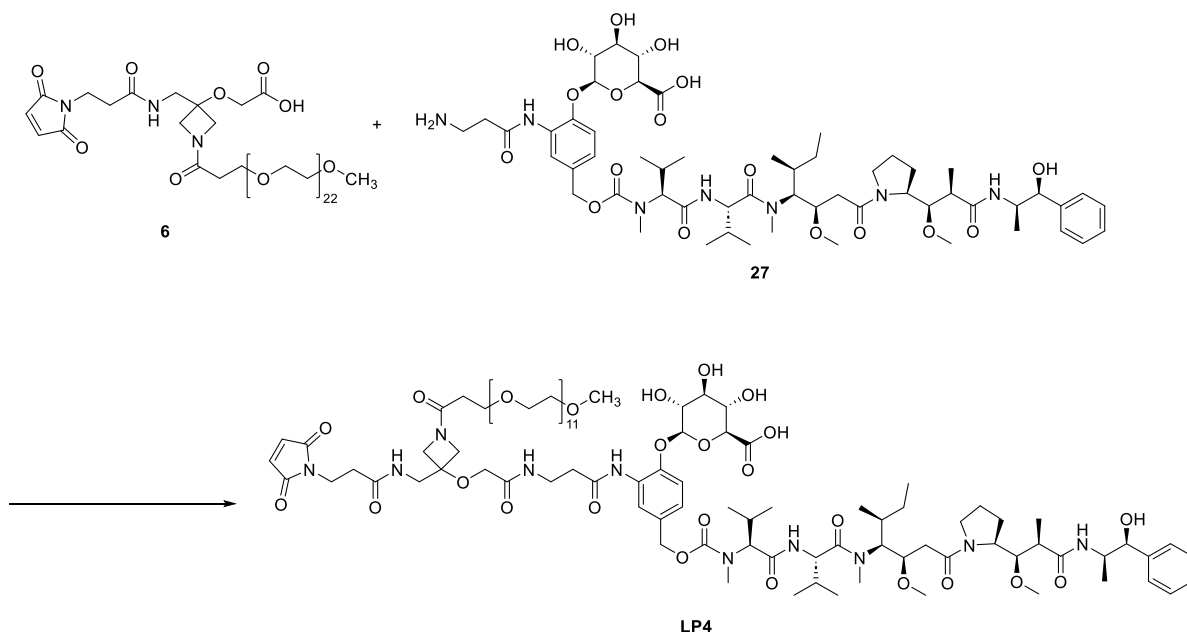
- 5 El **Intermedio 25** (200 mg, 0,09 mmol) se disolvió en DCM (3 ml) seguido de la adición de ácido fórmico (6,94 μ l, 0,18 mmol), trietilamina (0,026 ml, 0,18 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (15,94 mg, 0,01 mmol). La reacción se agitó a 25 °C durante 30 minutos. La reacción se concentró a presión reducida y el residuo se redisolvió en 2 ml de MeOH y 2 ml de THF. Se añadió LiOH (50 mg) en 1 ml de agua.
- 10 Después de agitar a 25 °C durante 1 h, la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (0,1 % de ácido fórmico, agua: acetonitrilo de 15 a 40 %) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((2-((3-(aminometil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-yl)azetidín-3-il)oxi)acetamido)metil)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxí-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidín-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**Intermedio 26**,
- 15 100 mg, 61 % de rendimiento). LCMS (3 min): 1,48 min; 1787,0 [M+H]⁺

Síntesis de LP3



El **Intermedio 26** (100 mg, 0,06 mmol) se disolvió en DMF (3 ml) seguido de la adición de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoato (16,39 mg, 0,06 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0,029 ml, 0,17 mmol). La reacción se agitó a 25 °C durante 10 minutos, después se concentró a presión reducida y se purificó mediante HPLC preparativa (0,1 % de ácido fórmico, agua: acetonitrilo de 15 a 60 %) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butyl)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)-2-((2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-oil)azetidin-3-il)oxi)acetamido)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**LP3**, 71 mg, 65 % de rendimiento). LCMS (15 min): 6,59 min; 1937,7 [M]⁺.

Síntesis de LP4



El **Intermedio 27** se sintetizó como se describió previamente en WO2016/149535. Al

Intermedio 6 (66,8 mg, 0,08 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió HATU (15,47 mg,

5 0,04 mmol) y DIPEA (28,4 μ l, 0,16 mmol). La mezcla de reacción se agitó a

temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-aminopropanamido)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-

10 triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**Intermedio 27**,

46 mg, 0,04 mmol) en DMF (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura

ambiente durante 30 minutos. Se añadió una cantidad adicional de DIPEA (28,4 μ l,

0,16 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante la noche. La mezcla de

reacción se concentró a presión reducida para dar un producto crudo que se purificó

15 mediante HPLC preparativa de fase inversa (C18, CSH, 0,1 % de ácido fórmico, 15-

30 % de MeCN en agua) para dar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butyl)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)-2-(3-(2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidin-3-il)oxi)acetamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**LP4**, 41,0 mg, 50,5 %) como un aceite incoloro. LCMS (15 min): 6,56 min; 998,6 [M+2H]⁺, 1009,4 [M+H+Na]⁺, 666,2 [M+3H]⁺

Intermedio 28

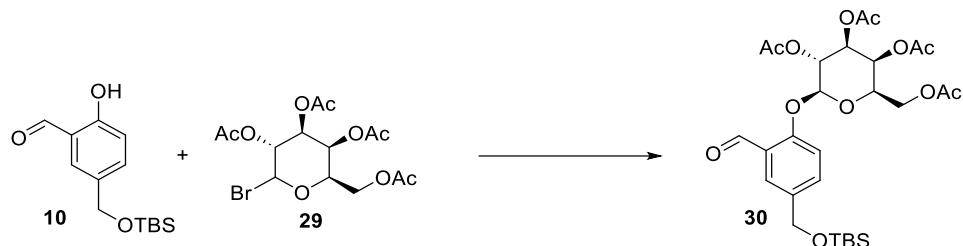
10



Se añadió 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida (1,197 g, 7,71 mmol) a 2,3,5,6-tetrafluorofenol (1,280 g, 7,71 mmol) y ácido 3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoico (2 g, 6,42 mmol) en DCM (20 ml) a 25 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se inactivó con hielo (5 ml), se extrajo con DCM (3 x 5 ml), la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar 2,3,5,6-tetrafluorofenil 3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoato (**Intermedio 28**, 1,500 g, 50,8 %) como un sólido blanco. LCMS (3 minutos): 1,35 min; 460 [M+H]⁺.

20

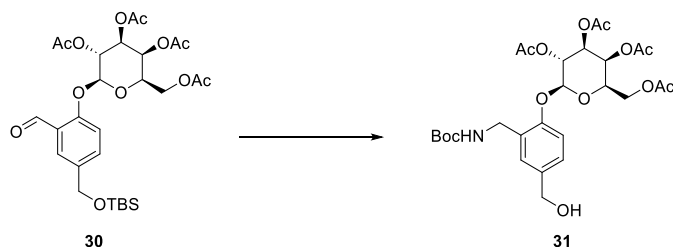
Intermedio 30



Se añadió óxido de plata(I) p.a. (34,8 g, 150,14 mmol) a tamices moleculares de 4 Å
 5 (40 g, 0,00 mmol), **Intermedio 29** (37,0 g, 90,09 mmol) e **Intermedio 10** (20 g,
 75,07 mmol) en MeCN (500 ml) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a
 25 °C durante 16 horas. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite. El
 producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de
 elución de 0 a 50 % de THF en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a
 10 sequedad para proporcionar triacetato de (2R,3S,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(4-
 (((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-formilfenoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo
 (**Intermedio 30**, 36,0 g, 80 %) como un sólido amarillo pálido. LCMS (3 minutos): 1,06
 min; 619 [M+Na]⁺.

Intermedio 31

15



Se añadió TFA (14 ml) a Et₃SiH (56 ml), carbamato de terc-butilo (26,1 g, 222,89 mmol) e **Intermedio 30** (35 g, 58,66 mmol) en MeCN (350 ml) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ saturado (200 ml), se extrajo con EtOAc (2 x 250 ml), la capa orgánica se
 5 secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar un residuo incoloro. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de elución de 0 a 100 % de THF en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2R,3S,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(2-
 (((terc-butoxicarbonil)amino)metil)-4-(hidroximetil)fenoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo
 10 (**Intermedio 31**, 24,00 g, 70,1 %) como un sólido amarillo pálido. LCMS (3 min): 0,79 min; 606 [M+Na]⁺.

Intermedio 32



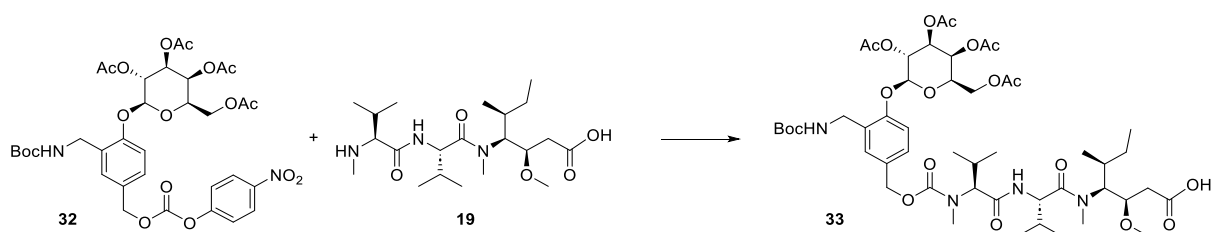
15

El **Intermedio 31** (5 g, 8,57 mmol), carbonato de bis(4-nitrofenilo) (3,13 g, 10,28 mmol) y DIEA (2,99 ml, 17,14 mmol) en DMF (60 ml) se agitó a 25 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua (50 ml), se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml), y la capa orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para
 20 proporcionar un residuo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de sílice, gradiente de elución 0 a 100 % de EtOAc en éter de petróleo. Las

fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2R,3S,4S,5R,6S)-2-(acetoximetil)-6-(2-(((terc-butoxicarbonil)amino)metil)-4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 32**, 3,39 g, 52,8 %) como un sólido amarillo pálido. LCMS (3 minutos): 0,94 min; 749

5 [M+H]⁺.

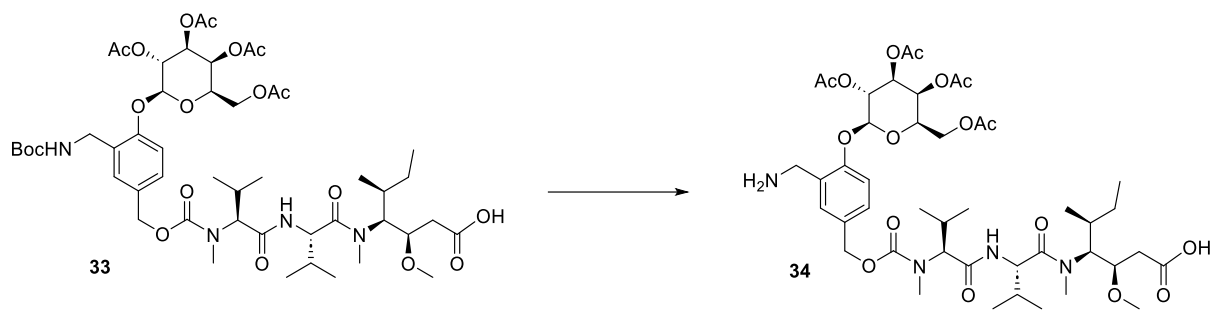
Intermedio 33



- 10 Se añadió 2-hidroxipiridina-N-óxido (0,555 g, 5,00 mmol) a DIEA (1,586 ml, 9,08 mmol), **Intermedio 19** (1,887 g, 4,54 mmol) e **Intermedio 32** (3,4 g, 4,54 mmol) en DMA (50 ml) a 25 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se inactivó con agua (50 ml), y 0,1 M de HCl (50 ml), se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml), se lavó con 0,1 de HCl, y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄,
- 15 se filtró y se evaporó para proporcionar un residuo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida C18, gradiente de elución de 0 a 100 % de MeCN en agua. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar ácido (5S,8S,11S,12R)-1-(3-(((terc-butoxicarbonil)amino)metil)-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-
- 20 (acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)-11-((S)-sec-butil)-5,8-diisopropil-12-

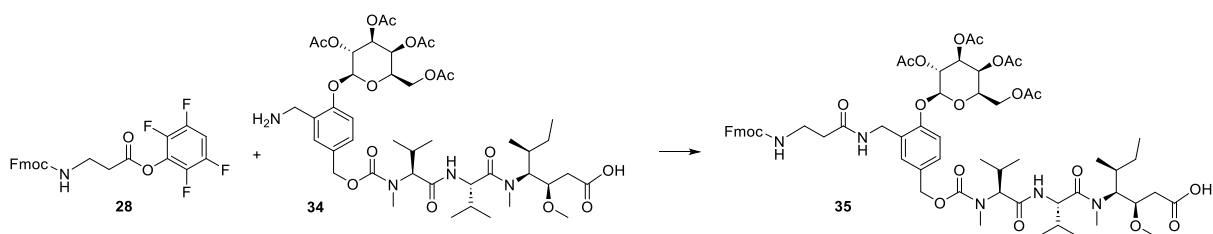
metoxi-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**Intermedio 33**, 1,900 g, 40,8 %) como un sólido blanco. LCMS (3 minutos): 0,92 min; 1026 [M+H]⁺.

Intermedio 34



Se añadió **Intermedio 33** (1,9 g, 1,85 mmol) a TFA (10 ml) y DCM (10,00 ml) a 25 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 1 hora. El solvente se eliminó a presión reducida para proporcionar (5S,8S,11S,12R)-1-(3-(aminometil)-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)-11-((S)-sec-butil)-5,8-diisopropil-12-metoxi-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**Intermedio 34**, 1,500 g, 87 %) como un aceite marrón. LCMS (3 min): 0,64 min; 925 [M+H]⁺.

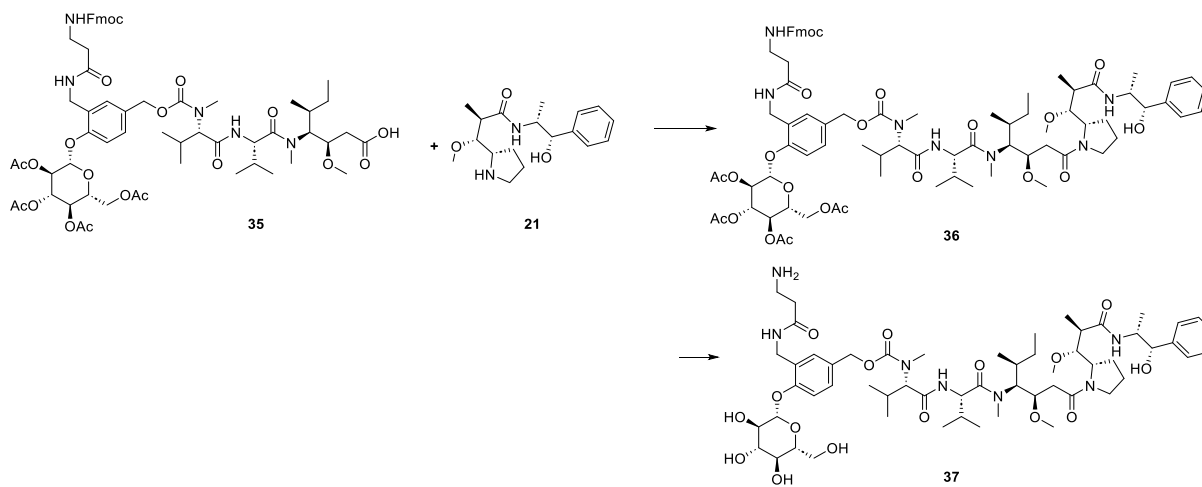
Intermedio 35



El **Intermedio 34** (1,5 g, 1,47 mmol), el **Intermedio 28** (0,741 g, 1,61 mmol) en THF (7 ml) y NaHCO_3 (7,00 ml) se agitaron a 25 °C durante 3 horas. El solvente se eliminó a presión reducida. La mezcla de reacción se acidificó con 2 M de HCl. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa, Columna: Columna Xselect CSH Prep C18

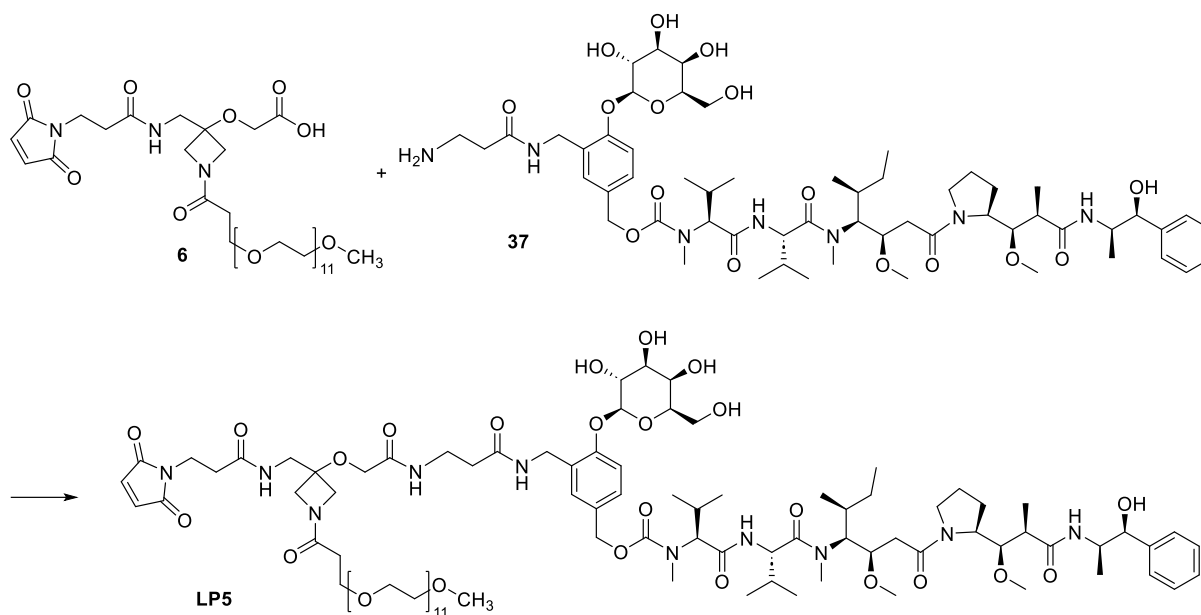
5 OBD, 30*150 nm, 5 μm ; Fase móvil A: Agua (0,1 % de FA), Fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 60 ml/min ml/min; Gradiente: 5 % de B a 5 % de B en 1,5 min, 5 % de B a 54 % de B en 2 min, 54 % de B a 59 % de B en 10 min; Longitud de onda: 220 nm nm; RT1 (min): 9,6. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar ácido (5S,8S,11S,12R)-1-(3-((3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)metil)-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)-11-((S)-sec-butil)-5,8-diisopropil-12-metoxi-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**Intermedio 35**, 0,700 g, 39,2 %) como un sólido blanco. LCMS (3 min): 1,31 min; 1218 [M+H]⁺.

15 Intermedio 37



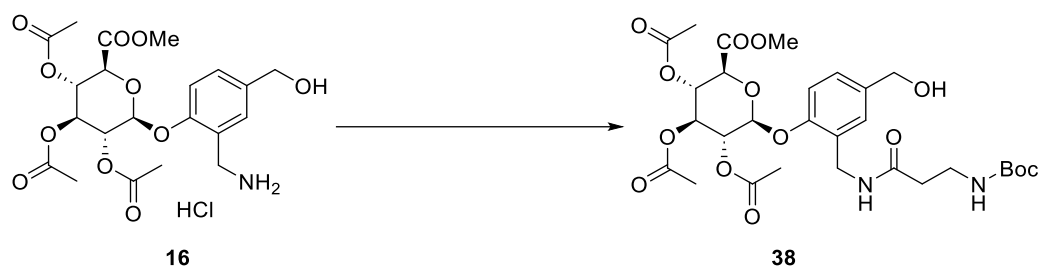
El **Intermedio 21**, (250 mg, 0,78 mmol) se disolvió en DMF seco (2 ml) seguido de la adición del **Intermedio 35** (300 mg, 0,25 mmol), hexafluorofosfato(V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (94 mg, 0,25 mmol) y N-etil-
 5 N-isopropilpropan-2-amina (214 μ l, 1,23 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 10 min, seguido de evaporación a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna (10 % de diclorometano: metanol, de 0 a 100 %). El **Intermedio 36** obtenido se disolvió en metanol (5 ml) seguido de la adición de carbonato de potasio (100 mg). La reacción se agitó durante 1 h a 25 °C seguido de
 10 evaporación a presión reducida. La mezcla de reacción cruda se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa (agua: acetonitrilo de 10 a 50 %) para proporcionar 3-((3-aminopropanamido)metil)-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)bencil ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato (**Intermedio 37**, 250 mg, 89 % de rendimiento más de etapas). LCMS (3 min): 1,36 min; 1131,8 [M+H]⁺, 1153,4 [M+Na]⁺.

Síntesis de LP5



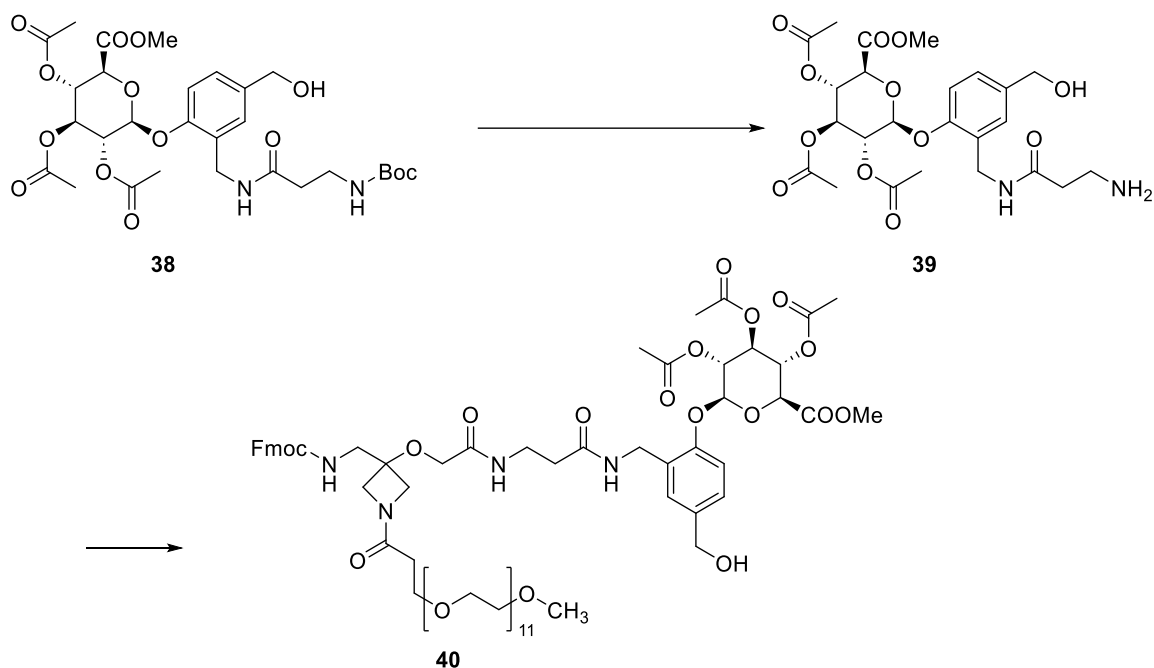
El **Intermedio 37**, (38,5 mg, 0,03 mmol) se disolvió en DMF seco (2 ml) seguido de la adición del **Intermedio 6** (15 mg, 0,02 mmol), hexafluorofosfato(V) de 2-(3H-

- 5 [1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (9,7 mg, 0,03 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (5,9 ul, 0,03 mmol). La reacción se agitó durante 10 min a 25 °C y después se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (0,1 % de ácido fórmico H₂O:acetonitrilo; de 10 a 50 % durante 10 min) para proporcionar 3-
10 ((3-(2-((3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidin-3-il)oxi)acetamido)propanamido)metil)-4-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)bencilo ((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)(metil)carbamato (**LP5**, 10,3 mg, 30 % de
15 rendimiento). LCMS (15 min): 6,40 min; 998,4 [M+2H]²⁺, 1993,8 [M+H]⁺.

Intermedio 38

- 5 Se añadió 2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoato (2,72 g, 9,49 mmol) al **Intermedio 16** (4 g, 7,91 mmol), DIEA (2,76 ml, 15,81 mmol) en DCM (40 ml) a 25 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua (25 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml), la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar el
- 10 líquido amarillo pálido. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de elución de 0 a 40 % de THF en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanamido)metil)-4-(hidroximetil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 38**,
- 15 3,90 g, 77 %) como un líquido amarillo pálido. LCMS (3 min): 1,05 min; 641 [M+H]⁺.

Intermedio 40



El **Intermedio 38** (58 mg, 0,09 mmol) se agitó en TFA (1 ml) a 0 °C durante un período de 2 horas para dar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((3-aminopropanamido)metil)-

4-(hidroximetil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 39**)

que se usó en el siguiente sin purificación adicional. Al **Intermedio 5** (88 mg, 0,09 mmol) y HATU (52,8 mg, 0,14 mmol) en DMA (3 ml) se añadió DIEA (0,048 ml,

0,28 mmol) a 25 °C durante un período de 10 minutos. Se añadió el **Intermedio 39**

(50 mg, 0,09 mmol) después de que la reacción se hubiera agitado durante 10 minutos.

La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 horas. La solución de reacción se purificó mediante cromatografía ultrarrápida C18 ultrarrápida, gradiente de elución de 0

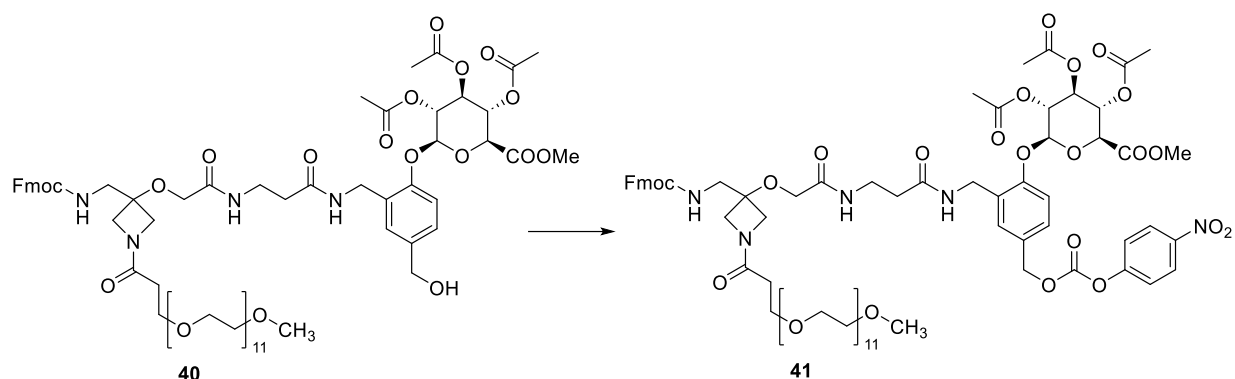
a 100 % de MeCN en agua (0,1 % de FA). Las fracciones puras se evaporaron a

sequedad para proporcionar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((3-(2-((3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-

dodecaoxaocotriacontan-38-ilo)azetidín-3-il)oxi)acetamido)propanamido)metil)-4-

(hidroximetil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 40**, 1,600 g, 39,1 %) como un sólido blanco.

Intermedio 41



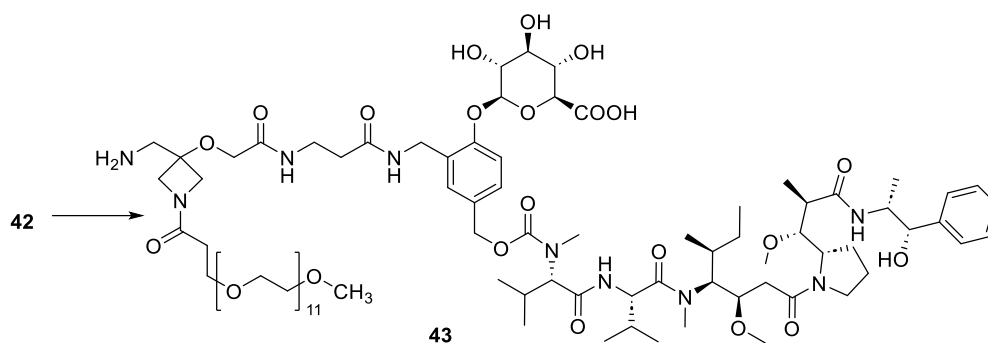
El **Intermedio 40** (1,8 g, 1,22 mmol) y carbonato de bis(p-nitrofenil) (1,484 g, 4,88 mmol) en MeCN (10 ml) se añadió DIEA (0,852 ml, 4,88 mmol). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 horas. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (0,1 % de FA, de 60 a 90 % de MeOH en agua) como eluyentes. Las fracciones que contienen el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de(2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((3-(2-((3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidín-3-il)oxi)acetamido)propanamido)metil)-4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 41**, 1,132 g, 56,6 %) como un sólido amarillo. LCMS (3 min): 1,42 min; 1640 [M+H]⁺

10

15

Intermedio 42

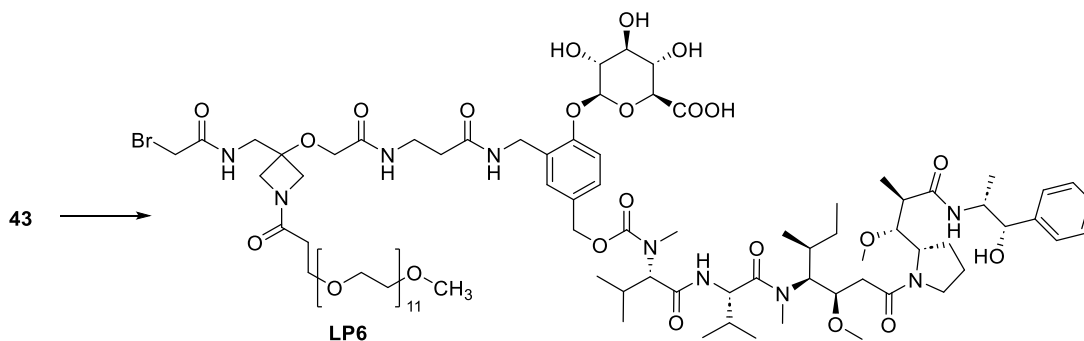
Intermedio 43



El **Intermedio 42** (474 mg, 0,21 mmol) se disolvió en metanol (10 ml) seguido de la adición de una solución de carbonato de potasio (0,243 ml, 4,27 mmol) en agua (5 ml).

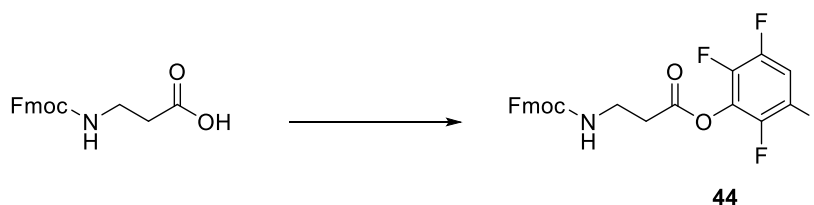
- 5 Después de 3 h de agitación a 25 °C, la reacción se purifica mediante cromatografía de fase inversa (0,1 % de FA, 30 g, de 5 a 35 % en 35 CV) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((3-(2-((3-(aminometil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidín-3-il)oxi)acetamido)propanamido)metil)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-(((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**Intermedio 43**, 294 mg, 74 %).

LP6



El **Intermedio 43** (294 mg, 0,16 mmol) se disolvió en DMF (5 ml) seguido de la adición de 2-bromoacetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il (44,8 mg, 0,19 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0,138 ml, 0,79 mmol). Después de 10 minutos, la reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa (0,1 % de FA, de 15 a 60 en 15 minutos) para proporcionar (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((3-(2-((3-(2-bromoacetamido)metil)-1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxaoctatriacontan-38-ol)azetidín-3-il)oxi)acetamido)propanamido)metil)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butyl)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**LP6**, 150 mg, 80 %) LCMS (15 min): 6,71 min; 1978[M+2H]⁺

Intermedio 44

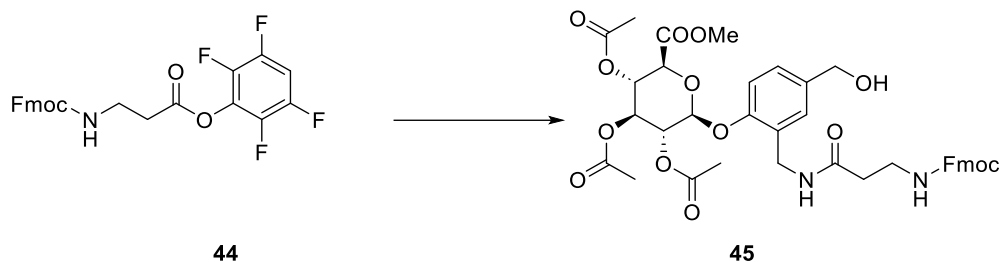


Se añadió 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida (1,197 g, 7,71 mmol) a 2,3,5,6-tetrafluorofenol (1,280 g, 7,71 mmol) y ácido 3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoico (2 g, 6,42 mmol) en DCM (20 ml) a 25 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se inactivó con hielo (5 ml), se extrajo con DCM (3 x 5 ml), la capa orgánica se secó sobre

Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar 2,3,5,6-tetrafluorofenil 3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoato (**Intermedio 44**, 1,500 g, 50,8 %) como sólido blanco. LCMS (3 minutos): 1,35 min; 460 [M+H]⁺

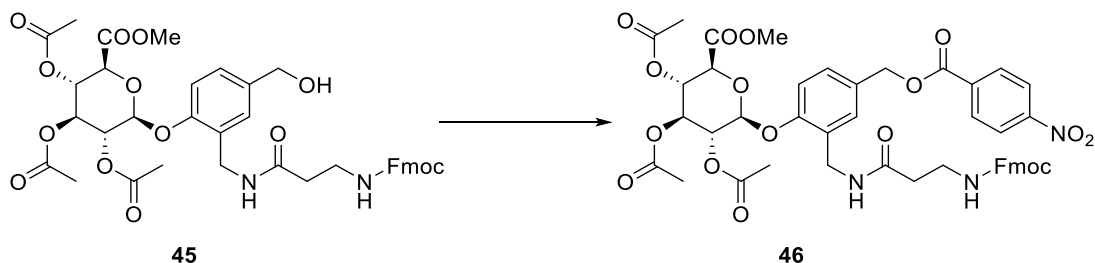
Intermedio 45

5



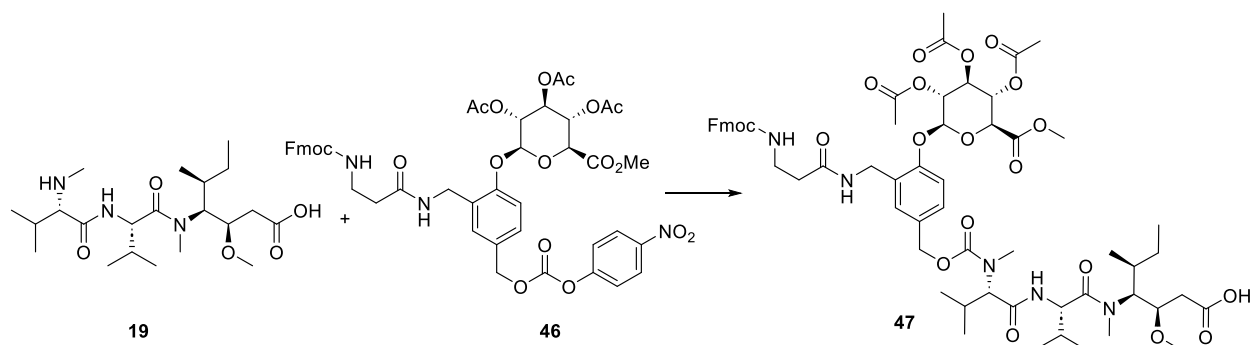
Se añadió bicarbonato de sodio (1,097 g, 13,06 mmol) al **Intermedio 44** (2 g, 4,35 mmol) e **Intermedio 16** (1 g, 2,13 mmol) en THF (2 ml) y agua (2 ml) a 25 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 2 M de HCl. El solvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida C18, gradiente de elución de 0 a 50 % de MeCN en agua. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((3-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)metil)-4-(hidroximetil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 45**, 2,20 g, 66,3 %) como un sólido blanco. m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 763; base, HPLC tR = 1,167 min

Intermedio 46



Se añadió DIEA (0,412 ml, 2,36 mmol) al **Intermedio 45** (600 mg, 0,79 mmol) y carbonato de bis(4-nitrofenil) (239 mg, 0,79 mmol) en THF (5 ml) a 25 °C. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua (5 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 5 ml), la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar el sólido amarillo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en sílice, gradiente de elución 0 a 70 % de EtOAc en éter de petróleo. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)metil)-4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 46**, 590 mg, 81 %) como un sólido blanco. m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 928; base, HPLC tR = 1,279 min

Intermedio 47



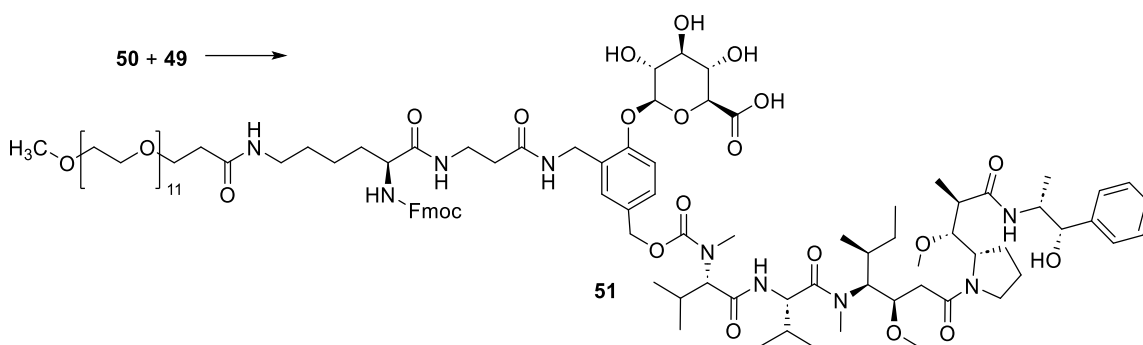
El **Intermedio 46** (1,8 g, 1,94 mmol) se añadió a 2-hidroxipiridina-N-óxido (0,237 g, 2,13 mmol), DIEA (1,016 ml, 5,82 mmol) e **Intermedio 19** (0,887 g, 2,13 mmol) en DMA (20 ml) a 25 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 1 hora. El solvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa Columna: Columna Xselect CSH Prep C18 OBD, 30*150 nm, 5 µm; Fase móvil A: Agua (0,1 % de FA), Fase móvil B: ACN; velocidad de flujo: 60 ml/min ml/min; Gradiente: 5 % de B a 5 % de B en 2 min, 5 % de B a 55 % de B en 2,5 min, 55 % de B a 60 % de B en 10 min; Longitud de onda: 254 nm/220 nm nm; RT1 (min): 11. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar ácido (5S,8S,11S,12R)-1-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)metil)-4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)-11-((S)-sec-butil)-5,8-diisopropil-12-metoxi-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oico (**Intermedio 47**, 1,180 g, 50,5 %) como un sólido blanco. m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 1204; ácido, HPLC tR = 1,842 min

Intermedio 49

El **Intermedio 21** (150 mg, 0,47 mmol) se disolvió en DMF (2 ml) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (1 ml). Se añadió una solución de **Intermedio 47** (175 mg, 0,15 mmol), hexafluorofosfato(V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (148 mg, 0,39 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (200 ul) en DMF (2 ml) a la reacción anterior y se dejó agitar a 25 °C durante 1 h. La reacción se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna (diclorometano: metanol, de 0 a 5 %). El **intermedio 48** se disolvió en metanol (4 ml) seguido de la adición de carbonato potásico (150 mg) en agua (1 ml). La reacción se dejó agitando a 25 °C durante la noche, después se concentró a presión reducida y se redisolvió en DMF (2 ml) y dietilamina (1 ml). Después de 10 minutos, la reacción se purificó mediante cromatografía de fase inversa (0,1 % de ácido fórmico, de 5 a 40 % de agua:acetonitrilo) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((3-

aminopropanamido)metil)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**Intermedio 49**, 190 mg, 35 % en 2 etapas). LCMS (3 min): 1,43 min; 1145,4 [M+H]⁺

Intermedio 51



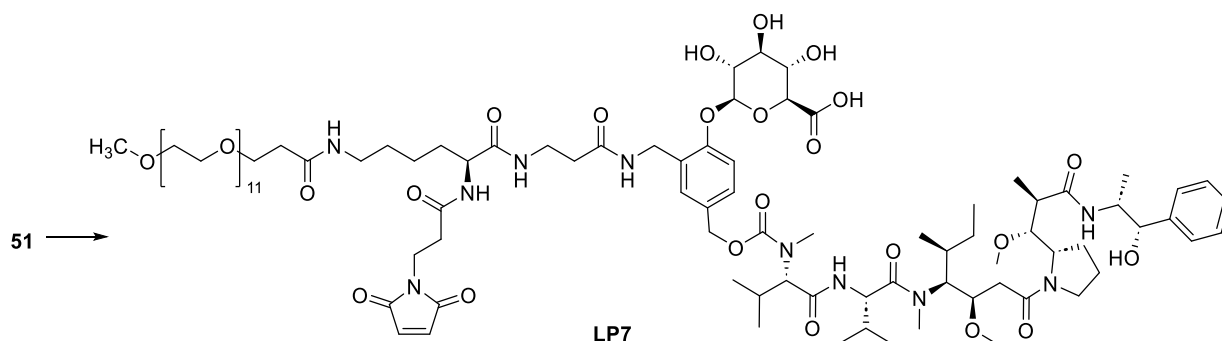
- El **intermedio 50** se sintetizó como se describió previamente WO2022170002 A1. El ácido (S)-44-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-38-oxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39-azapentatetracontan-45-oico (**50**, 234 mg, 0,25 mmol) se disolvió en DMF (2 ml) seguido de la adición de hexafluorofosfato (V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (60 mg, 0,16 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (87 ul, 0,50 mmol). Después de 10 minutos, se añadió el **Intermedio 49** (190 mg, 0,17 mmol) y la reacción se agitó a 25 °C durante 10 minutos. La reacción cruda se purificó mediante cromatografía de fase inversa (0,1 % de ácido fórmico, agua: acetonitrilo, de 5 a 75 %) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-(((9H-fluoren-9-

il)metoxi)carbonil)amino)-38,45,49-trioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-
 39,46,50-triazahenpentacontan-51-il)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-((S)-
 2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-
 oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-
 5 4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico

(Intermedio 51, 110 mg, 32 % de rendimiento). LCMS (3 min): 1,92 min; 2066,4

[M+H]⁺, 2088,8 [M+Na]⁺

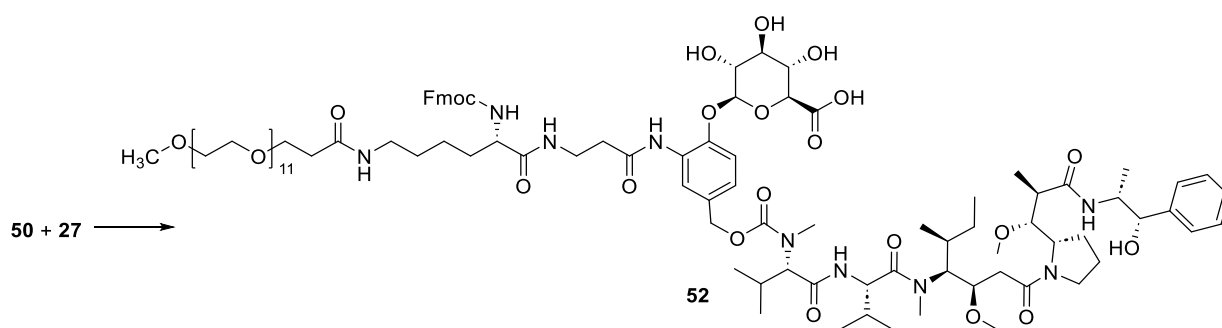
Síntesis LP7 (Referencia)



El **Intermedio 51** (110 mg, 0,05 mmol) se disolvió en DMF (2 ml) y dietilamina (2 ml).
 Después de 10 minutos, la reacción se concentró a presión reducida y se secó
 completamente a alto vacío. El residuo se disolvió en DMF (2 ml) seguido de la adición
 15 de 2,5-dioxipirrolidin-1-il 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoato (15 mg,
 0,05 mmol). Después de 10 minutos, la reacción se concentró y se purificó mediante
 HPLC preparativa (0,1 % de ácido fórmico, agua: acetonitrilo de 10 a 40 %) para
 proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-
 ((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-

oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-4,7,10-triazatetradecil)-2-((S)-44-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-38,45,49-trioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,46,50-triazahenpentacontan-51-il)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (**LP7**,
 5 26,6 mg, 25 % de rendimiento). LCMS (15 min): 6,70 min; 998,4 [M+2H]²⁺

Intermedio 52

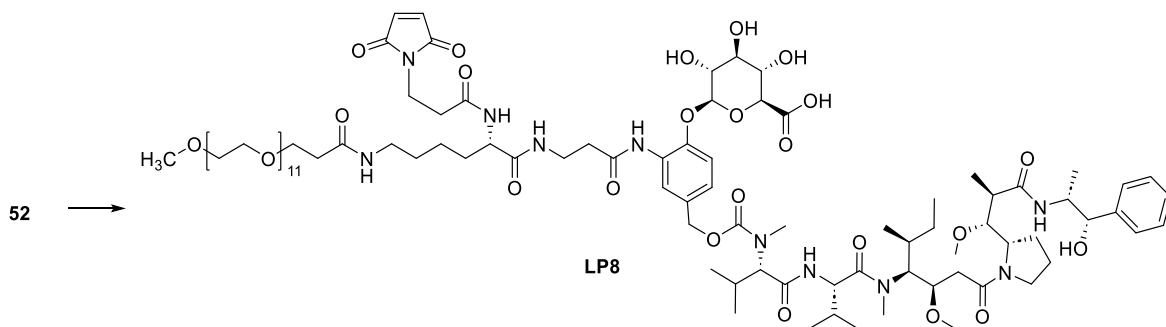


- 10 El **Intermedio 50** (125 mg, 0,13 mmol) se disuelve en DMF seco (2 ml) seguido de la
 adición de hexafluorofosfato(V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-3-il)-1,1,3,3-
 tetrametilisouronio (47,9 mg, 0,13 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (35 ul,
 0,20 mmol). Después de 10 minutos, se añadió el **Intermedio 27** (75 mg, 0,07 mmol).
 La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se purificó
 15 mediante cromatografía de fase inversa (0,1 % de ácido fórmico, agua: acetonitrilo de 5
 a 75 %) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-(((9H-fluoren-9-
 il)metoxi)carbonil)amino)-38,45-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-
 39,46-diazanonatetracontan-49-amido)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-(2-
 ((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-
 20 oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-

4,7,10-triazatetradecil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico

(**Intermedio 52**, 20 mg, 11 % de rendimiento). LCMS (15 min): 7,59 min; 2050,4 [M-H]-

Síntesis LP8 (Referencia)



El **Intermedio 52** (20 mg, 0,00975 mmol) se disolvió en DMF (2 ml) y dietilamina (2 ml).

Después de 10 minutos, la reacción se concentró a presión reducida y se secó

completamente a alto vacío. El crudo se disolvió en DMF seco (5 ml) seguido de la

adición de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoato

(3 mg, 0,010 mmol). Después de 10 minutos, la reacción se concentró y se purificó

mediante HPLC preparativa (0,1 % de ácido fórmico, agua: acetonitrilo de 5 a 55 %)

para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-butil)-12-

(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-

oxopropil)pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-5,8-diisopropil-4,10-dimetil-3,6,9-trioxo-2,13-dioxa-

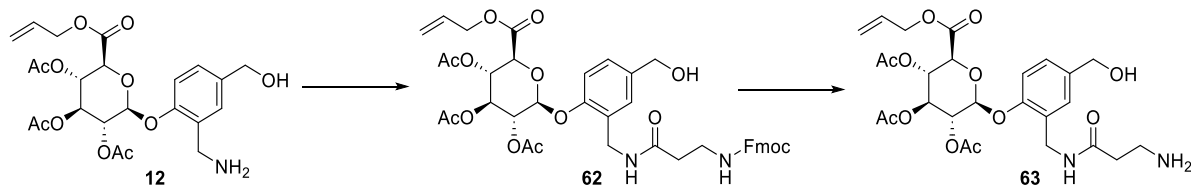
4,7,10-triazatetradecil)-2-((S)-44-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-

38,45-dioxo-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-dodecaoxa-39,46-diazanonatetracontan-

49-amido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (**LP8**, 2,1 mg, 11 % de

rendimiento). LCMS (15 min): 6,68 min; 1980,7 [M]+

Intermedio 63



Etapas 1

- 5 A un reactor agitado que contenía el **Intermedio 12** (2,1 kg, 90,5 % en peso, 3,57 mol) y acetonitrilo (19 l) se le añadió Fmoc-β-alanina (1,11 kg, 3,57 mol). La mezcla agitada se enfrió a 0 °C. A esto se le añadió hexafluorofosfato de azabenzotriazol tetrametil uronio (1,36 kg, 3,57 mol) y N,N-diisopropiletilamina (0,92 kg, 7,14 mol), y se agitó durante 4 horas, manteniendo la temperatura en 0 °C. Se añadió agua (19 l) y acetato de etilo (19 l) a la mezcla agitada. La fase orgánica se separó y se concentró a ~19 l al vacío. Se añadió acetato de etilo (28,5 l) a la solución concentrada y se agitó a 20-25 °C durante 18 horas. La suspensión resultante se filtró, la torta se lavó con acetato de etilo (3,87 l), y se secó al vacío hasta triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-((3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)metil)-4-(hidroximetil)fenoxi)-6-((aliloxi)carbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (**Intermedio 62**, 1,6 kg, 99 % en peso, 56 %). LCMS m/z 789 [M+H]⁺
- 10
- 15

Etapas 2

- A un reactor agitado que contenía el **Intermedio 62** (1 kg, 1,27 mol) y tetrahidrofurano (10 l) a -45 °C bajo nitrógeno se añadió 2,3,4,6,7,8,9,10-octahidropirimido[1,2-a]azepina (385,98 g, 2,54 mol). La mezcla se agitó a -45 °C durante cuatro horas, se diluyó después con acetonitrilo (5 l) y se inactivó mediante la adición de cloruro de hidrógeno
- 20

en solución de éter terc-butilmetílico (2,54 l, 2,0 M, 5,07 mol). La mezcla se concentró a ~5 l al vacío, y se diluyó con n-heptano (5 l). Se recogió la capa de acetonitrilo que contenía triacetato de (2S,3S,4S,5R,6S)-2-((aliloxi)carbonil)-6-(2-((3-aminopropanamido)metil)-4-(hidroximetil)fenoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo

- 5 **(Intermedio 63**, 3,88 kg de solución de MeCN, área 89,97 %, supuesto 100 %). LCMS m/z 566,6 [M+H]⁺

Síntesis alternativa de LP2

Información general para la síntesis alternativa de LP2

- 10 La cromatografía ultrarrápida se realizó usando una BIOTAGE ISOLERA y se comprobó la pureza de las fracciones mediante cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés). La TLC se realizó usando gel de sílice MERCK KIESELGEL 60 F254, con indicador fluorescente en placas de aluminio. La visualización de TLC se realizó con luz UV.

- 15 Los solventes de extracción y cromatografía se adquirieron de VWR U.K. y se usaron sin purificación adicional.

Todas las sustancias químicas finas se adquirieron de SIGMA-ALDRICH a menos que se indique de cualquier otra manera.

Los reactivos pegilados se obtuvieron de QUANTA BIODESIGN US a través de

- 20 STRATECH UK.

Condiciones de LC/MS para la Síntesis Alternativa de LP2

La espectrometría de masas por electropulverización en modo positivo se realizó usando un WATERS ACQUITY H-CLASS SQD2 usando uno de los siguientes métodos.

La HPLC (WATERS ALLIANCE 2695) se ejecutó usando una fase móvil de agua (A)

5 (0,03 % de TFA) y acetonitrilo (B) (0,03 % de TFA).

LCMS 16,0 min: La composición inicial 5 % de B aumentó a 25 % de B en un período de 3 minutos. La composición se incrementó entonces a 30 % de B durante un período de 5 minutos, seguido de un aumento a 95 % de B durante un período de 4 minutos. La composición se mantuvo durante un minuto a 95 % de B, se regresó después a 5 % de
10 B en 10 segundos y se mantuvo allí durante 2 minutos 50 segundos. La duración total del gradiente fue 16,0 minutos. La velocidad de flujo fue 0,40 ml/minuto. Rango de detección de longitud de onda: 210 nm. Columnas: WATERS ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1*100 mm a 40 °C.

LCMS 16,5 min: La composición inicial de 10 % de B se mantuvo durante 25 segundos,
15 se aumentó después de 5 % de B a 90 % de B durante un período de 11 minutos 35 segundos. La composición se mantuvo durante 70 segundos a 90 % de B, se regresó después a 5 % de B en 10 segundos y se mantuvo allí durante 3 minutos. La duración total del gradiente fue 16,5 minutos. La velocidad de flujo fue 0,40 ml/minuto. Rango de detección de longitud de onda: 210 a 220 nm. Columnas: WATERS ACQUITY UPLC
20 BEH C18 1,7 μ m, 2,1*100 mm a 40 °C.

LCMS 26,0 min: La composición inicial 10 % de B aumentó a 30 % de B durante un período de 5 minutos, seguido de aumentar a 35 % de B durante un período de 15 minutos. La composición se incrementó a 90 % de B durante un período de 2 minutos,

se mantuvo durante 1 minuto a 90 % de B, después se regresó a 10 % de B en 10 segundos y se mantuvo allí durante 2 minutos y 50 segundos. La duración total del gradiente fue 26,0 minutos. La velocidad de flujo fue 0,40 ml/minuto. Rango de detección de longitud de onda: 210 nm. Columnas: WATERS ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1*100 mm a 40 °C.

LCMS 30,0 min: La composición inicial 10 % de B aumentó de 45 % de B durante un período de 5 minutos. La composición se incrementó a 47 % de B durante 15 minutos, después se aumentó a 95 % de B durante 5 minutos. La composición se mantuvo durante a 95 % de B durante 2 minutos, se regresó después a 10 % de B en 10 segundos y se mantuvo allí durante 2 minutos 50 segundos. La duración total del gradiente fue 30 minutos. La velocidad de flujo fue 0,40 ml/minuto. Rango de detección de longitud de onda: 210 nm. Columnas: WATERS ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1*100 mm a 55 °C.

LCMS 31,0 min: La composición inicial 10 % de B aumentó de 45 % de B durante un período de 5 minutos. La composición se incrementó a 50 % de B durante 20 minutos, después se aumentó a 90 % de B durante 2 minutos. La composición se mantuvo durante a 90 % de B durante 1 minuto, se regresó después a 10 % de B en 10 segundos y se mantuvo allí durante 2 minutos 50 segundos. La duración total del gradiente fue 31 minutos. La velocidad de flujo fue 0,40 ml/minuto. Rango de detección de longitud de onda: 210 nm. Columnas: WATERS ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1*100 mm a 40 °C.

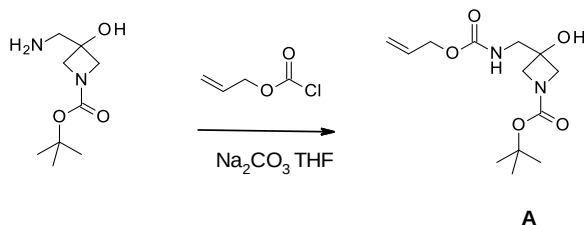
LCMS 31,0 min: La composición inicial 10 % de B aumentó de 45 % de B durante un período de 20 minutos. La composición se incrementó a 95 % de B durante 5 minutos,

se mantuvo en 95 % de B durante 2 minutos, después disminuyó a 5 % de B en 10 segundos y se mantuvo allí durante 2 minutos 50 segundos. La duración total del gradiente fue 31 minutos. La velocidad de flujo fue 0,40 ml/minuto. Rango de detección de longitud de onda: 210 nm. Columnas: WATERS ACQUITY UPLC CSH Fenil-Hexil
 5 1,7 μ m, 2,1*100 mm a 40 °C.

Método de NMR para la síntesis alternativa de LP2

Los valores de desplazamiento químico de NMR de protones se midieron en la escala delta a 300 MHz o 400 MHz usando un BRUKER AV400. Se han usado las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; quin, quinteto; m, múltiplo; br,
 10 amplio. Las constantes de acoplamiento se reportan en Hz.

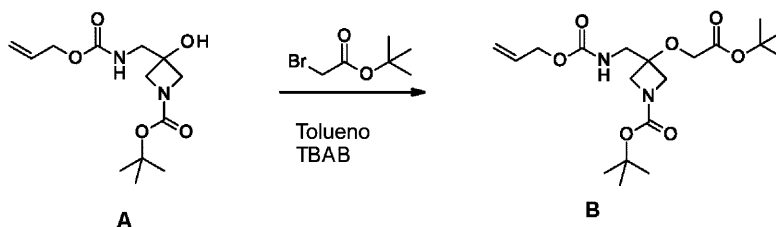
Intermedio A



15 A un reactor agitado que contenía 3-(aminometil)-3-hidroxi-azetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (290 g, 1,0 eq., 1,48 mol) y cloroformiato de alilo (214 g, 1,2 eq., 1,78 mmol) en tetrahidrofurano (2,90 l) se añadió carbonato de sodio (234 g, 1,5 eq., 2,22 mol). El contenido del reactor se agitó a 25 °C durante 2 horas. Se añadió agua (2,90 l) al reactor, y la mezcla resultante se extrajo dos veces con acetato de etilo (2,90 L X 2). La
 20 capa orgánica combinada se lavó con salmuera (2,90 l) y después se concentró a presión reducida hasta un volumen de 15 ml. Se añadió MTBE (25 ml) y después la

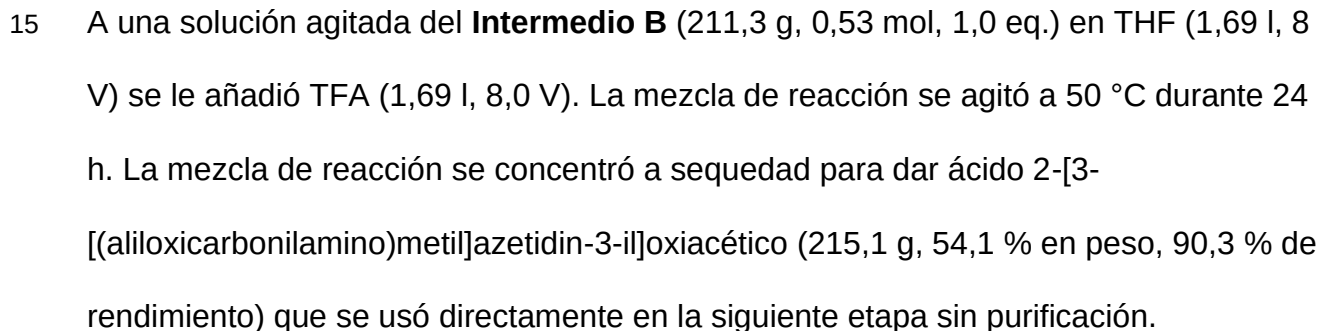
reacción se concentró a 15 ml. Se añadió MTBE adicional (1,45 l) y la reacción se concentró nuevamente hasta 15 ml. Se añadió MTBE (1,45 L) y la mezcla se agitó durante 4 h a 25 °C. El sólido formado se recogió mediante filtración, se lavó con MTBE (580 ml) y se secó al vacío a 45 °C para dar 3-[(aliloxycarbonilamino)metil]-3-hidroxi-azetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo, **Intermedio A** como un sólido (301 g, 98,9 % en peso, 70,1 % de rendimiento); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,37 (s, 9 H) 3,15 (d, J=6,10 Hz, 2 H) 3,50 - 3,65 (m, 2 H) 3,81 (br d, J=8,54 Hz, 2 H) 4,48 (br d, J=5,19 Hz, 2 H) 5,16 (dd, J=10,38, 1,53 Hz, 1 H) 5,27 (dd, J=17,24, 1,68 Hz, 1 H) 5,75 (s, 1 H) 5,90 (ddt, J=17,17, 10,60, 5,19, 5,19 Hz, 1 H) 7,40 (t, J=6,26 Hz, 1 H) LCMS (ESI) m/z 287 (M + H)⁺.

Intermedio B



A un reactor agitado que contenía el Intermedio A (100,0 g, 0,35 mol, 1,0 eq.) se añadió TBAB (20,0 g, 0,06 mol, 20 % en peso), y NaOH (15,37 g, 0,38 mol, 1,1 eq.) en tolueno (1 L, 10 V) a 5 °C se añadió bromoacetato de *terc*-butilo (81,7 g, 0,42 mol, 1,2 eq.) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 16 horas. Se añadió agua (500 ml, 5 V) al reactor y se agitó durante 5 min. Las capas se dejaron separar y la capa acuosa se desechó. La capa orgánica se lavó con salmuera dos veces (2 X 5 V, 10 %) y después se concentró hasta sequedad. Se añadió MTBE (200 ml, 2 V) al

Intermedio D



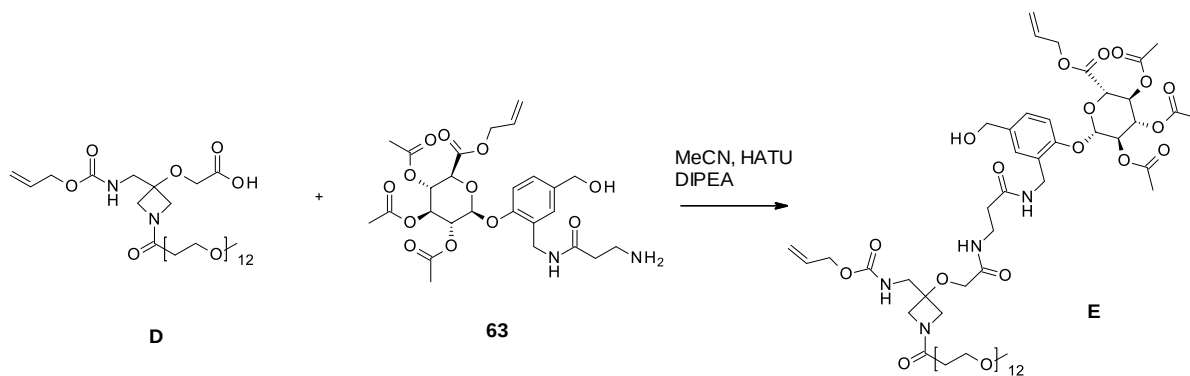
A una solución agitada de ácido 2-[3-[(aliloxicarbonilamino)metil]azetidin-3-il]oxiacético (203,3 g, 54,1 % en peso) en THF (1,1 L, 10 V) a 5 °C se añadió MPEG11-NHS (308,9 g, 0,45 mol, 1,0 eq.) y Na₂CO₃ (143,2 g, 1,35 mol, 3,0 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 25 °C. El solvente se eliminó al vacío y se añadieron

5 agua (1,1 l, 10 V) y MTBE (1,1 l, 10 V) al residuo. La capa orgánica se separó y se desechó. La capa acuosa se lavó dos veces con MTBE (1,1 l x 2, 10 V x 2); Se observa el producto en la fase acuosa. El pH de la fase acuosa se ajustó a 3-4 mediante la adición de HCl (1 M, 66 ml, ~0,6 V) La fase acuosa se extrajo cuatro veces con EtOAc (1,1 l x 4, 10 V x 4); Se observa el producto ahora en fase orgánica. Las capas

10 orgánicas combinadas se concentraron a sequedad al vacío para dar 2-[3-[(aliloxicarbonilamino)metil]-1-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]azetidin-3-il]oxiacético, **Intermedio D** como un aceite (349,1 g, 80,0 % en peso, 76,1 % de rendimiento); ¹H NMR (500 MHz, CLOROFORMO-d) δ ppm 2,29 - 2,41 (m, 2 H) 3,34

15 (s, 3 H) 3,41 (s, 1 H) 3,41 - 3,63 (m, 44 H) 3,64 - 3,77 (m, 4 H) 3,82 (br d, J=10,99 Hz, 1 H) 3,92 (br d, J=10,99 Hz, 1 H) 4,01 - 4,17 (m, 4 H) 4,52 (br d, J=5,49 Hz, 2 H) 5,17 (br d, J=10,38 Hz, 1 H) 5,22 - 5,29 (m, 1 H) 5,87 (ddt, J=16,78, 10,91, 5,53, 5,53 Hz, 1 H) 6,05 (br t, J=5,80 Hz, 1 H); LCMS (ESI) m/z 815,1 (M + H)⁺.

Intermedio E



A una solución agitada del **Intermedio D** (62,5 g, 80,0 % en peso, 0,06 mol, 1,0 eq) e **Intermedio 63** (566,6 g, 0,06 mol, 1,05 eq.) en MeCN (500 ml, 10 V) a 0 °C se le
 5 añadió HATU (34,2 g, 0,09 mol, 1,5 eq.) y DIPEA (23,3 g, 0,18 mol, 3,0 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min, después se cargó agua (500 ml, 10 V). Las capas se separaron y ambas se retuvieron. La fase acuosa se extrajo con DCM (500 ml X 2, 10 V X 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con salmuera (500 ml X 2, 10 V X 2) y después se concentraron a sequedad al vacío a 30-40 °C para
 10 dar alilo (2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[[3-[[2-[3-[(aliloxicarbonilamino)metil]-1-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]azetidín-3-il]oxiacetil]amino]propanoilamino]metil]-4-(hidroximetil)fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato, **Intermedio E** como un aceite (56,3 g, 81,2 % en peso, 54,6 % de

15 rendimiento); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) 1,21 - 1,31 (m, 1 H) 1,99 (d, J=7,32 Hz, 6 H) 2,05 (s, 3 H) 2,29 (t, J=6,41 Hz, 2 H) 2,35 - 2,44 (m, 2 H) 3,24 (s, 3 H) 3,27 - 3,49 (m, 41 H) 3,56 - 3,66 (m, 2 H) 3,71 - 3,81 (m, 2 H) 3,87 - 4,00 (m, 3 H) 4,05 - 4,12 (m, 2 H) 4,18 - 4,25 (m, 1 H) 4,41 (d, J=4,88 Hz, 2 H) 4,47 - 4,56 (m, 3 H) 4,60 - 4,68 (m, 1 H) 4,76 (d, J=10,07 Hz, 1 H) 5,08 - 5,19 (m, 4 H) 5,23 - 5,35 (m, 3 H) 5,48 (t, J=9,61 Hz, 1

il]oxiacetil]amino]propanoilamino]metil]-4-[(4-

nitrofenoxi)carboniloximetil]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato, **Intermedio F**, como un

aceite (40,8 g, 76,0 % en peso, 85,2 % de rendimiento; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6)

δ ppm) 1,96 - 2,09 (m, 9 H) 2,21 - 2,35 (m, 2 H) 2,36 - 2,47 (m, 2 H) 3,24 (s, 3 H) 3,25 -

5 3,50 (m, 43 H) 3,55 - 4,00 (m, 8 H) 4,05 - 4,15 (m, 2 H) 4,16 - 4,29 (m, 1 H) 4,44 - 4,67

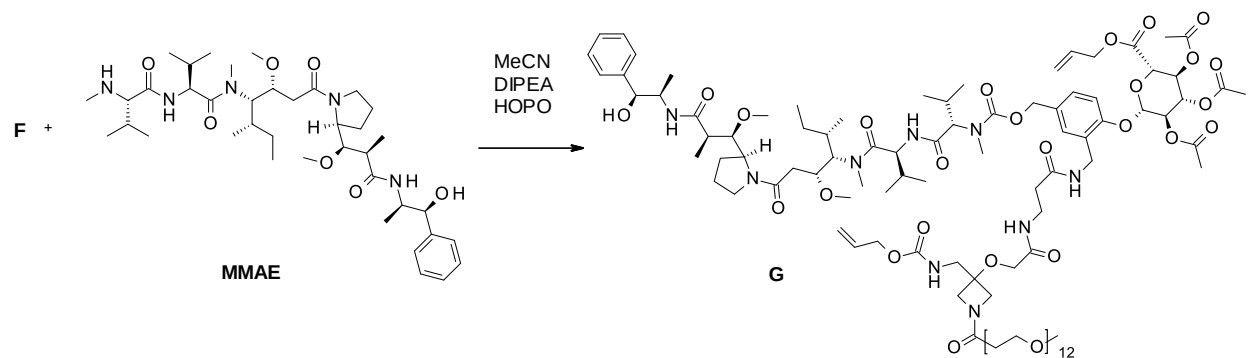
(m, 4 H) 4,80 (d, $J=9,96$ Hz, 1 H) 5,08 - 5,37 (m, 8 H) 5,44 - 5,57 (m, 1 H) 5,65 (d,

$J=7,81$ Hz, 1 H) 5,80 - 5,98 (m, 2 H) 7,11 (d, $J=8,44$ Hz, 1 H) 7,28 (s, 1 H) 7,37 (br d,

$J=8,44$ Hz, 1 H) 7,48 - 7,61 (m, 3 H) 7,92 (br t, $J=5,56$ Hz, 1 H) 8,26 - 8,37 (m, 3 H));

LCMS (ESI) m/z 764,6 ($M + 2H$) $^{2+}$.

10 Intermedio G



A una mezcla agitada del **Intermedio F** (39,5 g, 76,0 % en peso, 20 mmol, 1,0 eq.), y

15 MMAE (12,8 g, 24 mmol, 1,2 eq) en MeCN (20 V) a 25 °C se añadió DIPEA (4,4 g,

34 mmol, 1,7 eq.) gota a gota, seguido de HOPO (3,8 g, 34 mmol, 1,7 eq.). La mezcla

de reacción se agitó durante 7 h a 25 °C. La reacción se enfrió a 10 °C y después se

cargó NaCl (15 % ac., 300 ml, 10 V). El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 3-6

mediante la adición de HCl (1M, 9 ml, 0,6 V) a 10 °C. Las capas se dejaron separar y la

capa acuosa se desechó. La capa orgánica se concentró a 3-5 V para dar alilo

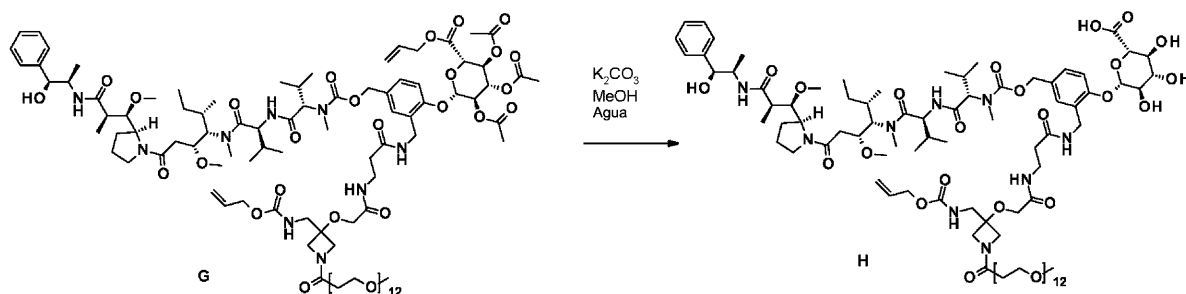
(2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triacetoxi-6-[2-[[3-[[2-[3-[(aliloxicarbonilamino)metil]-1-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-

metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]azetidin-3-

5 il]oxiacetil]amino]propanoilamino]metil]-4-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*,2*R*)-4-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-[[[(1*R*,2*S*)-2-hidroxi-1-metil-2-fenil-etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxo-propil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1*S*)-1-metilpropil]-4-oxo-butil]-metil-carbamoil]-2-metil-propil]carbamoil]-2-metil-propil]-metil-carbamoil]oximetil]fenoxi]tetrahidropiran-2-carboxilato, **Intermedio G**, como una solución de acetonitrilo (112,3 g, 31,6 % en peso, 85,8 % de rendimiento).

10 Una muestra se concentró a sequedad para dar un sólido blanco para su caracterización; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,72 - 0,94 (m, 18 H) 0,95 - 1,07 (m, 6 H) 1,30 (br s, 1 H) 1,44 - 1,60 (m, 2 H) 1,67 - 1,85 (m, 3 H) 1,95 - 2,02 (m, 6 H) 2,04 (s, 3 H) 2,05 - 2,14 (m, 2 H) 2,29 (br t, J=6,26 Hz, 3 H) 2,40 (br s, 3 H) 2,80 - 2,91 (m, 3 H) 2,97 (br s, 1 H) 3,00 - 3,09 (m, 1 H) 3,12 (br s, 2 H) 3,16 - 3,26 (m, 10 H) 3,28 -
15 3,36 (m, 3 H) 3,41 - 3,43 (m, 3 H) 3,50 (s, 43 H) 3,53 - 3,65 (m, 5 H) 3,71 - 3,82 (m, 3 H) 3,90 - 4,11 (m, 8 H) 4,16 - 4,30 (m, 2 H) 4,35 - 4,46 (m, 1 H) 4,46 - 4,54 (m, 4 H) 4,61 (br d, J=13,73 Hz, 2 H) 4,78 (br d, J=10,07 Hz, 2 H) 4,94 - 5,12 (m, 3 H) 5,15 - 5,19 (m, 2 H) 5,21 - 5,37 (m, 4 H) 5,41 - 5,53 (m, 2 H) 5,60 (br d, J=5,49 Hz, 1 H) 5,84 - 5,94 (m, 2 H) 7,04 (br d, J=5,19 Hz, 1 H) 7,13 - 7,23 (m, 3 H) 7,24 - 7,28 (m, 2 H) 7,29 -
20 7,32 (m, 2 H) 7,53 (br t, J=5,95 Hz, 1 H) 7,93 (br s, 2 H) 8,28 (br s, 1 H); LCMS (ESI) m/z 1054,1 (M + 2H)²⁺.

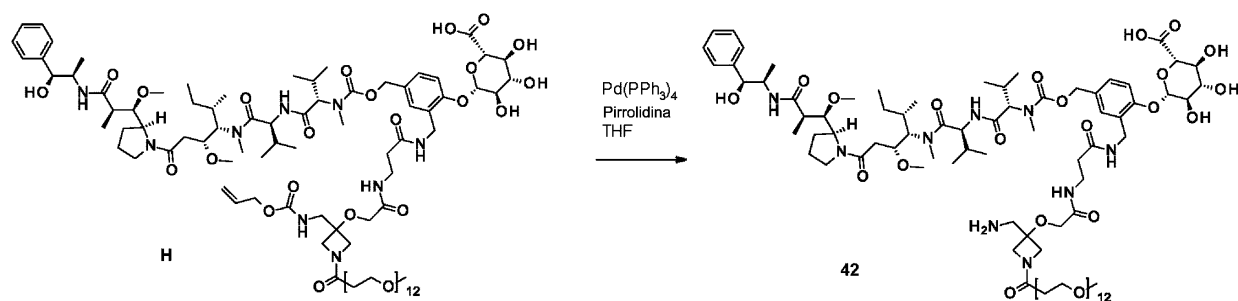
Intermedio H



Una solución agitada del **Intermedio G** (99 g, 31,6 en peso en MeCN, 14,9 mmol, 1,0 eq.) se concentró a sequedad. Se añadió MeOH (156 ml, 5 V) y la mezcla se concentró de nuevo hasta sequedad. El residuo se disolvió en MeOH (313 ml, 10 V) a 5 °C y a esta solución se añadió una solución de K₂CO₃ (313 ml, 0,35 M ac., 7,5 eq.). La solución se agitó durante 10 h a 23 °C, después se enfrió a 0 °C. Se añadió ácido cítrico (20 % ac., 250,4 ml, 8V) para ajustar el pH a 3-5. La mezcla de reacción se lavó con iPrOAc (2 x 313 ml; 2 x 10 V); Se observa que el producto estaba en la capa acuosa. La fase acuosa se purificó mediante HPLC de fase inversa para dar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-[[3-[[2-[3-[(aliloxicarbonilamino)metil]-1-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-metoxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]azetidin-3-il]oxiacetil]amino]propanoilamino]metil]- 4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1R,2S)-2-hidroxi-1-metil-2-fenil-etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxo-propil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxo-butil]-metil-carbamoil]-2-metil-propil]carbamoil]-2-metil-propil]-metil-carbamoil]oximetil]fenoxi]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico, **Intermedio H**, como un sólido (30,1 g, 77,6 % en peso, 81,0 % de rendimiento); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0,73 - 0,94 (m, 17 H) 0,95 - 1,06 (m, 6 H) 1,30 (br s, 1 H) 1,44 - 1,60 (m, 2 H) 1,67 - 1,85 (m, 3 H) 1,92 - 2,15 (m, 3 H)

15

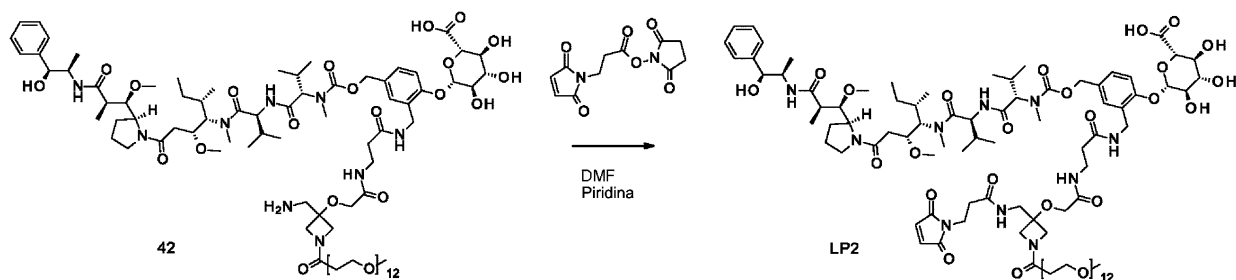
20



(2~{S},3~{S},4~{S},5~{R},6~{S})-6-[2-[[[3-[[2-[3-(aminometil)-1-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-

metoxietoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoil]azetidin-3-il]oxiacetil]amino]propanoilamino]metil]-4-[[[(1~{S})-1-[[[(1~{S})-1-[[[(1~{S},2~{R})-4-[(2~{S})-2-[(1~{R},2~{R})-3-[[[(1~{R},2~{S})-2-hidroxi-1-metil-2-fenil-etil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxo-propil]pirrolidin-1-il]-2-metoxi-1-[(1~{S})-1-metilpropil]-4-oxo-butil]-metil-carbamoil]-2-metil-propil]carbamoil]-2-metil-propil]-metil-carbamoil]oximetil]fenoxi]-3,4,5-trihidroxi-tetrahidropiran-2-carboxílico, **Intermedio 42**, como un sólido (13,0 g, 73,1 % en peso, 75,4 % de rendimiento).

LP2 (Síntesis Alternativa)



A una solución agitada del **Intermedio 42** (0,75 g, 404 μ Mol, 1,0 eq) y piridina (0,38 ml, 0,5 V) en DMF (7,51 ml, 10 V) a 25 °C se añadió (2,5-dioxopirrolidin-1-il) 3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoato (215 mg, 809 μ Mol, 2,0 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 25 °C y después se purificó directamente mediante HPLC. Las fracciones que contenían el compuesto diana se combinaron y aislaron mediante liofilización para dar **LP2** como un sólido (300 mg, 96,7 % en peso, 35,7 % de rendimiento).

Conjugación ADC

Procedimiento General (LP1-4, LP7 y LP8)

Se añadieron 2,5-3,5 equiv. de TCEP (10 mM en PBS pH 7,4, 1,25-1,60 nmol, 12,5 ml) a una solución del anticuerpo en regulador de reducción que contenía PBS y 1 mM de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA). La mezcla de reducción se dejó reaccionar a TA durante 2 horas con agitación suave. Se añadieron 5-10 equiv. de carga útil del enlazador (**LP**) (10 mM en DMA, 1-2 nmol, 80-160 ml) como una solución de DMA a la solución reducida de anticuerpo (5 mg/ml, 0,5 nmol), para una concentración final de DMA del 10 % (v/v). La solución resultante se mezcló durante 1 hora a temperatura ambiente. El DAR para el conjugado se evaluó en una muestra de reacción completamente reducida (1M de DTT, regulador de borato de sodio pH 8,5) usando un análisis UHPLC en un sistema SHIMADZU PROMINENCE usando una columna THERMO SCIENTIFIC MABPAC 50 mm x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo, medido a 214 nm (ver Tabla 1).

*Procedimiento para **LP6***

Se añadieron 3,5 equiv. de TCEP (10 mM en PBS pH 7,4, 1,65 nmol, 12,5 µl) a la solución de anticuerpo en regulador de reducción que contenía PBS y ácido 1 mM de etilendiaminetetraacético (EDTA). La mezcla de reducción se dejó reaccionar a TA durante 2 horas con agitación suave a 37 °C. El pH de la solución de anticuerpo reducido se ajustó a 8,5 usando 10 % v/v de TRIS 0,5M, a continuación se añadieron 13 equiv. de **LP6** (10 mM en DMSO, 2,5 nmol, 170 µl) a la solución de anticuerpo reducida (5 mg/ml, 0,5 nmol), para una concentración final de DMSO de 10 % (v/v). La solución resultante se mezcló durante la noche a temperatura ambiente. El DAR para el conjugado se evaluó en una muestra de reacción completamente reducida (1M de DTT, regulador de borato de sodio pH 8,5) usando un análisis UHPLC en un

sistema Shimadzu Prominence usando una columna Thermo Scientific MabPac 50 mm x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo, medido a 214 nm.

Tabla 1 - Conjugación ADC (LP1-4 y LP6-LP8)

ADC	mAb	TCEP equiv.	LP	LP equiv.	DAR (214 nm)
ADC1 (Control)	Herceptin-WT	2,6	LP1	6,5	4,0
ADC2	Herceptin-WT	3,2	LP2	5	3,7
ADC3	Herceptin-WT	2,5	LP3	10	3,6
ADC4	Herceptin-WT	2,5	LP4	10	3,8
ADC6	Herceptin-WT	3,5	LP6	13	4,2
ADC7 (Referencia)	Herceptin-WT	2,5	LP7	7,5	3,6
ADC8 (Referencia)	Herceptin-WT	2,5	LP8	7,5	3,7

5 Procedimiento para **LP5 (ADC5)**

La conjugación de **LP5** usando el anterior Procedimiento General dio un DAR que estaba por debajo de la memoria descriptiva (DAR 3,1). Por lo tanto, el proceso se repitió en una escala adicional de 8 mg usando el mismo protocolo excepto con 3,4 eq. de TCEP para reducción para generar mayor material DAR (DAR 5,3) el cual se agrupó para dar DAR ~ 4,0.

Escisión enzimática de la carga útil del enlazador

β -glucuronidasa

Se añadió β -glucuronidasa 4 nM a 40 μ M de carga útil del enlazador (1:10.000) en 50 mM de acetato de sodio, pH 5,0. La mezcla se incubó a 37 °C durante una duración de 24 horas con puntos de tiempo intermedios, se recogió y se diluyó 1:1 con regulador

que contenía acetonitrilo, agua y ácido fórmico. Se midió la muestra mediante HPLC de fase inversa con datos cuantificados contra una curva estándar.

Como se muestra en la Figura 1A, tanto **LP2** como **LP3** sufrieron escisión significativa en presencia de β -glucuronidasa. Como se muestra en la Figura 1E, **LP2** experimentó una escisión más lenta que tanto **LP7** (Referencia) como **LP8** (Referencia) en la presencia de β -glucuronidasa.

Catepsina B

Se añadió 0,14 pM de catepsina B a 70 pM de carga útil del enlazador (1:500) en 50 mM de acetato de sodio, 1 mM de DTT, pH 5,0. La mezcla se incubó a 37 °C durante una duración de 24 horas con puntos de tiempo intermedios, se recogió y se diluyó 1:1 con regulador que contenía acetonitrilo, agua y ácido fórmico. Se midió la muestra mediante HPLC de fase inversa con datos cuantificados contra una curva estándar.

Como se muestra en la Figura 1B, ni **LP2** ni **LP3** sufrieron escisión rápida en presencia de catepsina B.

Elastasa de neutrófilos humanos

Se añadió 0,67 μ M de elastasa de neutrófilos humanos a 67 μ M de carga útil del enlazador de (1:100) en solución salina regulada Tris, pH 7,4. La mezcla se incubó a 37 °C durante una duración de 24 horas con puntos de tiempo intermedios, se recogió y se diluyó 1:1 con regulador que contenía acetonitrilo, agua y ácido fórmico. Se midió la muestra mediante HPLC de fase inversa con datos cuantificados contra una curva estándar.

Como se muestra en la Figura 1C, **LP2** y **LP3** no se sometieron a escisión rápida en presencia de elastasa de neutrófilos humanos. **LP1** (control) sufrió una escisión más rápida en presencia de elastasa de neutrófilos humanos. Como se muestra en la Figura 1D, **LP2**, **LP7** (Referencia) y **LP8** (Referencia) no se sometieron a escisión rápida en presencia de neutrófilos humanos.

Datos de citotoxicidad *in vitro*

Se aspiró el medio de células SKOV3 WT, SKOV3 GUSB KO (línea celular inactiva de β -glucuronidasa, generada usando direccionamiento de CRISPR), células NCI-N87 y MDAMB468 a 80-90 % de confluencia en un matraz T175 y el matraz se enjuagó con PBS (aproximadamente 10 ml) y se vació. Se añadió la enzima TrypLE (5 ml) Express (1x), se regresó el matraz a la incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ durante aproximadamente 5 minutos, el matraz se agitó después para separar las células del fondo. Se añadieron 10 ml de medio celular (McCoy's 5A suplementado con 50 % de suero fetal bovino y RPMI 1640) al matraz y la suspensión celular se transfirió a un tubo Falcon estéril de 50 ml, se centrifugó después (400 g durante 5 min). El sobrenadante se aspiró, y el gránulo se volvió a suspender en 10 ml de medio de cultivo. La suspensión celular se pipeteó bien para romper los posibles agregados y se mezclaron 10 μ l de solución con 10 μ l de células teñidas con azul tripán. Se transfirieron después 20 μ l de la mezcla a un portaobjetos de recuento celular y se midieron la concentración y la viabilidad celulares usando el LUNA II. De acuerdo con experimentos previos que nos permitieron determinar las mejores densidades de siembra, SKOV3, SKOV3 GUSB KO y MDAMB468 se sembraron a 3000 células/pocillo mientras que NCI-N87 a 10.000 células/pocillo en una microplaca de 96 pocillos.

Se preparó una solución madre (650 µl) de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) mediante dilución de ADC esterilizado por filtración en medio de cultivo celular. Se preparó un conjunto de diluciones 9 x 5 veces de la solución de ADC anterior en una placa de 96 pocillos de 2 ml de profundidad mediante transferencia en serie de 65 µl sobre 585 µl de medio de cultivo celular. La dilución de ADC se dispensó (50 µl/pocillo) en 2 pocillos replicados de la placa de 96 pocillos, que contenían 50 µl de suspensión celular sembrada 24 h (2D) y 48 h (3D) antes. Los pocillos de control recibieron 50 µl de medio de cultivo celular. La placa de 96 pocillos que contenía las células y los ADC se incubó a 37 °C en una incubadora con gas de CO₂ durante 6 días. Al final del período de incubación, las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante 10 min antes de dispensar el ensayo de viabilidad celular CELLTITER-GLO™ (100 µl por pocillo) en cada pocillo. Las placas se mezclaron con pipeta durante 5 minutos después de lo cual las placas se incubaron durante 25 minutos a temperatura ambiente. Se midió la luminiscencia de los pocillos, y se calculó el porcentaje de supervivencia celular a partir de la luminiscencia media en los 2 pocillos tratados con ADC en comparación con la luminiscencia media en los 6 pocillos no tratados de control (100 %). Se determinó IC₅₀ a partir de los datos de dosis-respuesta usando GRAPHPAD PRISM software v9 (GRAPHPAD, San Diego, CA) usando el algoritmo de regresión no lineal (ajuste de curvas): Sigmoidal, 4PL, X es log(concentración).

Tabla 2- Datos de citotoxicidad in vitro SKOV3 WT 3D y SKOV3 GUSB KO 3D

	IC ₅₀ SKOV3 WT 3D (µg/ml)	IC ₅₀ SKOV3 GUSB KO 3D (µg/ml)
ADC1 (Control)	0,037	0,051
ADC2	0,071	32,4

ADC6	0,014	N.A.
-------------	-------	------

N.A.: datos no disponibles

*Tabla 3- Datos de citotoxicidad in vitro SKOV3 WT 2D, SKOV3 GUSB KO 2D, NCI-N87 2D y MDAMB468 2D para **ADC1** y **ADC2***

	IC₅₀ SKOV3 WT 2D (µg/ml)	IC₅₀ SKOV3 GUSB KO 2D (µg/ml)	IC₅₀ NCI-N87 2D (µg/ml)	IC₅₀ MDAMB468 2D (Her2- control) (µg/ml)
ADC1 (Control)	0,0080	0,012	0,015	6,53
ADC2	0,005	>50	0,009	14,01

5

*Tabla 4- Datos de citotoxicidad in vitro NCI-N87 2D y MDAMB468 2D para **ADC4-ADC8***

	IC₅₀ NCI-N87 2D (µg/ml)	IC₅₀ MDAMB468 2D (Her2- control) (µg/ml)
ADC4	0,01	52,39
ADC5	0,006	>50
ADC6	0,004	32,42
ADC7 (Referencia)	0,004	>50
ADC8 (Referencia)	0,004	>50

Análisis de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés)

10

El análisis HIC se realizó usando un sistema Shimadzu Prominence equipado con un Proteomix HIC Butil-NP5, 5 µm partículas no porosas, 4,6 x 35 mm, eluyendo con 0,8 ml/minuto de regulador de gradiente HIC filtrado estéril que contiene 1,5 M de

(NH₄)₂SO₄, 25 mM de NaPO₄ (pH 7,40) y 80 % 25 mM de NaPO₄ (pH 7,40), 20 % v/v de MeCN. La muestra se diluyó a 1 mg/ml y se diluyó adicionalmente 1:1 en regulador HIC (1:1 regulador A y B), el perfil de elución se registró a múltiples longitudes de onda y se reportó a 214 nm.

5 *Tabla 5*

DAR	ADC2		ADC7 (Referencia)		ADC8 (Referencia)	
	Ta	% de área	Ta	% de área	Ta	% de área
Ejecución 1						
0	2,495	3,356	2,489	8,817	2,487	8,404
1	2,785	3,231	2,824	2,457	2,821	2,803
2	3,33	17,395	3,371	35,864	3,367	34,847
3	3,845	7,116	3,906	6,045	3,905	6,509
4	4,339	32,267	4,444	35,191	4,439	34,668
5	4,663	3,099	5,097	4,442	5,086	4,689
6	5,14	23,91	5,235	5,442	5,229	5,57
7	5,419	4,796	5,441	0,836	5,425	1,406
8	5,629	4,83	5,694	0,906	5,687	1,104
Ejecución 2						
0	2,499	3,462	2,493	8,533	2,5	8,393
1	2,786	3,239	2,825	2,643	2,83	2,89
2	3,331	17,618	3,368	34,701	3,373	34,462
3	3,847	6,98	3,916	5,982	3,922	6,37
4	4,338	32,479	4,432	34,615	4,434	34,279
5	4,669	3,091	5,077	5,273	5,083	5,368
6	5,139	23,919	5,226	5,277	5,234	5,012
7	5,418	4,934	5,417	1,574	5,401	1,846
8	5,627	4,278	5,685	1,401	5,695	1,38
Ejecución 3						
0	2,501	3,526	2,496	9,188	2,499	8,448
1	2,788	3,336	2,827	2,664	2,829	3,036

2	3,332	17,768	3,368	36,346	3,368	34,441
3	3,849	6,89	3,922	5,711	3,925	6,198
4	4,336	32,138	4,427	35,017	4,431	34,037
5	4,678	3,274	5,076	4,975	5,079	5,581
6	5,14	23,818	5,228	4,77	5,232	5,006
7	5,422	4,513	5,433	0,902	5,409	1,762
8	5,632	4,736	5,689	0,427	5,692	1,492

Los datos de la Tabla 5 muestran que en general, en un DAR específico, el **ADC2** es menos hidrofóbico que **ADC7** (Referencia) y **ADC8** (Referencia).

La descripción anterior de modalidades ilustrativas está destinada únicamente a

- 5 presentar a otros expertos en la técnica la memoria descriptiva del Solicitante, sus principios y su aplicación práctica de manera que otros expertos en la técnica puedan adaptar y aplicar fácilmente la memoria descriptiva en sus numerosas formas, ya que pueden adaptarse mejor a los requisitos de un uso particular. Esta descripción y sus ejemplos específicos, aunque indican modalidades de esta memoria descriptiva, están
- 10 destinados únicamente a fines ilustrativos. Esta memoria descriptiva, por lo tanto, no se limita a las modalidades ilustrativas descritas en esta memoria descriptiva, y puede modificarse de diversas maneras. Además, debe apreciarse que diversas características de la memoria descriptiva que, por razones de claridad, se describen en el contexto de modalidades separadas, también pueden combinarse para formar una
- 15 única modalidad. Por el contrario, diversas características de la memoria descriptiva que, por razones de brevedad, se describen en el contexto de una única modalidad, también pueden combinarse para formar subcombinaciones de estas.