COMPUESTO ENLAZADOR MODULAR PARA CONJUGADOS DE FÁRMACOS DE UNIÓN A DIANAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a compuestos enlazadores modulares para conjugados de fármacos de unión a dianas (TBDC) y en particular a compuestos enlazadores modulares para conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). La invención se refiere además a métodos de síntesis del compuesto enlazador modular, a conjugados de fármacos de unión a dianas que comprenden el compuesto enlazador modular de la invención, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos conjugados de fármacos de unión a dianas de la invención. Las modalidades de la invención se desarrollaron particularmente como conjugados de fármacos de unión a dianas para su uso en el tratamiento del cáncer y se describirán a continuación con referencia a esta solicitud. Sin embargo, se apreciará que la invención no está limitada a este campo de uso particular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Aparte de la resección quirúrgica y la radioterapia, la quimioterapia sigue siendo la opción terapéutica más utilizada en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, también está bien establecido que la quimioterapia, debido a su selectividad y especificidad limitadas frente a las células cancerosas, suele ofrecer sólo una pequeña ventana terapéutica para la administración de dosis altamente tóxicas de agentes quimioterapéuticos, que suelen provocar efectos secundarios graves para los pacientes debido al efecto tóxico sobre las células no cancerosas, al tiempo que sólo ofrecen una baja eficacia frente a las células cancerosas malignas.

Se han desarrollado soluciones de terapia farmacológica dirigida para aumentar la administración específica de sustancias farmacológicas citotóxicas directamente a las células cancerosas malignas. En particular, los conjugados de fármacos de unión a dianas basados en los principios de reconocimiento de secuencias diana o epítopos y de unión conocidos de las inmunoglobulinas/anticuerpos ofrecen nuevas opciones de tratamiento que permiten administrar sustancias farmacológicas a las células cancerosas malignas con gran

especificidad y con un efecto muy limitado o nulo en las células no cancerosas.

Los conjugados de fármacos de unión a diana (TBDC), y en particular los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), suelen consistir en una fracción de unión a diana unida covalentemente a sustancias farmacológicas citotóxicas mediante un enlazador sintético. Mientras que (a) la molécula de unión a la diana garantiza un alto grado de especificidad y (b) el fármaco citotóxico asegura el efecto sobre las células cancerosas una vez administrado, es (c) el compuesto enlazador el que afecta sustancialmente al índice terapéutico, la eficacia y la farmacocinética de dichos conjugados.

En particular, el compuesto enlazador debe (i) garantizar una elevada estabilidad plasmática del conjugado en circulación para evitar la liberación prematura del fármaco y los consiguientes efectos sistémicos no deseados fuera de la diana; (ii) mantener las propiedades de la fracción de unión a la diana, así como de la sustancia farmacológica citotóxica, (iii) proporcionar un alto grado de solubilidad acuosa del conjugado para permitir la administración de sustancias farmacológicas hidrófobas/lipofílicas y evitar la agregación de los TBDC en una composición farmacéutica; y (iv) garantizar una exposición adecuada de las células cancerosas diana a la sustancia farmacológica citotóxica para maximizar el efecto terapéutico.

La naturaleza lipofílica de muchos fármacos citotóxicos puede afectar negativamente a las propiedades de un TBDC hasta el punto de que las cargas útiles no lleguen eficazmente a las células diana. La modulación de las propiedades de los TBDC mediante la fijación de grupos polares en los enlazadores puede reducir la agregación durante la conjugación y mejorar las propiedades fisicoquímicas de los ADC, lo que conduce a una farmacocinética (PK) mejorada y a un índice terapéutico mejorado del ADC (véase, por ejemplo, Nature Biotechnology, 2015, 33, 733-735). La modulación del enlazador para efectuar un cambio en la polaridad o la carga del metabolito final puede mejorar la actividad frente a células resistentes a múltiples fármacos (MDR) debido a una mejor retención de las cargas útiles dentro de las células (véase, por ejemplo, Cancer Res; 70(6) Mar. 15, 2010, p2528). Los grupos químicos de los enlazadores, por ejemplo, grupos de polietilenglicol (PEG), azúcar o ácido sulfúrico (véanse, por ejemplo, WO2014062697, US20100323973), no sólo afectan la eficacia de la conjugación y la facilidad

de producción de los ADC, sino que a menudo permanecen como parte de los metabolitos y, por tanto, afectan a la actividad y seguridad del ADC.

Con respecto a la administración de la sustancia farmacológica citotóxica en el lugar diana, se han desarrollado enlazadores tanto escindibles como no escindibles. Los enlazadores no escindibles, por ejemplo, que comprenden enlaces tioéter o maleimido-caproilo, suelen requerir la internalización y posterior degradación enzimática lisosomal de todo el TBDC por la célula diana para liberar el fármaco citotóxico. Los enlazadores escindibles pueden dividirse en los grupos de enlazadores químicamente escindibles y enlazadores enzimáticamente escindibles. Los enlazadores químicamente escindibles se basan típicamente en la sensibilidad al pH (liberación lisosomal/endosomal de la sustancia farmacológica citotóxica) o en la sensibilidad a la reducción (liberación citoplasmática de la sustancia farmacológica citotóxica), mientras que se conocen varios enlazadores enzimáticamente escindibles que se basan en la liberación enzimática de la sustancia farmacológica citotóxica, típicamente dentro del compartimento lisosomal de la célula diana. Se ha descrito, por ejemplo, una combinación de una estructura peptídica escindible y un espaciador autoinmolante entre el anticuerpo de unión a la diana y el fármaco de un ADC, aplicable a una carga útil que lleva una amina primaria o secundaria. Jeffrey *et al.* 2005 (Design, Synthesis, and in Vitro Evaluation of Dipeptide-Based Antibody Minor Groove Binder Conjugates. J. Med. Chem. Vol,48: 1344-1358). No obstante, en muchos casos, el fármaco citotóxico liberado sigue conteniendo aductos derivados del enlazador. En algunos casos, el diseño inteligente del enlace escindible permite una modificación positiva del fármaco. En otros, la eficacia del fármaco se ve afectada negativamente por los aductos residuales del enlazador.

Sin embargo, la eficacia terapéutica de un TBDC no sólo depende de la liberación adecuada de la sustancia farmacológica citotóxica, sino también de la bioconjugación eficaz que conecta la sustancia farmacológica con la fracción de unión a la diana y, además, del número de moléculas de la sustancia farmacológica citotóxica unidas con éxito a una única fracción de unión a la diana. Dado que hasta ahora los TBDC se han desarrollado principalmente como ADC, esto se conoce como relación fármaco-anticuerpo (Drug-Antibody-Ratio, DAR). Se sabe que un DAR bajo disminuye la eficacia de los TBDC y requiere que se conjugue una

sustancia farmacológica altamente tóxica, mientras que un DAR alto se ha relacionado con una inestabilidad potencial de los TBDC que conduce a un aumento de los efectos sistémicos, una vida media reducida de los TBDC y una alteración general de la farmacocinética de la molécula. Sin embargo, dado que normalmente se han aplicado químicas estocásticas para conjugar sustancias farmacológicas con anticuerpos, incluso los ADC aprobados por la FDA se componen de una mezcla de conjugados, que son heterogéneos con respecto a su DAR.

En vista del estado de la técnica, existe la necesidad de compuestos enlazadores mejorados y ampliamente aplicables para conjugados de fármacos de unión a diana (TBDC), que medien en la conjugación estable de la sustancia farmacológica citotóxica con la fracción de unión a la diana, al tiempo que permitan una fácil adaptación de la relación fármaco-anticuerpo (DAR) y/o la solubilidad acuosa de un TBDC en función de la citotoxicidad y la hidrofobicidad de la sustancia farmacológica a conjugar, respectivamente.

Es un objeto de la presente invención superar o mejorar al menos una de las desventajas del arte previo o proporcionar una alternativa útil. En particular, es objeto de la presente invención proporcionar compuestos enlazadores mejorados para conjugados de fármacos de unión a diana (TBDC), en particular para conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

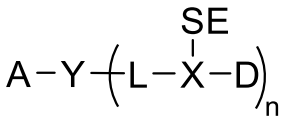
Como se ha indicado anteriormente, la presente invención tiene por objeto proporcionar compuestos enlazadores para conjugados de fármacos de unión a diana (TBDC), que sean fácilmente adaptables con respecto a su relación fármaco-anticuerpo (DAR) y/o solubilidad acuosa en función de la citotoxicidad e hidrofobicidad de la sustancia farmacológica a conjugar, respectivamente, garantizando al mismo tiempo un grado de etiquetado (DOL) homogéneo.

Los compuestos enlazadores aquí descritos proporcionan un alto grado de adaptabilidad debido a su arquitectura modular. En concreto, el compuesto enlazador modular de la presente invención comprende al menos una unidad funcional de una secuencia peptídica escindible conectada a un espaciador autoinmolante, al que están unidos en proximidad física un grupo

potenciador de la solubilidad y el fármaco citotóxico. Además, un espaciador químico conecta esta unidad funcional a un núcleo multimérico que comprende una o más unidades de ramificación, donde el núcleo multimérico es personalizable con respecto al número de unidades funcionales que el compuesto enlazador modular de la invención puede llevar y puede incluso acomodar un enlace directo adicional a una segunda sustancia farmacológica citotóxica fuera de la unidad funcional directamente antes descrita.

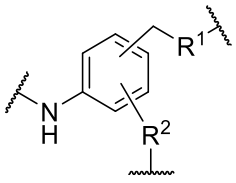
En el compuesto enlazador modular, una unidad de ramificación está unida a una fracción reactiva terminal a través de otro espaciador químico, donde la fracción reactiva es adecuada para la conjugación fiable del compuesto enlazador modular con una fracción de unión a diana seleccionada. Normalmente, esta fracción de unión a la diana se basa en el principio de la inmunoglobulina para reconocer y unirse a una secuencia diana o epítopo de un antígeno con alta especificidad.

Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un compuesto enlazador modular de Fórmula (I)

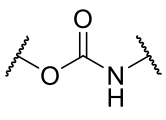
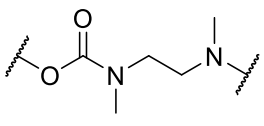
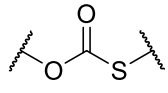


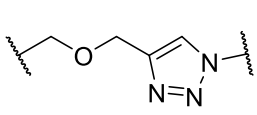
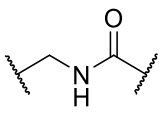
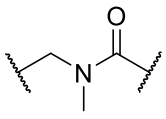
Fórmula (I)

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde:

X es un espaciador autoinmolante, 

Donde:

R^1 une covalentemente X a D en para, meta u orto al grupo amino de X y se selecciona de un grupo consistente en un enlace,  ,  ,  ,  y  ;

R^2 conecta X a SE y es  ,  ,  o -O-;

D es una sustancia farmacéuticamente activa;

SE es un grupo potenciador de la solubilidad;

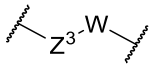
L es un espaciador que comprende un péptido unido covalentemente a X;

n es un número entero, al menos 2, preferiblemente n es un número entero entre 2 y 5, por ejemplo 2, 3, 4 o 5;

Y es una unidad de ramificación,

A es una fracción reactiva para conjugación con una fracción de unión a diana.

En algunas modalidades, L es

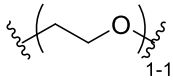
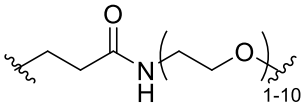
 ,

donde:

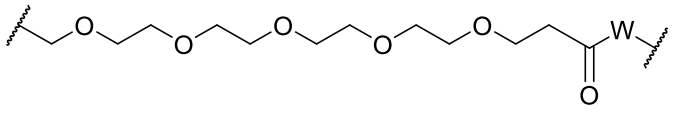
W es una secuencia peptídica escindible y no escindible que conecta Z^3 y X y se selecciona del grupo formado por:

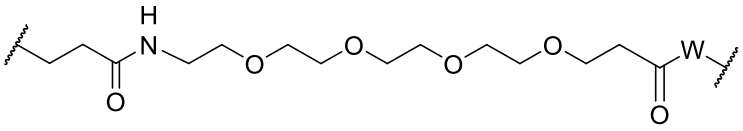
Val-Ala, Val-Cit, Met-Thr, Thr-Thr, Phe-Lys, Glu-Val-Ala, Glu-Val-Cit, Gly-Gly-Phe-Gly, Gly-Gly-Tyr-Gly, cBu-Ala, cBu-Cit, Glu-cBu-Ala, Glu-cBu-Cit, Asp-cBu-Ala, Asp-cBu-Cit, Asp-Pro-Val, Asn-Pro-Val, iGlu-cBu-Ala, iGlu-cBu-Cit, Val-Lys, Val-Arg, Val-Gln, Val-Met, Val-Thr, AcLys-Val-Cit, AcLys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, iGlu-Val-Ala, Asp-Val-Cit, iGlu-Val-Cit, Tyr-Arg, Tyr-Met, Phe-Cit, Phe-Ala, Phe-Arg, Phe-Met, Phe-Gln, Phe-Arg-Arg-Gly, Phe-Arg-Arg-Leu, Phe-Arg-Arg-Leu-Gly, Phe-Leu-Arg-Arg-Gly, Ala-Lys, Leu-Cit, Leu-Gln, Ile-Cit, Ala-Ala-Asn, Ala-Asn, Ala-Ala, Asn-Asn, Asn, beta-Ala, y Lys o sus combinaciones; y

Z^3 es un enlace o un espaciador que comprende una cadena de alquilo C_{1-20} o un polietilenglicol $(PEG)_{1-10}$ o un C_2 -amida-PEG_{1-10},

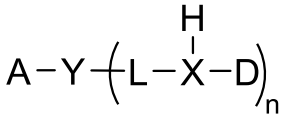
donde $(PEG)_{1-10}$ es  y C_2 -amida-PEG_{1-10} es  ;

preferiblemente L es

 o .



En una modalidad específica, si D, en el compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia), tiene un ClogP inferior a -1



Fórmula (Ia)

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, R^2 es H y no hay ningún SE unido al compuesto enlazador modular.

$(PEG)_{1-10}$ y C_2-amida-PEG_{1-10} tal como se divulgan, incluyen expresamente longitudes de cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (I) según el primer aspecto, método que comprende:

(i) poner en contacto un primer compuesto que comprende:

– una fracción inmolante,

– una secuencia peptídica W escindible,

– un grupo amino protector Pg^1, que está unido covalentemente a W,

– una sustancia farmacéuticamente activa D y

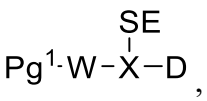
– un primer grupo complementario Cg^1

con un segundo compuesto que comprende

– un grupo potenciador de la solubilidad SE y

– un segundo grupo complementario Cg^2

para formar un intermediario de Fórmula II:



Fórmula II

donde SE está unido a X a través de R^2 y donde R^2 está formado por la reacción de Cg^1 y Cg^2;

(ii) eliminar el grupo protector amina Pg^1 de la Fórmula II para exponer una amina primaria;

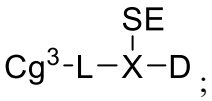
(iii) poner en contacto la amina primaria con un tercer compuesto que comprende

– un espaciador Z^3,

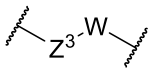
– un grupo amina reactivo, y

– un tercer grupo complementario Cg^3

para formar el intermediario de Fórmula III:



Fórmula III

donde L es 

(iv)poner en contacto el intermediario de Fórmula III con un cuarto compuesto ramificado que comprende

– un cuarto grupo complementario Cg^4 y

– un quinto grupo complementario Cg^5,

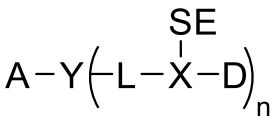
donde Cg^3 reacciona con Cg^4 para formar Z ;[2]

(v) poner en contacto el producto de iv) con un quinto compuesto que comprende

– una fracción reactiva A para conjugación con una fracción de unión a diana y

– un sexto grupo complementario Cg^6

donde la reacción de Cg^5 y Cg^6 forma Z^1, para formar el compuesto enlazador modular de Fórmula I:



Fórmula (I).

En una modalidad específica del segundo aspecto, si D tiene un ClogP inferior a -1, la presente invención se refiere a un método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia) según el primer aspecto, el método comprende:

(i) seleccionar un primer compuesto que comprende:

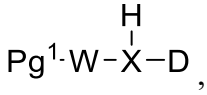
– una fracción inmolante,

– una secuencia peptídica W escindible,

– un grupo amino protector Pg^1, que está unido covalentemente a W,

– una sustancia farmacéuticamente activa D

como intermediario de la Fórmula IIa:



Fórmula IIa

(ii) eliminar el grupo protector amina Pg^1 de la Fórmula IIa para exponer una amina primaria;

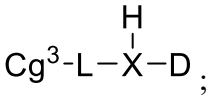
(iii) poner en contacto la amina primaria con un tercer compuesto que comprende

– un espaciador Z^3,

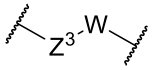
– un grupo amina reactivo, y

– un tercer grupo complementario Cg^3

para formar el intermediario de Fórmula IIIa:



Fórmula IIIa

donde L es 

(iv)poner en contacto el intermediario de Fórmula IIIa con un cuarto compuesto ramificado que comprende

– un cuarto grupo complementario Cg^4 y

– un quinto grupo complementario Cg^5,

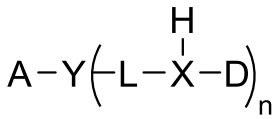
donde Cg^3 reacciona con Cg^4 para formar Z ;[2]

(v) poner en contacto el producto de iv) con un quinto compuesto que comprende

– una fracción reactiva A para conjugación con una fracción de unión a diana y

– un sexto grupo complementario Cg^6

donde la reacción de Cg^5 y Cg^6 forma Z^1, para formar el compuesto enlazador modular de Fórmula Ia:



Fórmula (Ia).

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de fármaco de unión a

diana (TBDC) que comprende al menos un producto de reacción del compuesto enlazador modular según el primer aspecto y un grupo reactivo correspondiente de una fracción de unión a diana, donde el al menos un producto de reacción es el producto de una reacción entre A del compuesto enlazador modular y el grupo reactivo correspondiente de la fracción de unión a diana, que une covalentemente el compuesto enlazador modular a la fracción de unión a diana. En algunas modalidades, el grupo reactivo correspondiente de la fracción de unión a la diana es un grupo tiol.

En algunas modalidades, la fracción de unión a diana del conjugado de fármaco de unión a diana del tercer aspecto reconoce y se une específicamente a una secuencia o epítopo diana de un antígeno específico de cáncer o asociado a cáncer de Guanilato Ciclasa C (GUCY2C), Clúster de Diferenciación 33 (CD33), Clúster de Diferenciación 30 (CD30), Clúster de Diferenciación (CD5), Clúster de Diferenciación 19 (CD19), Clúster de Diferenciación 20 (CD20), Clúster de Diferenciación 37 (CD37), Clúster de Diferenciación 45 (CD45), Clúster de Diferenciación 47 (CD47), Clúster de Diferenciación 56 (CD56), Clúster de Diferenciación 70 (CD70), Clúster de Diferenciación 79b (CD79b), Clúster de Diferenciación 117 (CD117 / c-Kit), Clúster de Diferenciación 123 (CD123 / IL3RA), Clúster de Diferenciación 137 (CD137 / 4-1BB), Clúster de Diferenciación 138 (CD138), Clúster de Diferenciación 269 (CD269 / antígeno de maduración de células B, BCMA), claudina 18,2, CEA (antígeno carcinoembrionario), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCam), DKK1 (proteína 1 relacionada con Dickkopf), glypican-3, muscina-1 (MUC-1 / CD227), mucina 5AC (MUC5AC), anhidrasa carbónica 9 (CAIX), receptor 1 de quimiocinas con fracción C-X-C (CXCR1, CD181), receptor 2 de quimiocinas con fracción C-X-C (CXCR2 / CD182), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), clúster de diferenciación 22 (CD22), molécula 4 de adhesión celular nectina (Nectin 4), Transductor de señales de calcio asociado a tumores 2 (Trop-2), Ligando 3 similar a Delta (DLL3), Glicoproteína transmembrana NMB (gpNMB), Antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), Receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (c-Met, CD151), Miembro 6 de la familia 39 de transportadores de solutos (LIV-1), receptor de folato 1 (FOLR1), mesotelina, anhidrasa carbónica 6 (CA6), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o miembro 3 de la familia de la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP3), mucina 17 (MUC17), claudina 23

(CLDN23).

En algunas modalidades, la fracción de unión a diana del conjugado de fármaco de unión a diana del tercer aspecto es una cualquiera de Adecatumumab (anti-EpCam), Amatuximab, (anti-mesotelina), Amivantamab (anti-EGFR), Besilesomab (anti-CEA), blinatumomab (anti-CD19), brentuximab (anti-CD30), Cantuzumab, Cibisatamab (anti-CEACAM5), Cirmtuzumab (anti-ROR1), cetuximab (anti-EGFR), Clivatuzumab (anti-MUC1), Gatipotuzumab (anti-MUC1), Coltuximab (anti-CD19), Daratumumab (anti-CD38), Duligotuzumab (anti-ERBB3), Edrecolomab (anti-EpCam), Enfortumab (anti-Nectin-4), Enoblituzumab (anti-CD276), Ensituximab (anti-MUC5AC), Epratuzumab (anti-CD22), Farletuzumab (anti-FOLR1), Igovomab (anti-CA-125), Inebilizumab (anti-CD19), Iratumumab (anti-CD30), Labetuzumab (anti-CEA), Margetuximab (anti-HER2/neu), Matuzumab (anti-EGFR), Modotuximab (anti-EGFR dominio extracelular III), Naptumomab (anti-5T4), Naratuximab (anti-CD37), Necitumumab (anti-EGFR), Nimotuzumab (anti-EGFR), Obinutuzumab (anti-CD20), Ocaratuzumab (anti-CD20), Ocrelizumab (anti-CD20), Ofatumumab (anti-CD20), Otlertuzumab (anti-CD37), Ontuxizumab (anti-TEM1), Pertuzumab (anti-HER2/neu), Polatuzumab (anti-CD79b), Rituximab (anti-CD20), Rovalpituzumab (anti-DLL3), Sacituzumab (anti-TROP-2), Seribantumab (anti-ERBB3/HER3), Tafasitamab (anti-CD19), Tetulomab (anti-CD37), Timigutuzumab (anti-HER2), Trastuzumab (anti-HER2), Ublituximab (anti-CD20), o Zolbetuximab (anti-Claudina 18,2). En algunas modalidades, las mencionadas moléculas de unión a diana (por ejemplo, anticuerpos) se han modificado recombinantemente para que comprendan al menos un dominio Fc de sustitución de aminoácidos donde un aminoácido del dominio Fc se ha sustituido por el aminoácido cisteína. Dichos anticuerpos modificados con cisteína son particularmente ventajosos para su uso con el compuesto enlazador modular de acuerdo con la Fórmula (I) de la presente divulgación, porque permiten una conjugación específica del sitio entre el anticuerpo modificado con cisteína y el compuesto enlazador modular de Fórmula (I) dando como resultado conjugados anticuerpo-fármaco homogéneos con un grado de marcado de aproximadamente 2 (p. ej., de aproximadamente 1,8, 1,9, 1,95 a aproximadamente 2,0, 2,05, 2,1, 2,2 o de aproximadamente 1,98, 2,0 a aproximadamente 2,1, 2,15, 2,2). En el documento WO2016040856A2 o en Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932

(ambos documentos se incorporan por referencia) se han divulgado protocolos correspondientes sobre la generación de anticuerpos sustituidos con cisteína o modificados con cisteína. La sustitución preferida de cisteína en la región Fc de los anticuerpos divulgados anteriormente es D265C dominios Fc IgG1 o posiciones correspondientes en anticuerpos IgG2, IgG4 (numeración según el sistema de numeración de la UE, Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1969 Mayo;63(1):78-85) según se divulga en el documento WO2016142049A1.

Preferiblemente, los anticuerpos anteriores o las moléculas de unión a diana se han diseñado para incluir además las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A (numeración según el sistema de numeración de la UE) que reducen la interacción del dominio Fc del anticuerpo respectivo con los receptores FcgRI. FcgRIIa, FcgRIIb y FcgRIIIa. En algunas modalidades, los anticuerpos anteriores pueden comprender sustituciones de aminoácidos como N297A, P329G, G236R o L234F, L235E en combinación con D265C que reducen la interacción con los receptores FcgRI. FcgRIIa, FcgRIIb y FcgRIIIa.

En un cuarto aspecto, el conjugado de fármaco de unión a diana del tercer aspecto es para uso como medicamento, preferiblemente para uso en el tratamiento del cáncer.

En consecuencia, este cuarto aspecto de la presente invención también abarca métodos de tratamiento del cáncer, en los que el método comprende la administración del conjugado de fármaco de unión a diana del tercer aspecto a un sujeto que lo necesite y/o el uso del conjugado de fármaco de unión a diana del tercer aspecto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En algunas modalidades, el cáncer se caracteriza típicamente por la expresión de al menos uno de los antígenos específicos del cáncer o asociados al cáncer descritos anteriormente.

Por consiguiente, en un quinto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de fármaco de unión a diana según el tercer o cuarto aspecto.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un compuesto enlazador modular, preferiblemente del primer aspecto, cuando se sintetiza por el método del segundo aspecto.

En otro aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso de un compuesto enlazador modular según el primer aspecto en la fabricación de un conjugado de fármaco de unión a diana según el cuarto aspecto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las modalidades de la invención se describirán ahora, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

Fig. 1 Citotoxicidad *in vitro* del conjugado enlazador-carga útil (IV,1) en (A) células SKBR3, (B) células JIMT-1. T-LALA-D265C denota una variante de trastuzumab que comprende las mutaciones L234A, L235A y D265C en su región Fc (numeración según el sistema de numeración de la UE). T-LALA-D265C-va-PAB-exa denota un ADC de exatecano DAR2 de control que comprende un enlazador dipéptido de valina-alanina autoinmolante que carece de un grupo potenciador de la solubilidad.

Fig. 2 Citotoxicidad *in vitro* de ADCs anti-GCC que comprenden los conjugados enlazador-carga útil (IV,4), (IV,6) en (A) células HEK que expresan GUCY2C humano (células HEK293-GUCY2C-HDP-2B3) o (B) células HEK de tipo silvestre. El aducto de cisteína de la carga útil del enlazador (IV,6) se utilizó como compuesto libre.

Fig. 3 Citotoxicidad *in vitro* de ADCs anti-GCC que comprenden los conjugados enlazador-carga útil (IV,5), (IV,6) en (A) células HEK que expresan GUCY2C humano (células HEK293-GUCY2C-HDP-2B3 o (B) células HEK293 de tipo silvestre. SEC indica purificación del ADC mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Fig. 4 Citotoxicidad *in vitro* de los ADC anti-GCC que comprenden los conjugados enlazador-carga útil (IV,8), (IV,17) y (IV,19) en (A) células HEK que sobreexpresan GUCY2C humano (células HEK293-GUCY2C-HDP-2B3) o (B) células HEK293 de tipo silvestre. SEC indica purificación de ADC mediante cromatografía de exclusión por tamaño. “N/A” indica que no se ha calculado la EC50.

Fig. 5 Citotoxicidad *in vitro* de los ADC anti-GCC que comprenden los conjugados enlazador-carga útil (IV,9), (IV,12) y (IV,18) en (A) células HEK que sobreexpresan GUCY2C humano (células HEK293-GUCY2C-HDP-2B3) o (B) células HEK293 de tipo silvestre.

Fig. 6 Citotoxicidad *in vitro* de los ADC anti-GCC que comprenden los conjugados enlazador-carga útil (IV,9), (IV,12) y (IV,18) en (A) células HEK que sobreexpresan GUCY2C humano (células HEK293-GUCY2C-HDP-2B3 o (B) células HEK293 de tipo silvestre (wt).

Fig. 7 Citotoxicidad *in vitro* de los ADC anti-GCC que comprenden los conjugados enlazador-carga útil (IV,18), (IV,16) y (IV,6) en (A) células HEK que sobreexpresan GUCY2C humano (células HEK293-GUCY2C-HDP-2B3) o (B) células HEK293 de tipo silvestre. SEC indica purificación de ADC mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Fig. 8 Muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 94 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el control con vehículo, con el Exatecan-TBDC de la invención IV.6 o con un Deruxtecan-ADC, como dosis única de 25 mg/kg el día 0 o 1 vez por semana durante 3 semanas (n= 10 animales/grupo, media representada ± DE). "hD" indica ADC de alto DAR (DAR10). Exatecan-TBDC-IV,6 administrado como dosis única o dosis múltiples es igualmente eficaz en la reducción de la carga tumoral en los animales en comparación con un ADC basado en deruxtecan hD contra la misma diana.

Fig. 9muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 67 después de la asignación de grupos en ratones tratados con el vehículo de control o con los Exatecan-TBDC de la invención IV.2 y IV.11, como dosis única de 15 mg/kg el día 1 (n= 10 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 10muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 61 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-TBDC de la invención IV.6 como dosis única de 15 mg/kg el día 1 (n= 10 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 11muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 70 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-TBDC de la invención IV.2 20 mg/kg, ya sea como dosis única o dosis múltiples (n= 9 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 12muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 70 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-

TBDC de la invención IV.5 20 mg/kg, ya sea como dosis única o dosis múltiples (n= 9 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 13muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 74 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con los Exatecan-TBDC de la invención IV.16 o IV.3 15 mg/kg como dosis única (n= 10 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 14muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 66 después de la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-TBDC de la invención IV.9 ya sea como dosis única de 15 mg/kg el día 1 o 1 vez por semana durante 3 semanas con 10 o 15 mg/kg (n= 10 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 15muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 66 después de la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con los Exatecan-TBDC de la invención IV.1 o IV.20 como dosis única de 15 mg/kg el día 1 (n= 10 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 16muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 66 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-TBDC de la invención IV.8 como dosis única de 15 mg/kg el día 1 (n= 10 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 17muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 66 tras la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con el Exatecan-TBDC de la invención IV.18 como dosis única de 15 mg/kg el día 1 (n= 10 animales/grupo, media representada ± DE).

Fig. 18muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 22 después de la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con los Exatecan-TBDC de la invención IV.9, IV.8, IV.12 o IV.18 o IV.20 1 vez por semana durante 3 semanas con 5 mg/kg cada uno (n= 10 animales, media representada ± DE). “hD” indica DAR alto (DAR10). Los Exatecan-TBDCs de la invención que comprenden los compuestos (IV,9), (IV,12), (IV,18), y (IV,22) reducen la carga tumoral más eficientemente que un ADC basados en deruxtecan hD contra la misma diana a la misma dosis total de ADC (o Exatecan-TBDCs) administrada, mientras que el Exatecan-TBDCs de la invención que comprende el

compuesto (IV,8) es igualmente eficaz. Esto indica que una dosis más baja de (IV,8), (IV,9), (IV,12), (IV,18) y (IV,22) es igual o más eficaz para reducir la carga tumoral en los animales que una dosis más alta de deruxtecan- carga útil.

Fig. 19muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 22 después de la asignación del grupo en ratones tratados con el vehículo de control o con los Exatecan-TBDC de la invención IV.9, IV.8, IV.12 o IV.18 o IV.20 1 vez por semana durante 3 semanas con 2,5 mg/kg cada uno (n= 10 animales, media representada ± DE). Los resultados indican que una dosis más baja de (IV,8), (IV,9), (IV,12), (IV,18) y (IV,22) es igual o más eficaz para reducir la carga tumoral en los animales que una dosis más alta de deruxtecan-carga útil.

Fig. 20 muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 100 después de la asignación del grupo, medido con calibrador. Los ratones se trataron con vehículo control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 1 vez por semana durante 3 semanas con 5 mg/kg cada uno (n= 10 animales, media representada ± DE).

Fig. 21muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 100 después de la asignación del grupo, medido con calibrador. Los ratones se trataron con vehículo control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 1 vez por semana durante 3 semanas con 2,5 mg/kg cada uno (n= 10 animales, media representada ± DE).

Fig. 22 muestra la supervivencia global desde el día 0 hasta el día 100 después de la asignación del grupo. La supervivencia se controló diariamente. Los ratones fueron tratados con vehículo control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 1 vez por semana durante 3 semanas con 5 mg/kg cada uno (n= 10 animales, media representada ± DE).

Fig. 23muestra la supervivencia global desde el día 0 hasta el día 100 después de la asignación del grupo. La supervivencia se controló diariamente. Los ratones fueron tratados con vehículo control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 1 vez por semana durante 3 semanas con 2,5 mg/kg cada uno (n= 10 animales, media representada ± DE).

Fig. 24muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 87 después de la asignación del grupo, medido con calibrador. Los ratones se trataron con vehículo control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 con una dosis intravenosa única de 10 mg/kg (n= 10 animales, media representada ± DE).

Fig. 25muestra el volumen tumoral medio [mm^3] representado desde el día 0 hasta el día 87

después de la asignación del grupo, medido con calibrador. Los ratones fueron tratados con vehículo control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 con una dosis intravenosa única de 5 mg/kg (n= 10 animales, media representada ± DE).

Fig. 26muestra la supervivencia global desde el día 0 hasta el día 87 después de la asignación del grupo. La supervivencia se controló diariamente. Los ratones se trataron con vehículo control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 con una dosis intravenosa única de 10 mg/kg (n= 10 animales, media representada ± DE).

Fig. 27muestra la supervivencia global desde el día 0 hasta el día 87 después de la asignación del grupo. La supervivencia se controló diariamente. Los ratones se trataron con vehículo control, IV.9, IV.8, IV.12, IV.18 o IV.22 con una dosis intravenosa única de 5 mg/kg (n= 10 animales, media representada ± DE).

Fig. 28 muestra que en un ELISA de BrdU de 96h en células NCI-N87 que expresan Her2, los conjugados anti-Her2 mostraron una citotoxicidad completa con valores de EC50 entre 1,749x10-11 M (T-LALA-D265C-Compuesto IV.27) y 3,279x10-12 M (T-LALA-D265C-Compuesto IV.25).

Fig. 29 muestra que en un ELISA de BrdU de 96h en células MDA-MB-231 diana negativas, los conjugados anti-Her2 sin citotoxicidad.

Fig. 30 muestra que en un cocultivo de células NCI-N87 que expresan Trop2 y una línea celular informadora que expresa TLR7 (HEK-hTLR7), ambos conjugados anti-Trop2 TLR7 mostraron una activación de TLR7 fuerte y dependiente de la dosis.

Fig. 31 muestra los conjugados producidos con enlazador/carga útil (L/P). Los derivados con o sin potenciador de solubilidad se purificaron por FPLC preparativa utilizando columnas HiLoad 16/600 Superdex 200pg preempaquetadas XK16, equilibradas con 1x PBS, pH7,4, con un caudal de 1,6mL/min. El perfil de elución a 280 nm muestra un pico principal correspondiente a los monómeros que eluyen alrededor de 80 min, mientras que los agregados y otras especies de alto peso molecular (HMWS) eluyen antes, entre 60 y 70 min. Los conjugados producidos con L/P con potenciador de la solubilidad (izquierda) mostraron muchos menos agregados en el perfil de elución en comparación con los conjugados producidos con L/P sin potenciador de la solubilidad (derecha).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Antes de que la presente invención se describa en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos en este documento, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente modalidades particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia.

Preferiblemente, los términos utilizados en el presente documento se definen tal como se describen en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kolbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza. Las definiciones de los grupos químicos utilizados en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, tendrán el significado y se definirán según lo dispuesto en el "Compendio de Terminología Química" ("Gold Book") publicado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) versión 2,3,3, goldbook.iupac.org, ISBN: 0-9678550-9-8), cuyo contenido se incorpora por referencia en el presente documento.

No obstante, con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la especificación y las reivindicaciones, así como del alcance que debe darse a determinados términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

Definiciones

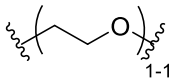
El término **"compuesto enlazador modular"** en el contexto de la presente divulgación se refiere a un enlazador que comprende al menos una molécula de una sustancia farmacológica citotóxica (también denominada simplemente fármaco o carga útil), varios módulos estructurales y funcionales adicionales (también denominados espaciadores o unidades o grupos funcionales), incluyendo al menos un grupo potenciador de la solubilidad y una unidad de ramificación, así como un grupo reactivo adecuado para conectar de forma estable el compuesto enlazador modular a una fracción de unión a diana, como un anticuerpo o un TCR.

El término **"grupo potenciador de la solubilidad"** en el contexto de la presente divulgación se refiere a un módulo dentro del compuesto enlazador modular, que al menos contrarresta -

en el mejor de los casos anula- las propiedades hidrófobas/lipofílicas de una sustancia farmacológica citotóxica de forma que proporciona al compuesto enlazador modular que comprende una carga útil específica un alto grado de solubilidad acuosa. Una variedad de grupos potenciadores de la solubilidad adecuados para la incorporación en el compuesto enlazador modular de la presente divulgación son bien conocidos por el experto e incluyen, sin limitación: (a) grupos funcionales polares, tales como grupos hidroxilo (-OH), amino (-NH_2), y carboxilo (-COOH); grupos sulfonato polares (-SO_3 H); cadenas poliméricas, tales como cadenas de polietilenglicol (PEG) hidrofílicas; grupos tensioactivos, como cadenas de alquilo; estructuras de anillos aromáticos; sustituyentes halógenos, como la adición de flúor o cloro; grupos éster (-COO-) o éter (-O-); y ciclodextrinas/oligosacáridos cíclicos.

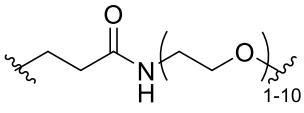
En el contexto de la presente divulgación, el término **"polialcohol(es) elaborado(s) a partir de hidratos de carbono"** se refiere a un grupo de alcoholes derivados de hidratos de carbono. Los términos "polialcohol", "poliol" y "alcoholes de azúcar" se utilizan como sinónimos.

En el contexto de la presente divulgación, el término "PEG" se refiere a polietilenglicol, el término "$(PEG)_{1-10}$" se refiere a un enlazador con 1 a 10 fracciones de etilenglicol,



por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 fracciones de etilenglicol.

El término "C_2-amida-PEG_{1-10}" se refiere a un enlazador con 1 a 10 moléculas de etilenglicol unidas covalentemente a un grupo propilamida,



por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 fracciones de etilenglicol.

En el contexto de la presente divulgación, el término **"espaciador autoinmolante"** se refiere a un espaciador que está conectado de forma estable a la sustancia farmacológica citotóxica, pero que sufre una autoinmolación desencadenada, es decir, una descomposición, de forma que su conexión con la sustancia farmacológica citotóxica se suprime y la sustancia farmacológica se libera sin aductos ni restos del propio espaciador autoinmolante. En algunas modalidades, un cambio de pH puede desencadenar la autoinmolación del espaciador y la liberación de la carga útil. En otras modalidades, el espaciador autoinmolante también está conectado a una secuencia peptídica enzimáticamente escindible y la escisión enzimática del péptido desencadena la autoinmolación del espaciador y la liberación de la carga útil. Un

ejemplo ilustrativo de espaciador autoinmolante enzimáticamente desencadenado es un espaciador p-aminobencílico (PAB) conectado a un dipéptido Val-Ala enzimáticamente escindible.

En el contexto de la presente divulgación, el término **"compuesto enlazante escindible"** se refiere a un compuesto enlazante que es escindible (i) por una enzima o (ii) en un entorno reductor. Además, los términos " enzimáticamente escindible " o "escindible por una enzima" o similares indican que el péptido, la estructura, la secuencia o el espaciador en cuestión pueden ser escindidos por una enzima, en particular por una proteasa lisosomal, como la catepsina B, dando lugar a la liberación de la sustancia farmacológica citotóxica/carga útil.

En el contexto de la presente divulgación, el término **"unidad de ramificación"** se refiere a una estructura dentro de un compuesto enlazador modular que permite una furcación del compuesto en una estructura ramificada, donde cada rama está típicamente conectada a al menos una molécula de la sustancia farmacológica citotóxica a través de un espaciador autoinmolante. Por lo tanto, un compuesto enlazador modular comprende típicamente tantas moléculas de fármaco como ramas. Como tal, un compuesto enlazador modular que comprende entre 1 y 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, preferiblemente entre 2 y 8, 2 y 6 o 2 y 4 ramas, comprende típicamente entre 1 y 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, preferiblemente entre 2 y 8, 2 y 6 o 2 y 4 moléculas de sustancia farmacológica citotóxica, respectivamente.

En el contexto de la presente divulgación, el término **"fracción reactiva para la conjugación con una fracción de unión a diana"** se refiere a un grupo químicamente reactivo dentro del enlazador que puede reaccionar con un grupo reactivo correspondiente de la fracción de unión a diana en condiciones adecuadas, de manera que el producto de reacción resultante conjuga covalentemente el compuesto enlazador restante con la fracción de unión a diana.

En el contexto de la presente divulgación, el término **"producto de reacción del compuesto enlazador modular y un grupo reactivo correspondiente de una fracción de unión a diana"** se refiere a una fracción formada como resultado de una reacción entre la fracción reactiva del compuesto enlazador modular de la invención y un grupo reactivo correspondiente de una fracción de unión a diana. Por ejemplo, si la fracción reactiva del compuesto enlazador modular de la invención es una maleimida, el producto de reacción resultante de la reacción de la maleimida con el átomo de azufre del residuo de cisteína de la fracción de unión a la

diana es un succinimidil tioéter o uno de sus derivados. Además, si la fracción reactiva del compuesto enlazador modular de la invención es un grupo que reacciona selectivamente con el grupo tiol de una cisteína libre de la fracción de unión a diana, es decir si la fracción reactiva del compuesto enlazador modular es una "fracción reactiva al tiol", el producto de reacción se selecciona típicamente entre: acetamida sustituida con tiol; succinimida sustituida con tiol; ácido succinámico sustituido con tiol; heteroarilo sustituido con tiol, en particular benzotiazol sustituido con tiol, feniltetrazol sustituido con tiol y feniloxadiazol sustituido con tiol; y un disulfuro, donde un átomo de azufre procede de un residuo de cisteína de la fracción de unión a la diana.

En el contexto de la presente divulgación, el término **"fracción de unión a diana"** se refiere a una molécula polipeptídica que reconoce y se une específicamente a una secuencia diana o epítopo de un antígeno basándose en el concepto de inmunoglobulina (Ig) de reconocimiento de diana/epítopo conocido a partir de moléculas del formato convencional Ig (es decir, IgG, IgD, IgE, IgA y/o IgM). Por consiguiente, en modalidades particulares, una fracción de unión a diana puede comprender, al menos, regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una Ig suficientes para conferir especificidad de diana/epítopo y, en algunos casos, la fracción de unión a diana puede comprender secuencias de cadena pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) de una Ig para conferir especificidad de diana/epítopo. En algunas modalidades, una fracción de unión a la diana puede ser una Ig como tal, por ejemplo una IgG. Esto, sin embargo, no significa que la fracción de unión a la diana deba estar en este formato de Ig. Por el contrario, la fracción de unión a la diana también puede ser un fragmento de Ig o uno de sus derivados, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv) o un fragmento de unión a antígeno (Fab: obtenido por escisión con papaína de una IgG; F(ab'): obtenido por escisión con pepsina de una IgG; y/o F(ab')2: obtenido por escisión con pepsina de una IgG y posterior tratamiento con β-mercaptoetanol; etc.). Asimismo, las moléculas inmunorreactivas de la presente divulgación pueden ser un nuevo formato de anticuerpo, por ejemplo y sin limitación, un constructo de anticuerpo bi- o tri-específico, un diacuerpo, un anticuerpo camélido, un anticuerpo de dominio, un nanocuerpo, un homodímero bivalente con dos cadenas compuestas de scFvs, un anticuerpo de tiburón, un anticuerpo compuesto de marco de primate del nuevo mundo más CDR de primate no del nuevo mundo o un constructo dimerizado que comprende CH_3 +V +V_{LH} .

En determinadas modalidades, una fracción de unión a diana incluye receptores de células T (TCR). Los TCR son proteínas heterodiméricas ancladas a la membrana y unidas por disulfuro que normalmente constan de las cadenas alfa (a) y beta (b) altamente variables expresadas como parte de un complejo con las moléculas de cadena CD3 invariantes en la superficie de las células T. Un paso importante en el proceso de formación del heterodímero TCR se denomina "emparejamiento". Las células T que expresan receptores emparejados se denominan células T a:b (o ab), aunque una minoría de células T expresan un receptor alternativo, formado por cadenas gamma (g) y delta (d) variables, denominadas células T gd. Cada cadena del TCR se compone de dos dominios extracelulares: Una región variable (V) y una región constante (C), ambas pertenecientes al dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas (lgSF) que forman láminas b antiparalelas. La región constante se encuentra proximal a la membrana celular, seguida de una región transmembrana y una corta cola citoplasmática, mientras que la región variable se une al complejo péptido/CMH de una célula presentadora de antígeno.

Tal como se utiliza en el presente documento, se considera que una fracción de unión a diana **"reconoce y se une específicamente"** a una secuencia diana o epítopo de un antígeno, si tiene una constante de disociación KD al antígeno de 100 μM o menos, preferiblemente 50 μM o menos, preferiblemente 30 μM o menos, preferiblemente 20 μM o menos, preferiblemente 10 μM o menos, preferiblemente 5 μM o menos, más preferiblemente 1 μM o menos, más preferiblemente 900 nM o menos, más preferiblemente 800 nM o menos, más preferiblemente 700 nM o menos, más preferiblemente 600 nM o menos, más preferiblemente 500 nM o menos, más preferiblemente 400 nM o menos, más preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 200 nM o menos, aún más preferiblemente 100 nM o menos, aún más preferiblemente 90 nM o menos, aún más preferiblemente 80 nM o menos, aún más preferiblemente 70 nM o menos, aún más preferiblemente 60 nM o menos, aún más preferiblemente 50 nM o menos, aún más preferiblemente 40 nM o menos, aún más preferiblemente 30 nM o menos, aún más preferiblemente 20 nM o menos, y aún más preferiblemente 10 nM o menos.

En el contexto de la presente divulgación, el término "**sal o solvatos farmacéuticamente aceptables**" incluye sales de adición ácida, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o

formados con ácidos orgánicos como el ácido glicólico, el ácido pirúvico, el ácido láctico, el ácido malónico, el ácido málico, el ácido inaleico, el ácido fumárico, el ácido tartárico, el ácido cítrico, el ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, el ácido cinámico, el ácido mandélico, el ácido metano sulfónico, el ácido etanosulfónico, el ácido 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, 2-naftalenosulfónico, 4-toluenosulfónico, alcanfor sulfónico, laurilsulfúrico, glucónico, glutámico, salicílico, mucónico y similares. El término incluye además sales básicas de adición formadas con las bases conjugadas de cualquiera de los ácidos inorgánicos enumerados anteriormente, en las que las bases conjugadas comprenden un componente catiónico seleccionado entre Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, y $NHgR'_{4-g}{}^+$; donde R' es un alquilo C $_{1-3}$ y g es un número seleccionado entre 0, 1, 2, 3 o 4, así como formas de adición de disolvente (es decir, solvatos) de la sal de adición de ácido respectiva.

En el presente documento, **"tratar"** o **"tratamiento"** de una enfermedad o trastorno significa lograr uno o más de los siguientes objetivos: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de los síntomas característicos del trastorno o trastornos tratados; (c) inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno o trastornos tratados; (d) limitar o prevenir la reaparición del trastorno o trastornos en pacientes que hayan padecido previamente el trastorno o trastornos; y (e) limitar o prevenir la reaparición de los síntomas en pacientes que hayan padecido previamente el trastorno o trastornos.

Tal como se utiliza en el presente documento, por **"paciente**" se entiende cualquier mamífero o ave que pueda beneficiarse de un tratamiento con los conjugados de fármacos de unión a dianas descritos en el presente documento. Preferiblemente, un "paciente" se selecciona del grupo que consiste en animales de laboratorio (por ejemplo, ratón o rata), animales domésticos (incluidos, por ejemplo, cobaya, conejo, pollo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro) o primates, incluidos los seres humanos. Se prefiere especialmente que el "paciente" sea un ser humano.

Una **"cantidad terapéuticamente eficaz"** es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr el fin previsto. La cantidad eficaz de un agente terapéutico determinado variará en función de factores como la naturaleza del agente, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que va a recibir el agente terapéutico y la finalidad de la administración. La cantidad efectiva en cada caso individual puede determinarse empíricamente por una

persona versada en la materia según métodos establecidos en la técnica.

Además de las definiciones anteriores, y a menos que el contexto requiera claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras "**comprende**", "**que comprende**" y similares deben interpretarse en un sentido inclusivo en contraposición a un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de "que incluye, pero no se limita a".

Además, la referencia a lo largo de esta especificación a "**una modalidad**", "**algunas modalidades**" o "**una modalidad**" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la modalidad está incluida en al menos una modalidad de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases "en una modalidad", "en algunas modalidades" o "en una modalidad" en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma modalidad, pero pueden hacerlo. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada, como sería evidente para un experto en la materia a partir de esta divulgación, en una o más modalidades.

A menos que se especifique lo contrario, el uso de los adjetivos ordinales "**primero**", "**segundo"**, "**tercero**", etc., para describir un objeto común, sólo indican que se hace referencia a diferentes instancias de objetos similares y no pretenden implicar que los objetos descritos deban estar en una secuencia determinada, ya sea temporal, espacial, de clasificación o de cualquier otra manera.

Tal y como se utiliza aquí, el término "**ejemplar**" se emplea en el sentido de proporcionar ejemplos, en contraposición a indicar calidad. Es decir, una "**modalidad ejemplar"** es una modalidad proporcionada como ejemplo, en lugar de ser necesariamente una modalidad de calidad ejemplar.

Tal como se utiliza aquí, el coeficiente de partición, abreviado PC, se define como una relación particular de las concentraciones de un soluto entre dos disolventes (una bifase de fases líquidas), específicamente para solutos no ionizados, y el logaritmo de la relación es, por tanto, *log P*. Cuando uno de los disolventes es agua y el otro es n-octanol, el valor *log P* es una medida de la lipofilia o hidrofobicidad. (véase Comer J, Tam K (2001). "Lipophilicity Profiles: Theory and Measurement", en Testa B, van de Waterbed H, Folkers G, Guy R, Comer J, Tam K (eds.). *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research:* Biological, Physicochemical, and Computational Strategies. Weinheim: Wiley-VCH. pp. 275-304).

A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. Cada uno de los documentos citados en el presente documento (incluidas todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, presentaciones de secuencias de números de acceso de GenBank, etc.), ya sea supra - o infra, se incorpora por referencia en su totalidad en la medida de lo posible en virtud de la ley de patentes respectiva.

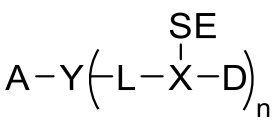
Compuestos enlazadores modulares

Los inventores de la presente invención han desarrollado un compuesto enlazador modular que comprende módulos (es decir, también denominados grupos, unidades, elementos, etc.) que han sido implicados con respecto a la función y eficacia del conjugado de fármaco de unión a diana (TBDC), y que pueden ensamblarse fácilmente de forma combinatoria para proporcionar el compuesto enlazador modular.

La arquitectura modular del compuesto enlazador modular permite un alto grado de flexibilidad con respecto a los módulos seleccionados, de manera que el compuesto enlazador modular puede adaptarse a diversas propiedades fisicoquímicas de las sustancias farmacológicas citotóxicas pertinentes, pero también de la fracción de unión a la diana a la que se va a conjugar el compuesto enlazador modular. Por lo tanto, se descubrió que, de una manera relativamente sencilla, el compuesto de enlazador modular de la presente divulgación permite la generación de un TBDC dirigido a un antígeno seleccionado asociado al cáncer o específico del cáncer y que comprende la sustancia farmacológica citotóxica de elección en el tratamiento del tipo de cáncer particular.

Además, y como se pondrá de manifiesto en la descripción que figura a continuación, gracias a la química de conjugación empleada en el compuesto enlazador modular, es posible generar fácilmente TBDC con un grado de etiquetado (DOL) y una relación fármaco-anticuerpo (DAR) homogéneos.

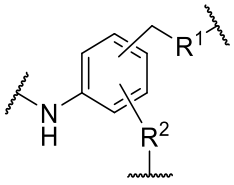
En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto enlazador modular de Fórmula (I)



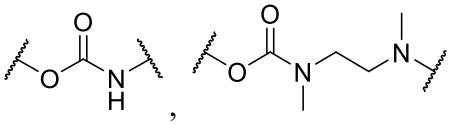
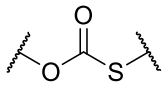
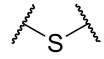
Fórmula (I)

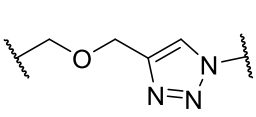
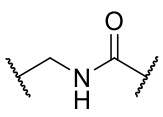
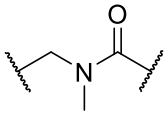
o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

donde:

X es un espaciador autoinmolante, 

donde:

R^1 une covalentemente X a D en para, meta u orto al grupo amino de X y es un enlace,    o  ; y

R^2 conecta X a SE y es    o -O-;

D es una sustancia farmacéuticamente activa;

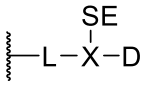
SE es un grupo potenciador de la solubilidad;

L es un espaciador que comprende un péptido unido covalentemente a X;

n es un número entero de al menos 2;

Y es una unidad de ramificación; y

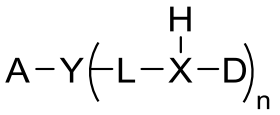
A es una fracción reactiva para conjugación con una fracción de unión a diana.

El componente  de Fórmula (I) se repite al menos dos veces en el compuesto de enlazador modular de este primer aspecto (es decir, n es un número entero de al menos 2), pero preferiblemente entre 2 y 5 veces, como 2, 3, 4 o 5 veces. Este aumento ventajoso de la DOL de un único compuesto de enlazador modular depende del núcleo multimérico del compuesto definido por el grado de ramificación observado en la unidad de ramificación Y.

Como se ha definido anteriormente, el espaciador autoinmolante del compuesto enlazador modular de la presente invención es un espaciador para-aminobencílico u ortoaminobencílico, que está conectado de forma estable a la sustancia farmacológica citotóxica D, así como al grupo potenciador de la solubilidad SE, y que experimenta una autoinmolación

desencadenada, es decir, una descomposición, de forma que al menos la sustancia farmacológica citotóxica D se libera como metabolito de la reacción autoinmolante sin que ninguna molécula química del compuesto enlazador permanezca unida al fármaco. Específicamente, en algunas modalidades, el grupo amino de un espaciador para-aminobencílico sirve como donante de electrones en la cascada de electrones de la reacción autoinmolante 1,6 que libera la sustancia farmacológica citotóxica D. Ventajosamente, este mecanismo de liberación sin trazas garantiza que la sustancia farmacológica citotóxica no se altere a través de su conexión y posterior liberación del compuesto enlazador.

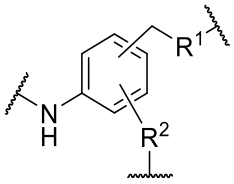
En una modalidad específica del primer aspecto, si el ClogP de la carga útil (D) es -1 o inferior, la presente invención se refiere a un compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia)



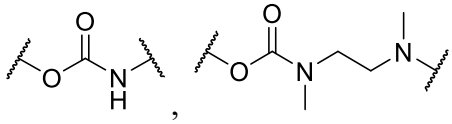
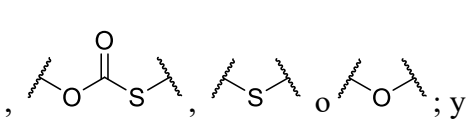
Fórmula (Ia)

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

donde:

X es un espaciador autoinmolante, 

donde:

R^1 une covalentemente X a D en para, meta u orto al grupo amino de X y es un enlace,  ,  , , o ; y

R^2 es H

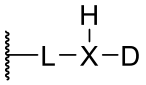
D es una sustancia farmacéuticamente activa;

L es un espaciador que comprende un péptido unido covalentemente a X;

n es un número entero de al menos 2;

Y es una unidad de ramificación; y

A es una fracción reactiva para conjugación con una fracción de unión a diana.

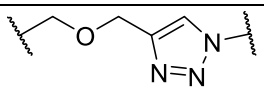
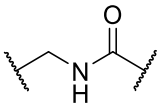
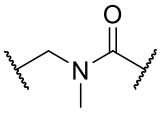
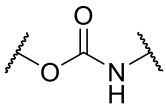
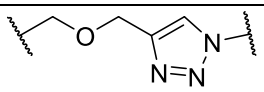
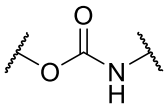
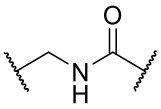
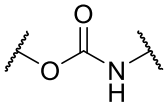
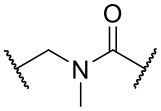
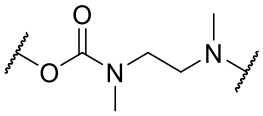
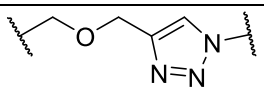
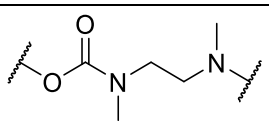
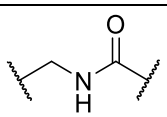
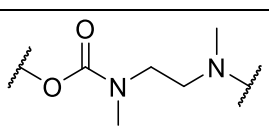
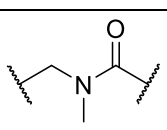
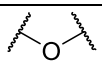
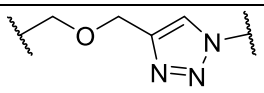
El componente  de Fórmula (Ia) se repite al menos dos veces en el compuesto de enlazador modular de este primer aspecto (es decir, n es un número entero de al menos 2), pero preferiblemente entre 2 y 5 veces, como 2, 3, 4 o 5 veces. Este aumento ventajoso de la DOL de un único compuesto de enlazador modular depende del núcleo multimérico del compuesto definido por el grado de ramificación observado en la unidad de ramificación Y.

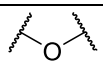
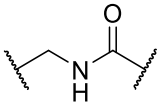
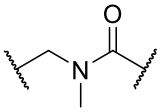
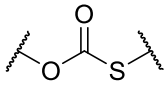
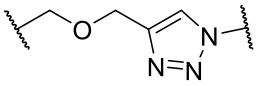
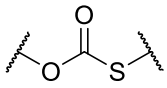
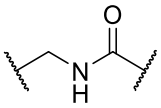
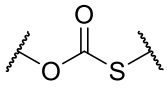
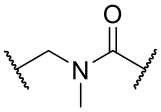
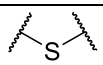
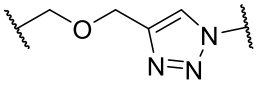
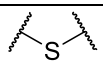
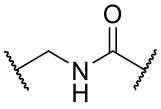
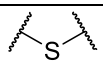
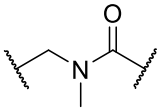
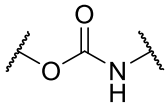
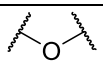
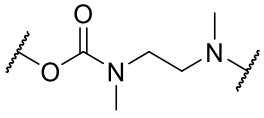
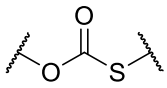
Como se ha definido anteriormente, el espaciador autoinmolante del compuesto enlazador modular de la presente invención es un espaciador para-aminobencílico u ortoaminobencílico, que está conectado de forma estable a la sustancia farmacológica citotóxica D, así como al grupo potenciador de la solubilidad SE, y que experimenta una autoinmolación desencadenada, es decir, una descomposición, de forma que al menos la sustancia farmacológica citotóxica D se libera como metabolito de la reacción autoinmolante sin que ninguna molécula química del compuesto enlazador permanezca unida al fármaco. Específicamente, en algunas modalidades, el grupo amino de un espaciador para-aminobencílico sirve como donante de electrones en la cascada de electrones de la reacción autoinmolante 1,6 que libera la sustancia farmacológica citotóxica D. Ventajosamente, este mecanismo de liberación sin trazas garantiza que la sustancia farmacológica citotóxica no se altere a través de su conexión y posterior liberación del compuesto enlazador.

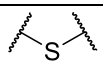
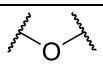
En algunas modalidades, en las que el grupo potenciador de la solubilidad SE también está unido en la posición para- u orto- del espaciador aminobencílico, la reacción autoinmolante también conduce a la liberación del grupo potenciador de la solubilidad. Sin embargo, como se apreciará, en contraste con la liberación de la sustancia farmacológica citotóxica D, la liberación del grupo potenciador de la solubilidad no es de especial relevancia para la funcionalidad y eficacia de un TBDC basado en el compuesto enlazador modular descrito. Por el contrario, un compuesto enlazador modular que comprende el grupo SE enlazado al espaciador autoinmolante en la posición meta del espaciador aminobencílico, y la sustancia farmacológica citotóxica enlazada en la posición adyacente para del espaciador aminobencílico. Sin querer estar limitado por la teoría, es probable que la proximidad del grupo potenciador de la solubilidad SE y la sustancia farmacológica citotóxica D conduzca a un mejor enmascaramiento de las propiedades lipofílicas/hidrofóbicas de la sustancia farmacológica, de modo que aumente aún más la solubilidad del compuesto enlazador

modular.

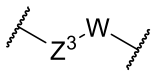
En modalidades preferidas, el espaciador inmolante X es uno de X1,1 a X1,3, X2,1 a X2,3, X3,1 a X3,3 y X4,1 a X4,3 que comprende una de las combinaciones específicas de R^1 y R^2 como se muestra en la tabla directamente a continuación:

Espaciador inmolante X	**R^1 (en para)**	**R^2 (en meta)**
1,1	enlace directo a D	
1,2	enlace directo a D	
1,3	enlace directo a D	
2,1		
2,2		
2,3		
3,1		
3,2		
3,3		
4,1		

4,2		
4,3		
5,1		
5,2		
5,3		
6,1		
6,2		
6,3		
Espaciador inmolante X	**R^1 (en meta)**	**R^2 (en orto)**
7,1	enlace directo a D	
7,2		
7,3		
7,4		
7,5		

7,6		

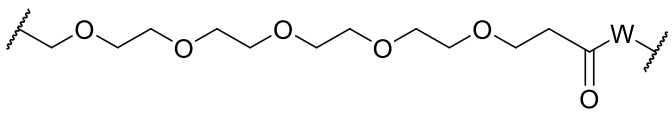
En una o más de las modalidades anteriores L es

 ,

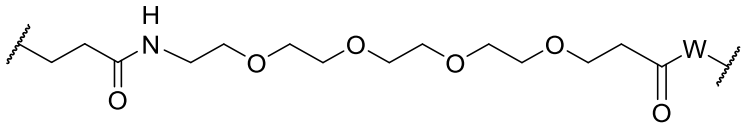
donde:

W es una secuencia peptídica escindible o no escindible seleccionada del grupo formado por: Val-Ala, Val-Cit, Met-Thr, Thr-Thr, Phe-Lys, Glu-Val-Ala, Glu-Val-Cit, Gly-Gly-Phe-Gly, Gly-Gly-Tyr-Gly, cBu-Ala, cBu-Cit, Glu-cBu-Ala, Glu-cBu-Cit, Asp-cBu-Ala, Asp-cBu-Cit, Asp-Pro-Val, Asn-Pro-Val, iGlu-cBu-Ala, iGlu-cBu-Cit, Val-Lys, Val-Arg, Val-Gln, Val-Met, Val-Thr, AcLys-Val-Cit, AcLys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, iGlu-Val-Ala, Asp-Val-Cit, iGlu-Val-Cit, Tyr-Arg, Tyr-Met, Phe-Cit, Phe-Ala, Phe-Arg, Phe-Met, Phe-Gln, Phe-Arg-Arg-Gly, Phe-Arg-Arg-Leu, Phe-Arg-Arg-Leu-Gly, Phe-Leu-Arg-Arg-Gly, Ala-Lys, Leu-Cit, Leu-Gln, Ile-Cit, Ala-Ala-Asn, Ala-Asn, Ala-Ala, Asn-Asn, Asn, beta-Ala, y Lys o sus combinaciones; y en donde Z^3 es un enlace o un espaciador que comprende una cadena de alquilo C_{1-20} o un polietilenglicol $(PEG)_{1-10}$ o un C_2-amida-PEG_{1-10}

Preferiblemente L es



o



.

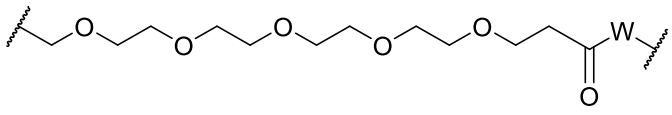
La secuencia peptídica W escindible de L anterior es una diana para una proteasa lisosomal, de tal manera que un TBDC internalizado después de reconocer y unirse a la secuencia diana o antígeno diana y que comprende el compuesto enlazador modular de la presente invención se convierte en un sustrato para una proteasa lisosomal. En los lisosomas humanos, las proteasas predominantes son proteasas de cisteína de la familia de las catepsinas, incluidas las catepsinas B, C, D, H, L, S y Z. Otras proteasas lisosomales humanas relevantes implicadas en la degradación de proteínas lisosomales incluyen: Legumain (también conocida como asparaginil endopeptidasa (AEP)), que es una endopeptidasa de asparagina; Proteasa 1

insensible a la pepstatina, Proteasa A sensible a la pepstatina y Proteasa B insensible a la pepstatina, todas las cuales son proteasas aspárticas. Preferiblemente, la secuencia peptídica W es escindible por la catepsina B. Una vez escindida la secuencia peptídica W de L, se desencadena la cascada de electrones de la reacción autoinmolante, que conduce a la liberación sin trazas de la sustancia farmacológica del espaciador X autoinmolante.

La secuencia peptídica escindible W es la secuencia a la que se dirigen las proteasas lisosomales mencionadas anteriormente y puede comprender aminoácidos no proteinógenos como la citrulina (Cit) o aminoácidos modificados como el éster butílico de la cisteína (cBu), isómeros de aminoácidos no naturales como el ácido isoaspártico-glutámico (iGlu) o la N-acetil-lisina (AcLys). Como se ha descrito, una vez escindido, se inicia la cascada de electrones que conduce a la eliminación del espaciador autoinmolante y a la liberación sin trazas de la sustancia D del fármaco. En una modalidad preferida, el dipéptido valina-alanina (Val-Ala) constituye W. En una modalidad preferida alternativa, el dipéptido valina-citrulina (Val-Cit) constituye W. En otra modalidad preferida, el dipéptido fenilalanina-lisina (Phe-Lys) constituye W. En otra modalidad preferida, W comprende el tripéptido ácido glutámico-valina-alanina (Glu-Val-Ala) o ácido glutámico-valina-citrulina (Glu-Val-Cit).

En algunas modalidades, Z^3 es un enlace que conecta directamente L con la unidad de ramificación Y. En modalidades alternativas, Z^3 comprende: una cadena de alquilo C_{1-20}, preferiblemente una cadena de alquilo C_{2-18} o una cadena de alquilo C_{4-16} o una cadena de alquilo C_{6-14} o una cadena de alquilo C_{8-12} ; o un polietilenglicol de 1 a 10 $(PEG)_{1-10}$, preferiblemente un PEG_{2-8} o un PEG_{4-6} o un PEG_5; o un C_2-amida-PEG_{1-10}, preferiblemente un C_2-amida-PEG_{2-8} o un C_2-amida-PEG_{2-6} o un C_2-amida-PEG_4.

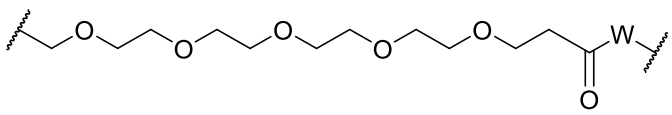
Como tal, en una modalidad preferida, L es



,

donde W es Val-Ala.

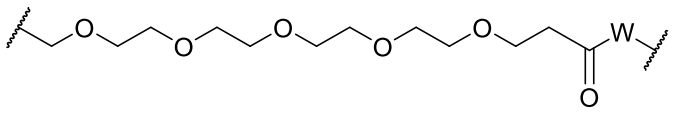
En otra modalidad preferida, L es



,

donde W es Val-Cit.

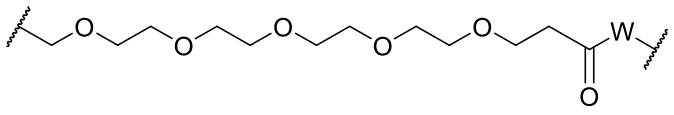
En otra modalidad preferida, L es



,

donde W es Phe-Lys.

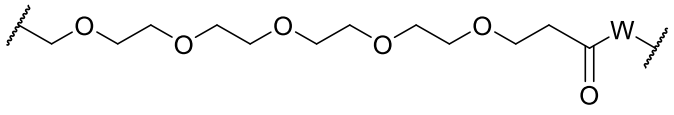
En otra modalidad preferida, L es



,

donde W es Glu-Val-Ala.

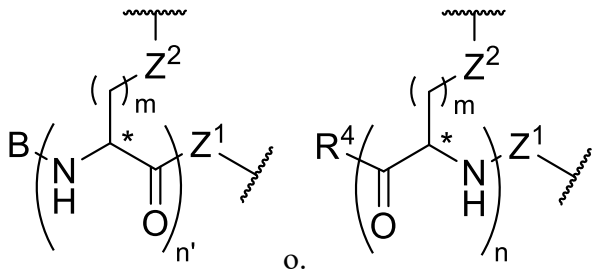
En otra modalidad preferida, L es



,

donde W es Glu-Val-Cit.

En algunas modalidades, Y del compuesto enlazador modular del primer aspecto es:

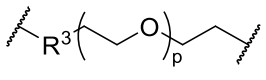


o.

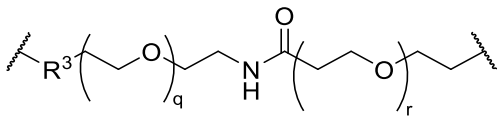
En tales modalidades:

m es un número entero entre 1 y 6, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

Z^1 conecta Y con A y es



o



donde

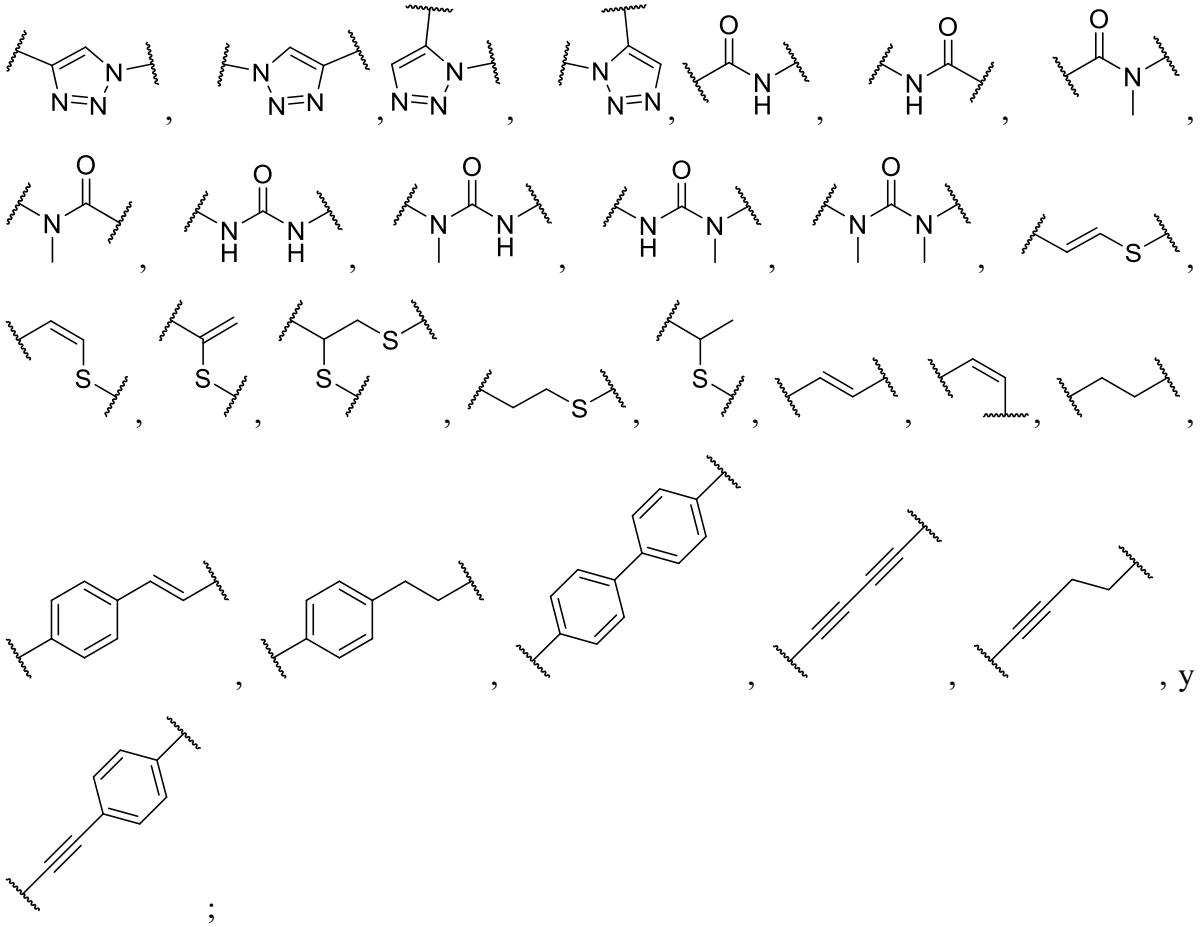
R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH_3)C(=O)-, y

p es un número entero entre 1 y 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, de 4 a 16, de 6 a 14 o de 8 a 12,

q es un número entero entre 1 y 8, como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8,

r es un número entero entre 1 y 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, de 4 a 16, de 6 a 14, de 8 a 12, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

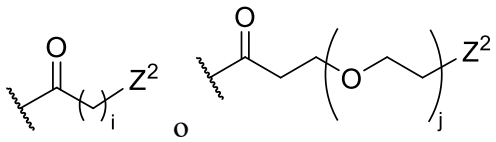
Z^2 conecta Y a L y se selecciona del grupo formado por:



;

B es:

– una caperuza, preferiblemente un grupo acilo, y n' es n; o

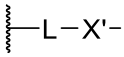


, donde

i es un número entero entre 1 y 20,

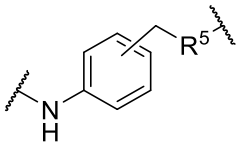
j es un número entero comprendido entre 1 y 10, y

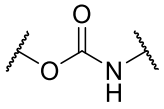
n' es n menos 1; o

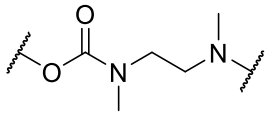
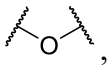


donde

D' es una sustancia farmacéuticamente activa diferente de D; y

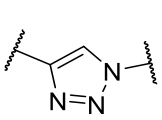
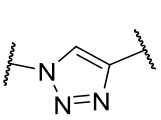
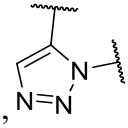
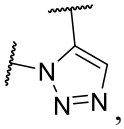
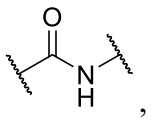
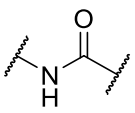
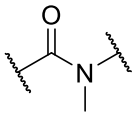
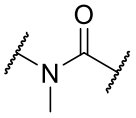
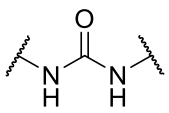
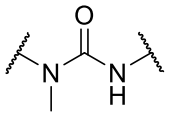
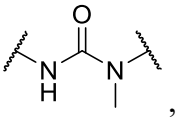
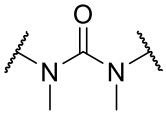
X' es el espaciador autoinmolante  , donde:

R^5 une covalentemente X' a D' en para u orto al grupo amino de X' y es un enlac,, 

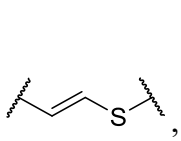
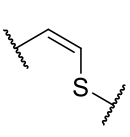
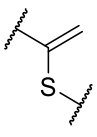
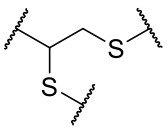
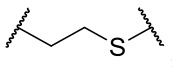
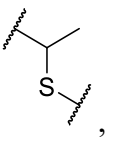
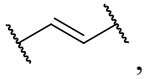
,  o  ,

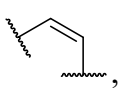
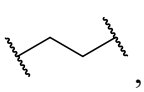
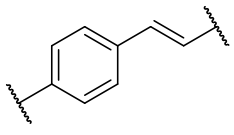
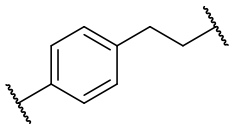
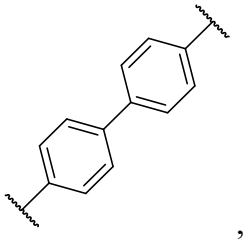
y n' es n; y

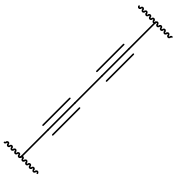
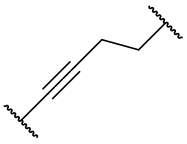
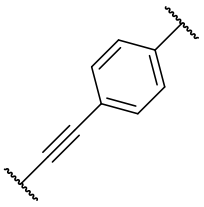
R^4 es OH o NH2

En una modalidad preferida Z^2 es un 1,2,3-triazol, una amida o un derivado de urea seleccionado del grupo que consiste en  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , y  .

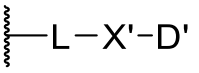
Si Z^2 se selecciona del grupo formado por

 ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,

 ,  ,  ,  ,  ,

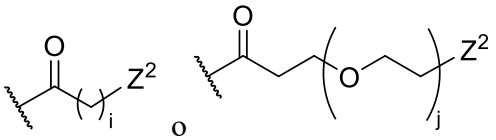

,

, y

;

puede unirse o utilizarse en reacciones tiol-ino/eno, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado como, por ejemplo, acoplamiento de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y Glaser.

En algunas modalidades, en las que B es  Z^3 en L puede comprender además una fracción carbonílica terminal, como un ácido dicarboxílico, para la unión de L al grupo amino de Y.

Independientemente de si B es

una caperuza, preferiblemente un grupo acilo, donde n' es n; o

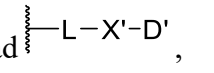

o

, donde

i es un número entero entre 1 y 20, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20,

j es un número entero comprendido entre 1 y 10, por Ejemplo 1. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y

n' es n menos 1; o

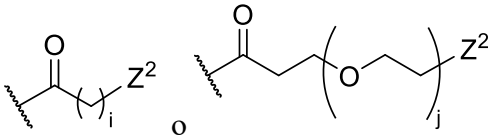
una unidad  ,

B constituye la terminación de la unidad de ramificación final Y en el núcleo multimérico del compuesto enlazador modular en estas modalidades.

Como se ha mostrado anteriormente, el núcleo multimérico puede comprender n'=2 a 5, preferiblemente 2, 3, 4 o 5, unidades de ramificación Y, en las que la unidad de ramificación proximal a A está conectada a A a través de Z^1 y la unidad de ramificación final (es decir, la unidad de ramificación distal a A) comprende B. Cada unidad de ramificación Y en esta modalidad está indirectamente unida a una molécula de una sustancia farmacéutica D a través del espaciador Z^2, el espaciador L y el espaciador inmolante X.

Como tal, el grado de carga (DOL) del compuesto enlazador modular que comprende un

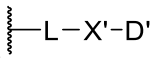
núcleo multimérico que comprende n'= 5 unidades de ramificación Y es o 5, si B es una estructura tipo tapa o 6, si B es

 o , donde

i es un número entero entre 1 y 20,

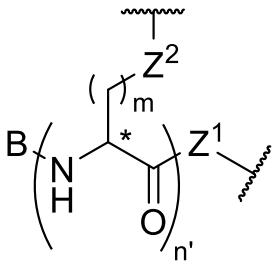
j es un número entero comprendido entre 1 y 10, y

n' es n menos 1; o

una unidad  .

En consecuencia: cuando n'=4, el DOL es 4 o 5, respectivamente; cuando n'=3, el DOL es 3 o 4, respectivamente; y cuando n'=2, el DOL es 2 o 3, respectivamente. Preferiblemente, n'=2, B es un grupo acilo terminal, tal como un grupo acetilo, como tapa, y el DOL del compuesto enlazador modular es 2.

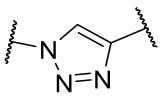
En una modalidad particularmente preferida, la unidad de ramificación Y es

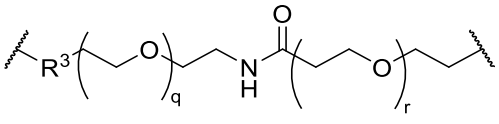


donde:

B es una caperuza acilo, preferiblemente un grupo acetilo,

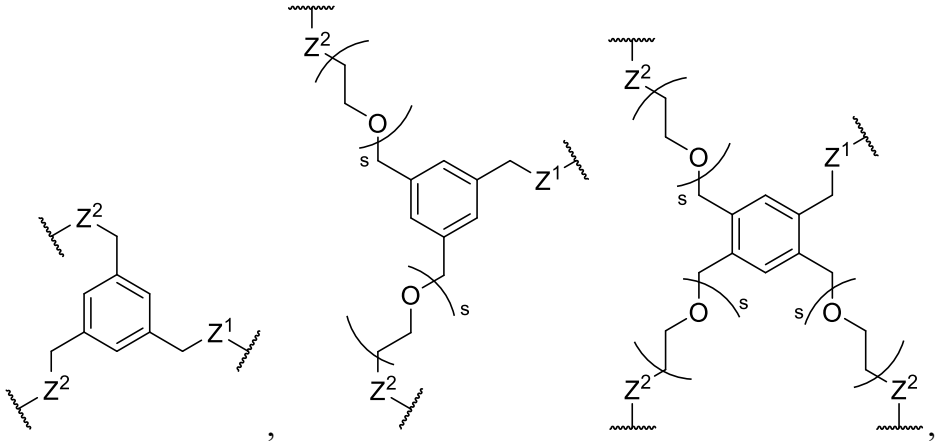
n'=2,

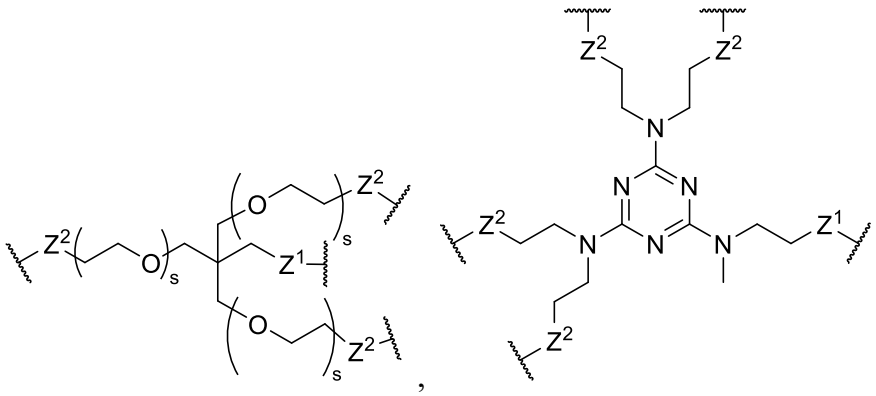
Z^2 es el 1,2,3 triazol  y m=4, y

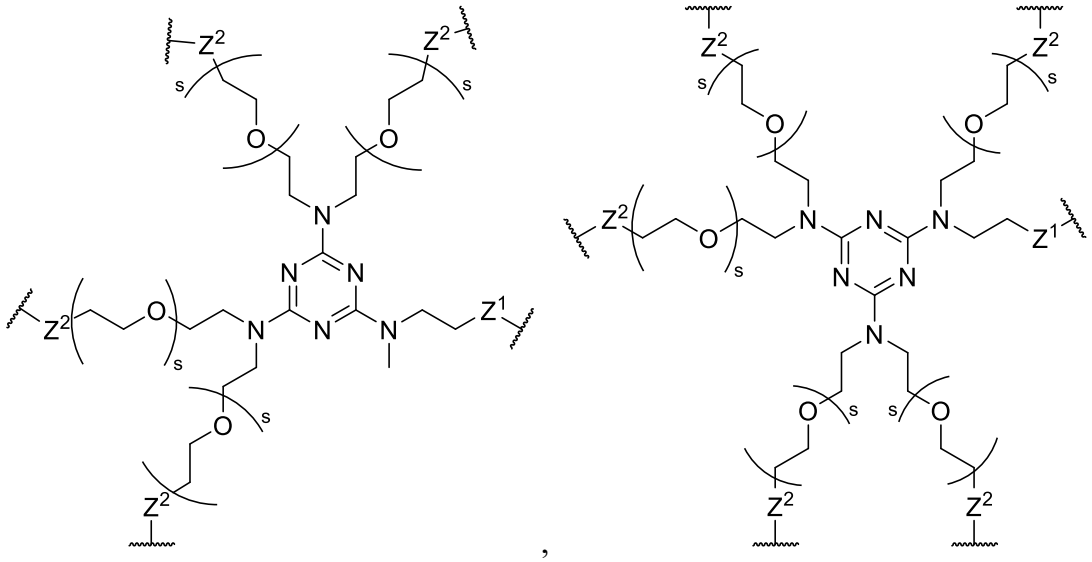
Z^1 es  , donde

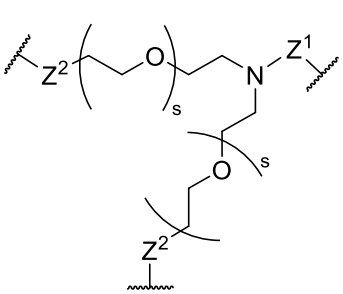
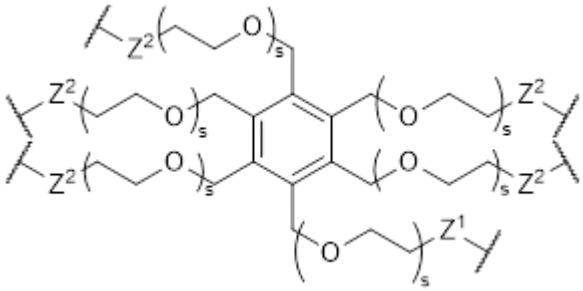
R^3 es -NH-, q=3 y r=4.

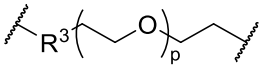
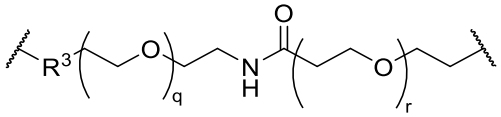
En modalidades alternativas, la unidad de ramificación Y del compuesto enlazador modular del primer aspecto es:








o

;

Z^1 conecta Y a A y es

o

, donde

R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH3)C(=O)-,

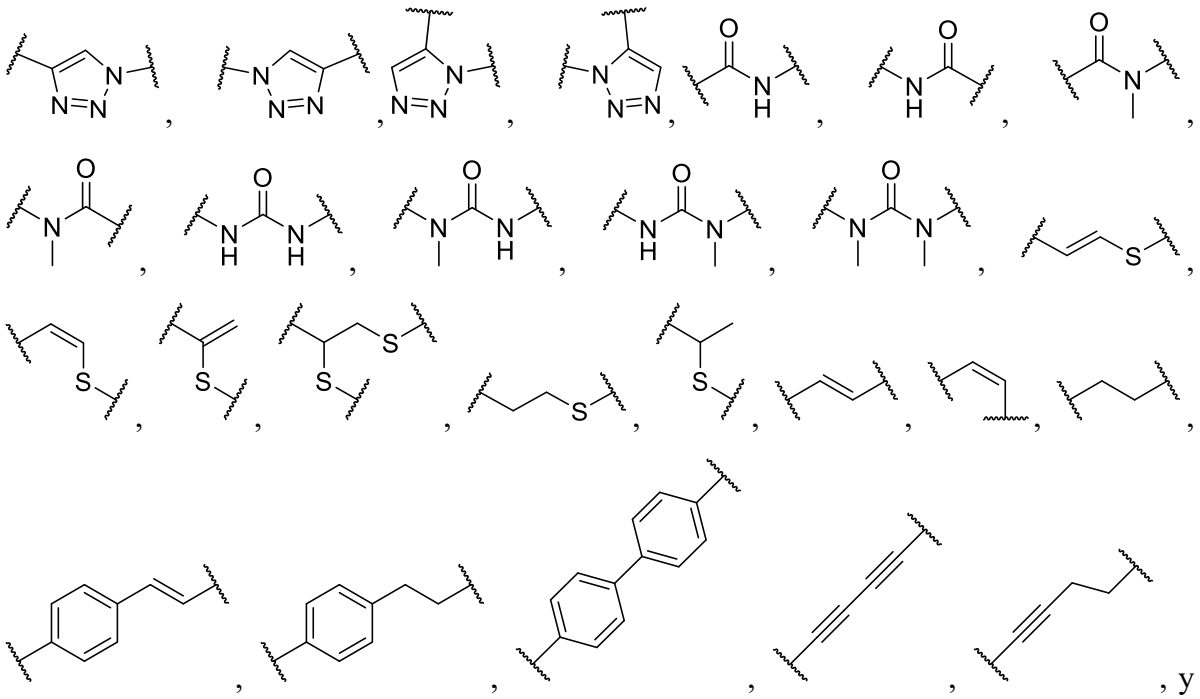
p es un número entero entre 1 y 24, preferiblemente de 4 a 24, más preferiblemente de 8 a 24, como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24;

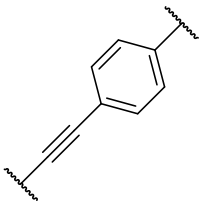
q es un número entero entre 1 y 8, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

r es un número entero entre 1 y 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, de 4 a 16, de 6 a 14, de 8 a 12, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

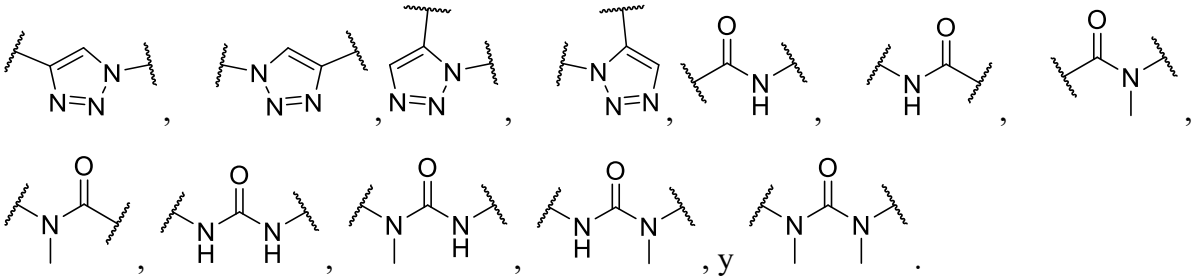
s es un número entero entre 0 y 4, como 0, 1, 2, 3 o 4;

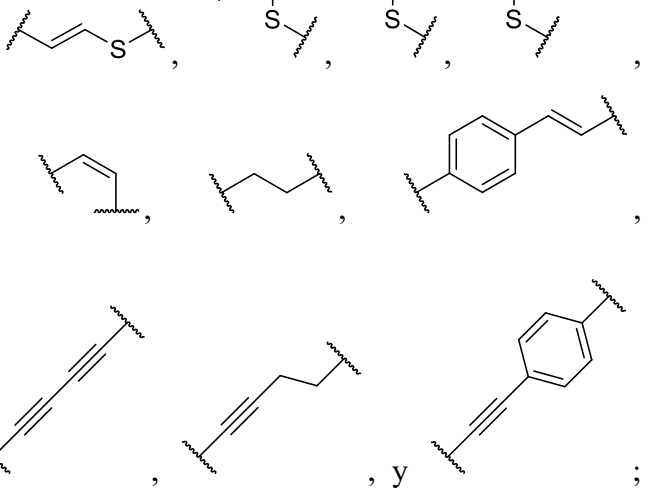
Z^2 conecta Y a L y se selecciona del grupo formado por:


, y


;

En una modalidad preferida Z^2 conecta Y a L y es un 1,2,3-triazol, una amida, una amida o un derivado de urea, seleccionado del grupo que consiste en:


, y .

Si Z^2 se selecciona del grupo formado por 
, y ;

puede unirse o utilizarse en reacciones tiol-ino/eno, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado como, por ejemplo, acoplamiento de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y Glaser.

Dependiendo de cuál de las unidades de ramificación alternativas Y mostradas anteriormente se emplee, el DOL del compuesto enlazador modular de la invención puede ser 2, 3, 4 o 5.

Ventajosamente, los compuestos enlazadores modulares de la presente invención permiten la variabilidad con respecto a la sustancia farmacológica citotóxica del TBDC, de tal manera que se puedan utilizar mecanismos de acción de enterramiento dependiendo del tipo de células cancerosas objetivo y del resultado terapéutico deseado.. Generalmente, las sustancias

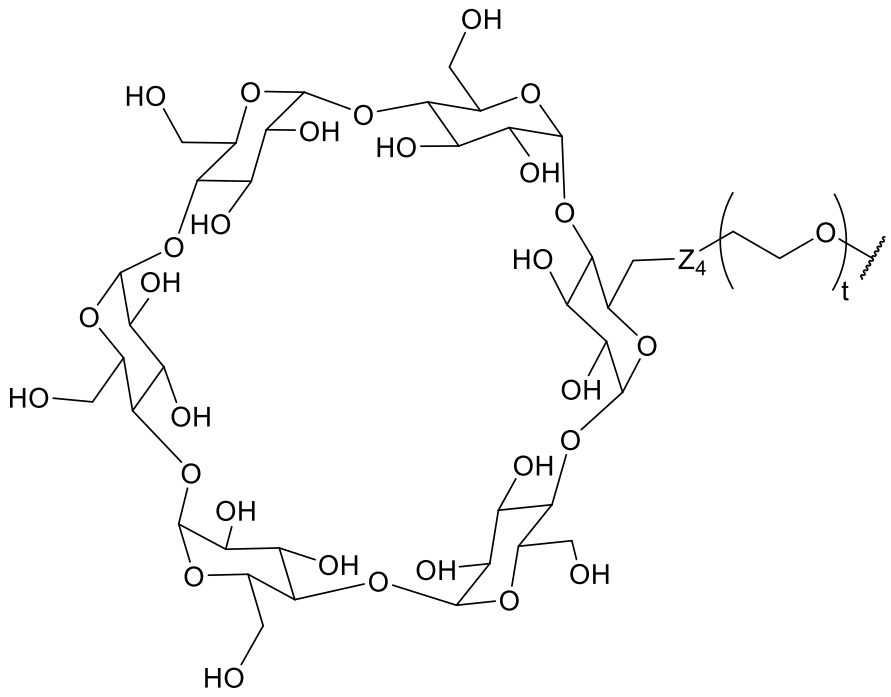
farmacéuticamente activas D y D' son suficientemente potentes para matar o inhibir el crecimiento de las células diana cancerosas a concentraciones relativamente bajas (por ejemplo, en o por debajo de aproximadamente 1μM, 100nM, 10nM, 1nM, 100pM, 10pM, 1pM), al tiempo que tienen un perfil de inmunogenicidad bajo, como para asegurar la tolerancia del paciente. Es importante destacar que suelen ser estables en la circulación sistémica y permanecen unidos al compuesto enlazador.

Por consiguiente, en algunas modalidades del compuesto de enlazador modular de la presente invención, las sustancias farmacéuticamente activas D y D', es decir. la sustancia o sustancias farmacológicas citotóxicas incorporadas en el compuesto de enlazador modular con el DOL descrito anteriormente y que se administrarán a las células diana cancerosas, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: camptotecinas, preferiblemente exatecán, SN38 y topotecán; auristatinas, preferiblemente seleccionadas entre monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF) maitansinoides, seleccionados preferiblemente entre mertansina (DM1) y ravtansina (DM4); calicheamicinas; agonistas del receptor tipo Toll 7 (TLR7); inhibidor de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) ($NAMPT_i$): pirrolobenzodiazepinas (PBD); duocarmicinas; antraciclinas, preferiblemente doxorrubicina; amatoxinas, preferiblemente alfa-amanitina, beta-amanitina, amanina y amaninamida; criptoficinas; faloidinas; seco-ciclopropilpirroloindolina (seco-CPI); seco-ciclopropilbenzoindolina (seco-CBI); taxoles; vinblastinas; inhibidores de HDAC; colchicinas; eribulinas; metotrexato (MTX); triptolida; y sus derivados.

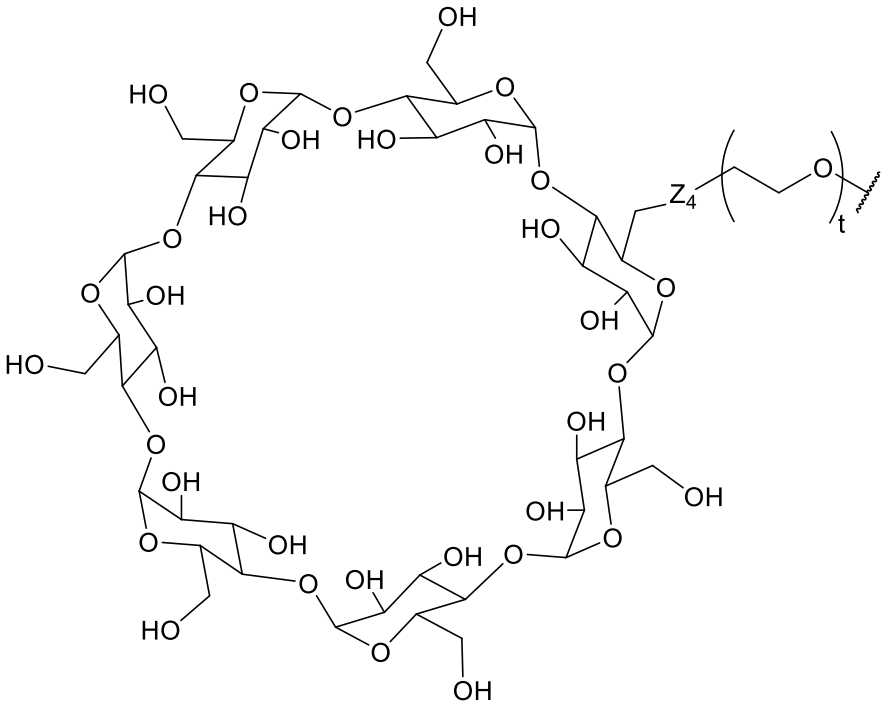
Como también se ha mencionado anteriormente, muchas de estas sustancias pueden sin embargo tener una solubilidad desfavorablemente baja en soluciones acuosas tales como soluciones fisiológicas/sistémicas. Por lo tanto, para evitar la agregación indeseable de los TBDC que comprenden los compuestos enlazadores modulares de la invención, el compuesto enlazador modular comprende necesariamente el grupo potenciador de la solubilidad SE. El grupo potenciador de la solubilidad SE puede ser una alfa-ciclodextrina, una beta-ciclodextrina, una gamma-ciclodextrina, una polisarcosina, un PEG, un galactósido, un glucurónido o un polialcohol de carbohidratos. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de glucosa dispuestas en forma de toroide (donut). Tienen un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo. Esta estructura única les permite formar complejos de inclusión con moléculas hidrófobas o poco solubles y, cuando una sustancia farmacológica

hidrófoba/lipofílica forma un complejo con una ciclodextrina, suele aumentar su solubilidad en una solución acuosa. Por consiguiente, un fármaco activo hidrófobo puede encapsularse en el bolsillo hidrófobo de la ciclodextrina, protegiéndolo del medio acuoso circundante y aumentando así su solubilidad. No obstante, las ciclodextrinas son químicamente compatibles con una amplia gama de sustancias farmacológicamente activas y normalmente no son reactivas con respecto a las moléculas encapsuladas mediante la formación de un complejo de inclusión. Esto permite mantener la estabilidad del complejo y la integridad del principio activo al mismo tiempo.

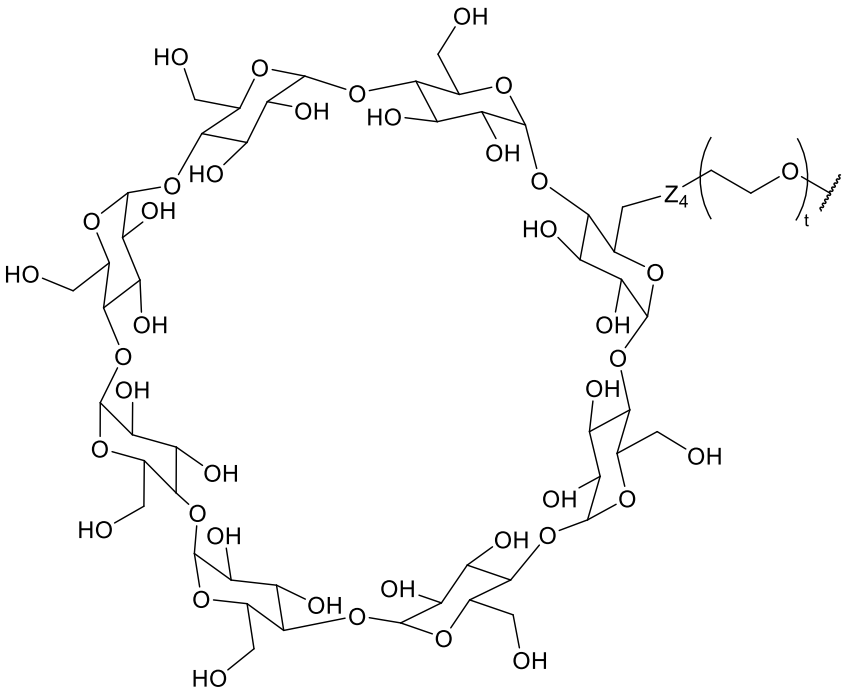
Además, las ciclodextrinas se han utilizado ampliamente en productos farmacéuticos, alimentos y cosméticos durante muchos años y se ha demostrado que sus perfiles generales de seguridad y biocompatibilidad son favorables. Por consiguiente, las ciclodextrinas son grupos SE potenciadores de la solubilidad particularmente adecuados en el contexto de los compuestos enlazadores aquí descritos. Por ejemplo, las alfa-ciclodextrinas (que comprenden seis moléculas de glucosa), las beta-ciclodextrinas (que comprenden siete moléculas de glucosa) y las gamma-ciclodextrinas (que comprenden ocho moléculas de glucosa), cuando se unen a una cadena de PEG directamente o a través de un espaciador Z^4 como:



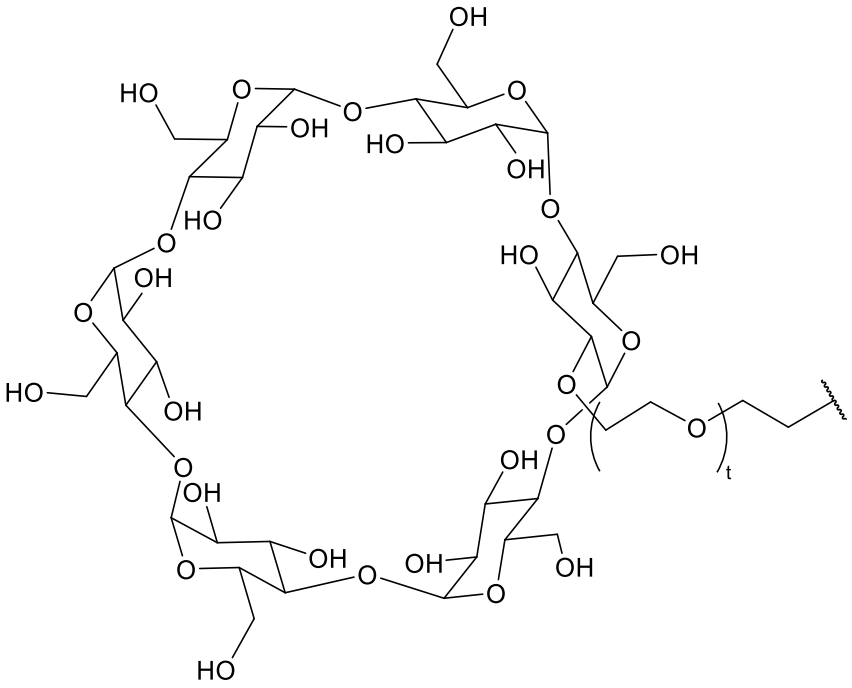
,


OH
HO
O
OH
HO
O
O
HO
OH
O
Z4
O
t
HO
O
OH
O
O
OH
HO
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
O
OH
O
OH
HO
O
OH

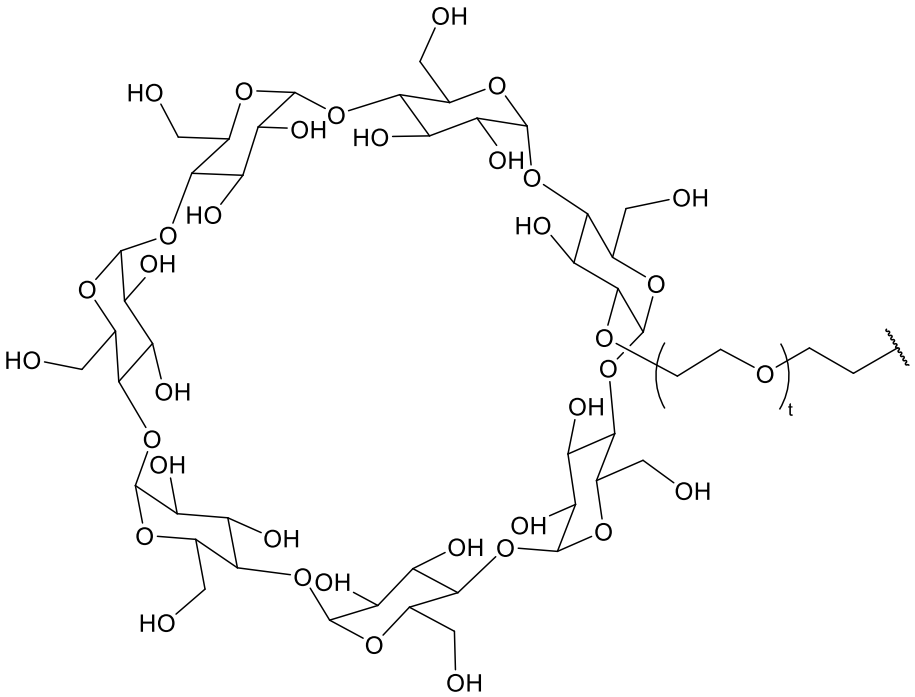
,


OH
HO
O
OH
HO
O
O
HO
OH
O
Z4
O
t
HO
O
OH
O
O
OH
HO
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
O
OH
O
OH
HO
O
OH

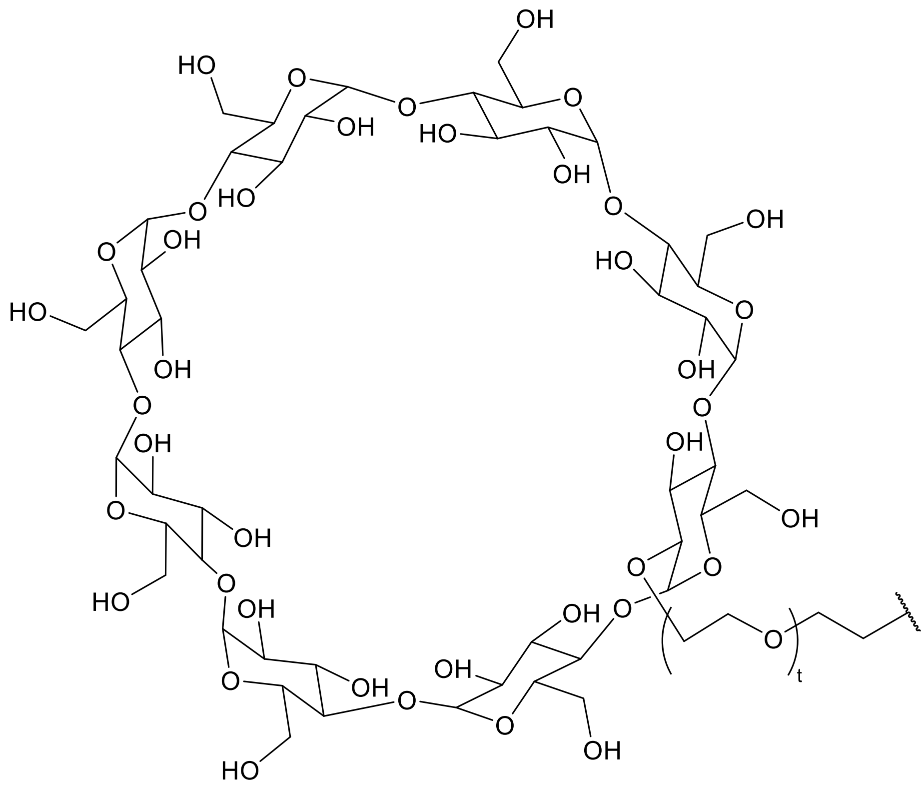
,


OH
HO
O
OH
HO
OH
HO
O
HO
OH
O
OH
O
HO
OH
O
O
O
t
O
OH
OH
O
OH
OH
OH
O
O
OH
HO

,


OH
HO
O
OH
HO
OH
HO
O
OH
O
HO
OH
O
OH
O
O
O
t
O
OH
OH
O
OH
OH
OH
O
O
OH
HO

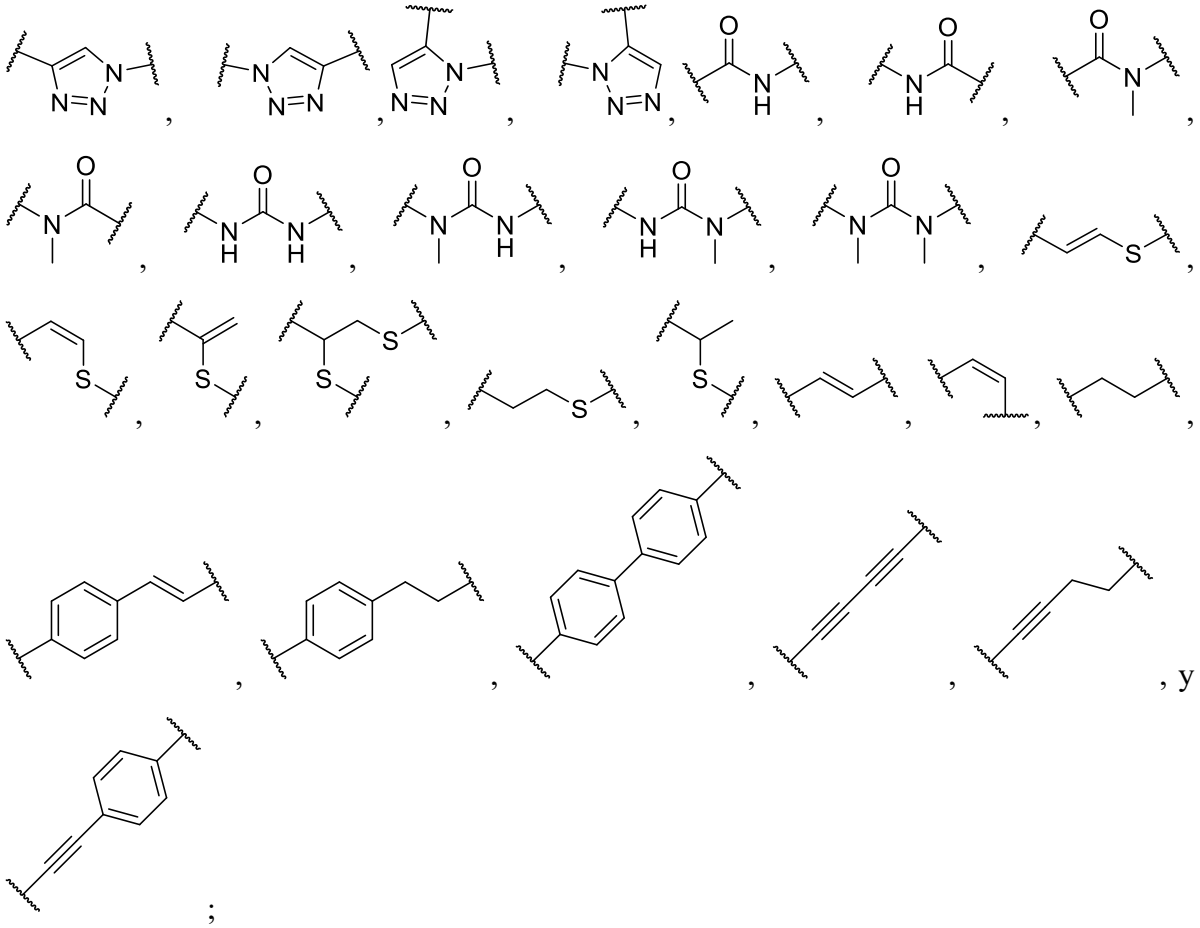
,



OH
HO
O
O
OH
O
HO
HO
OH
O
OH
O
OH
HO
O
HO
OH
HO
OH
O
O
O
OH
OH
O
OH
OH
O
O
O
HO
O
OH
O
OH
OH
O
O
t
O
OH
HO
OH
HO

,

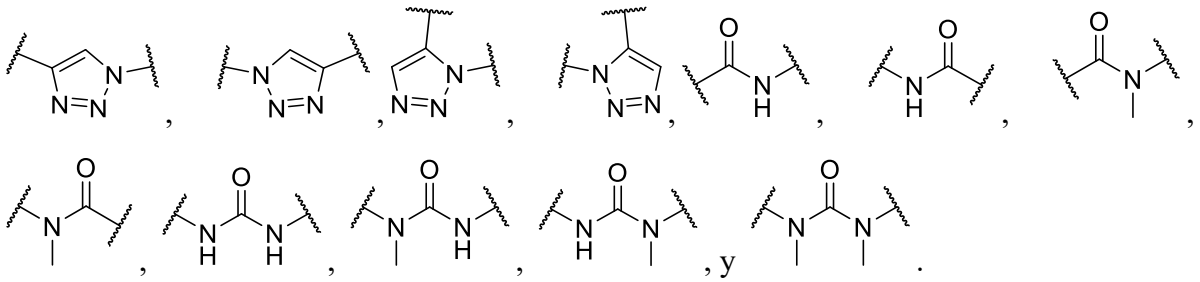
donde Z^4 es



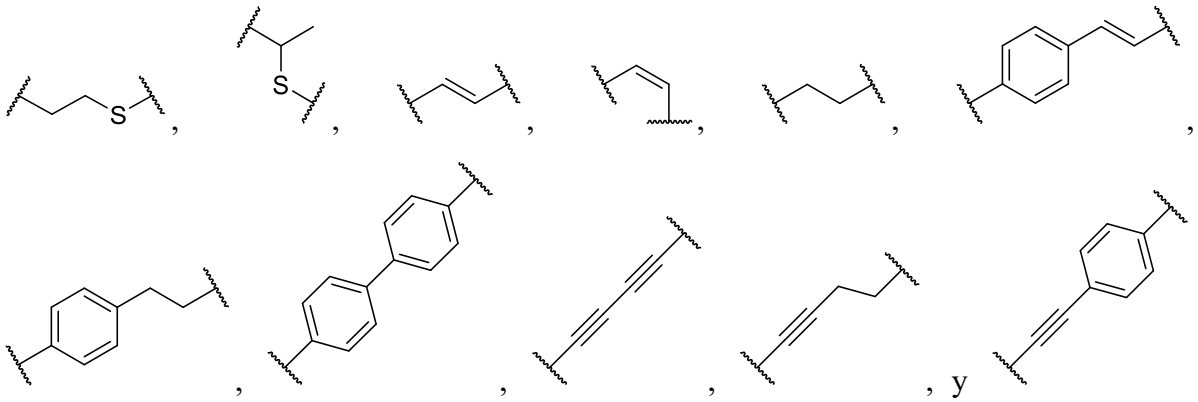
y donde la cadena de PEG comprende entre 2 y 19 PEGs, es decir, donde t es de 2 a 18, de 4 a 16, de 6 a 14 y más preferiblemente de 8, 9, 10, 11 o 12,

constituyen una varianza adecuada del grupo potenciador de la solubilidad SE.

En una modalidad preferida Z^4 es un 1,2,3-triazol, una amida, una amida o un derivado de urea, seleccionado del grupo que consiste en:

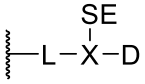


Si Z^4 se selecciona del grupo formado por 



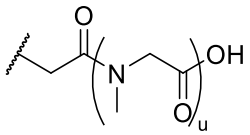
, y

puede unirse mediante o utilizarse en reacciones de tiol-ino/eno-, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado, como por ejemplo las de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y acoplamiento Glaser.

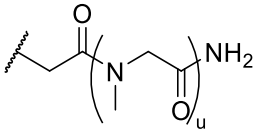
En una modalidad donde la sustancia farmacéutica D dentro de un 

es una camptotecina, es particularmente ventajoso unir un grupo potenciador de ciclodextrina de los tipos ilustrados anteriormente al espaciador X autoinmolante a través de una cadena PEG de 8 a 12 miembros, es decir, donde t=8 a 12 (por ejemplo, 8, 9, 10, 11 o 12). Tales longitudes de cadena de PEG favorecen una disposición conformacional del compuesto enlazador que permite un complejo de inclusión que coloca la sustancia farmacológica lipofílica en el bolsillo de la estructura portadora de ciclodextrina anulando sustancialmente las propiedades hidrofóbicas/lipofílicas de la camptotecina.

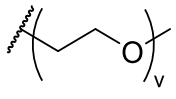
Otros grupos adecuados para mejorar la solubilidad incluyen otros grupos polares como

una polisarcosina 

, donde u es al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 14;

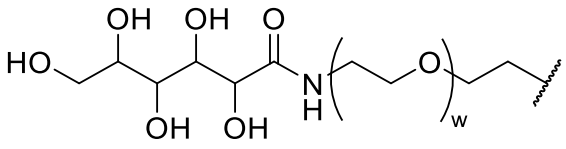
una amida de polisarcosina 

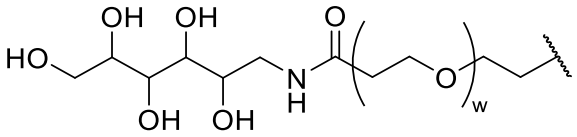
, donde u es al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 14;

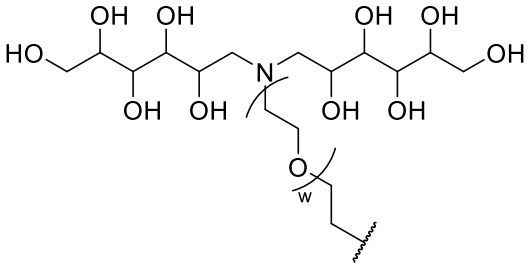
una cadena de PEG 

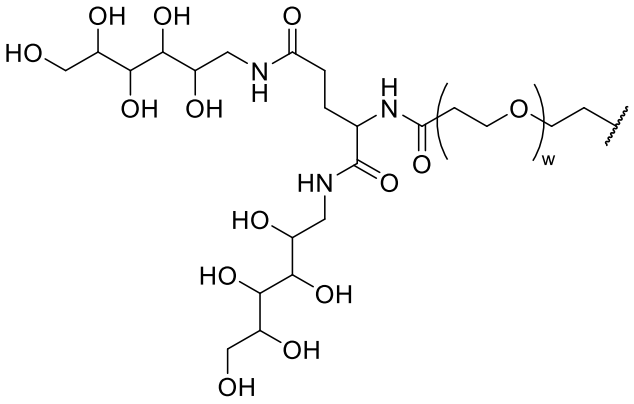
, donde v es de 4 a 24, por ejemplo de 4 a 22, de 4 a 20, de 4

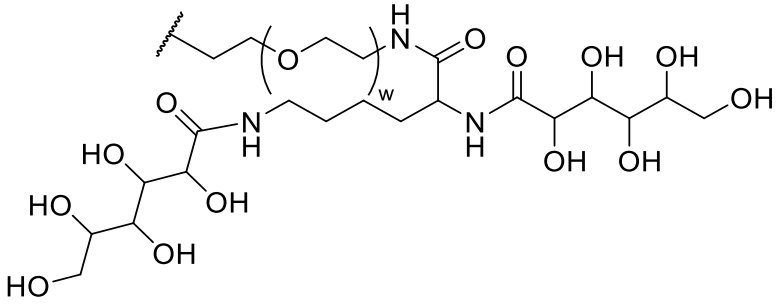
a 18, de 4 a 16, de 4 a 14, de 4 a 12, de 4 a 10 o de 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 o 12;

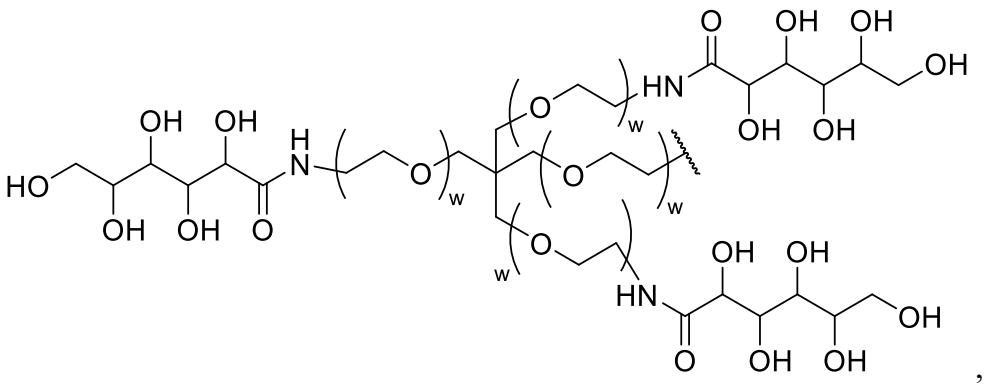
una  ,

una PEG-glucamida  ,

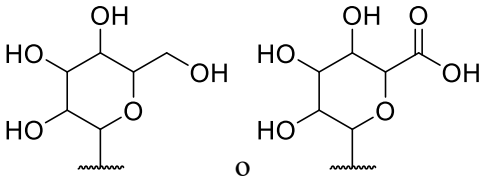
una 

una 

una  ,



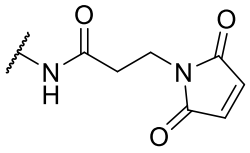
,



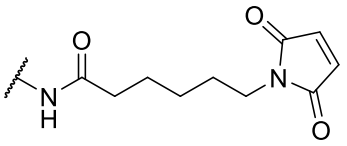
o ;

Donde w es de 2 a 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10 o de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

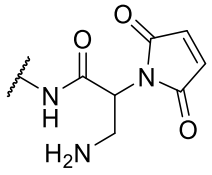
El grupo A reactivo terminal de un compuesto enlazador modular de la presente invención garantiza la conjugación específica y controlada del compuesto enlazador con la fracción de unión a la diana, de manera que puede generarse un TBDC estable. A este respecto, se ha demostrado la utilidad de diversos grupos A reactivos. Por ejemplo, en algunas modalidades, el grupo A reactivo es un grupo tiol-reactivo tal como

un grupo 3-maleimidopropanamida 

,

un grupo 6-maleimidohexanamida 

o

un grupo 3-amino-2-maleimidopropanamida . 

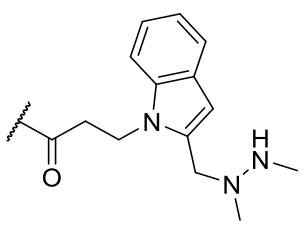
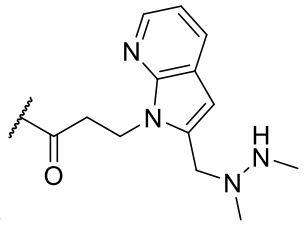
Se ha demostrado que los grupos reactivos tiol proporcionan medios robustos y versátiles para la conjugación de compuestos enlazadores con TBDCs. Permiten la conjugación específica del sitio de los grupos tiol reactivos correspondientes en la fracción de unión a la diana. En

concreto, permiten la conjugación del compuesto enlazador modular de la invención con una fracción de sulfhidrilo natural en la fracción de unión a la diana o con una fracción de sulfhidrilo que se ha introducido en la fracción de unión a la diana mediante ingeniería genética como se describe en, por ejemplo, Junutula Nat Biotechnol. 2008 Aug;26(8):925-32. Preferiblemente, el compuesto enlazador modular descrito en el presente documento se conjuga a través de uno de los grupos tiol-reactivos descritos anteriormente con las fracciones de sulfhidrilo que se han introducido en la región Fc de la fracción de unión a diana a la que se conjuga el enlazador mediante ingeniería genética como se ha descrito en el presente documento, por ejemplo en un anticuerpo que comprende una sustitución D265C (según la numeración UE, Edelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 63 (1969) 78-85.).

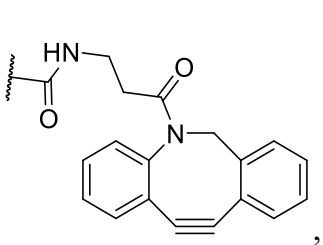
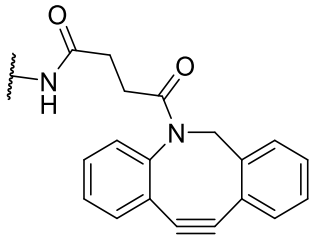
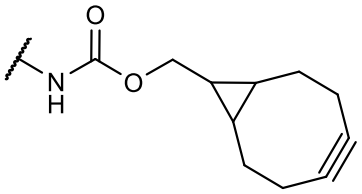
Ventajosamente, las reacciones tiol son muy eficaces y suelen desarrollarse rápidamente en condiciones suaves. Esto significa que los grupos tiol-reactivos pueden formar conjugados rápidamente y con un alto grado de completitud. Además, los enlaces tioéter formados entre los grupos tiol y los grupos tiol reactivos son estables en condiciones fisiológicas. Aunque son menos propensos a la hidrólisis o degradación en comparación con otros tipos de enlaces químicos, se puede conseguir una mayor estabilidad del conjugado mediante la incorporación de un grupo amino básico adyacente a la maleimida, tal como se describe en Lyon *et al.* Nat. Biotechnol. 2014, 32, 1059-1062.

Además, la química tiol-reactiva es altamente flexible, ofreciendo una variedad de grupos tiol-reactivos para ser incorporados en el compuesto enlazador modular, es generalmente biocompatible (es decir, no introduce componentes altamente tóxicos o inmunogénicos en un TBDC), y permite un control preciso sobre la relación fármaco-anticuerpo (DAR) en un TBDC, que es clave para optimizar la eficacia terapéutica y minimizar los efectos fuera de diana como se ha descrito anteriormente.

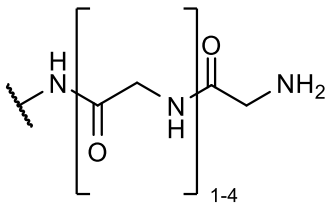
En otras modalidades, el grupo A reactivo puede ser una 3-(2-((1,2-dimetilhidrazinil)metil)-1H-indol-1-il)propanamida o un derivado de 7-aza para la conjugación con la fracción de formilglicina en una fracción de unión diana mediante la ligadura Hidrazino-Pictet-Spengler (HIPS).

En modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser un compuesto seleccionado de DBCO (azadibenzociclooctileno) o BCN (un biciclo[6,1,0]non-4-in-9-ilcarbonilo) que son cicloalquinos tensados, destinados a la conjugación con anticuerpos que contienen azida o modificados, por ejemplo, a través de cadenas laterales de 4-azido-fenilalanina o glicanos modificados con azida, por ejemplo, "SiteClick". En particular, el grupo A reactivo puede ser

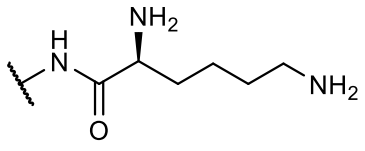




En otras modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser un derivado de glicina, que es particularmente útil para reacciones de acoplamiento enzimático utilizando Sortasa A. Los derivados de glicina ejemplares pueden ser una poliglicina que comprende entre 2-5, por ejemplo 2, 3, 4 y 5, residuos de glicina:



La glicina es un aminoácido particularmente pequeño y su incorporación al compuesto enlazador modular de la invención y, en última instancia, al TBDC que se va a preparar, minimiza los obstáculos estéricos al tiempo que permite una unión flexible sin alterar la estructura del compuesto enlazador ni de la fracción de unión a la diana.

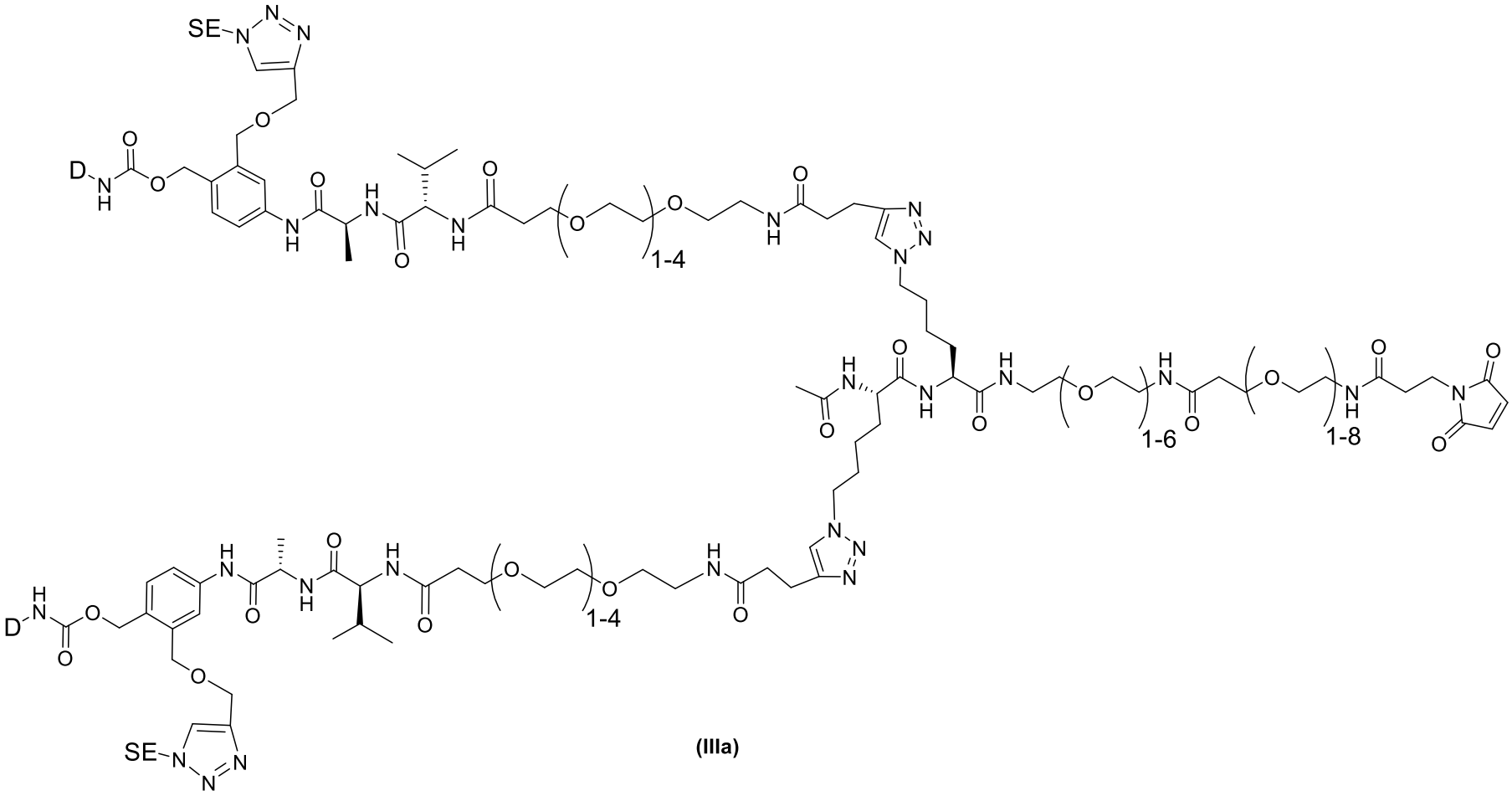
En otras modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser una amina primaria, por

ejemplo, un grupo lisina  o cualquier grupo que comprenda una amina primaria (p. ej., PEG modificado con amino). Tales conjugaciones pueden realizarse, por ejemplo, utilizando transglutaminasas como se describe, por ejemplo, en el documento WO2015/162563 A1.

El uso de un grupo lisina permite la conjugación controlada del compuesto enlazador modular con sitios reactivos correspondientes seleccionados en la molécula de unión a la diana (por ejemplo, un anticuerpo modificado para contener aductos de éster maleimida o N-hidroxisuccinimida (NHS) específicos del sitio) mediante su reacción con el grupo amina primario (-NH_2) de la lisina.

La versatilidad de los residuos de lisina como sitios de conjugación en las moléculas de unión a la diana, como los anticuerpos, los ha hecho valiosos en el desarrollo de ADC, ya que se han utilizado durante mucho tiempo para la unión controlada (aunque estocástica) de fármacos u otras moléculas terapéuticas a anticuerpos. Sin embargo, la modificación específica de residuos concretos dentro de la estructura de la columna vertebral de las moléculas de unión a la diana, de modo que presenten puntos de unión específicos para compuestos enlazadores portadores de lisina, ha demostrado ser útil para generar TBDC con una DOL y una DAR específicas.

En modalidades preferidas, los compuestos enlazadores modulares de la invención se seleccionan entre



(IIIa)

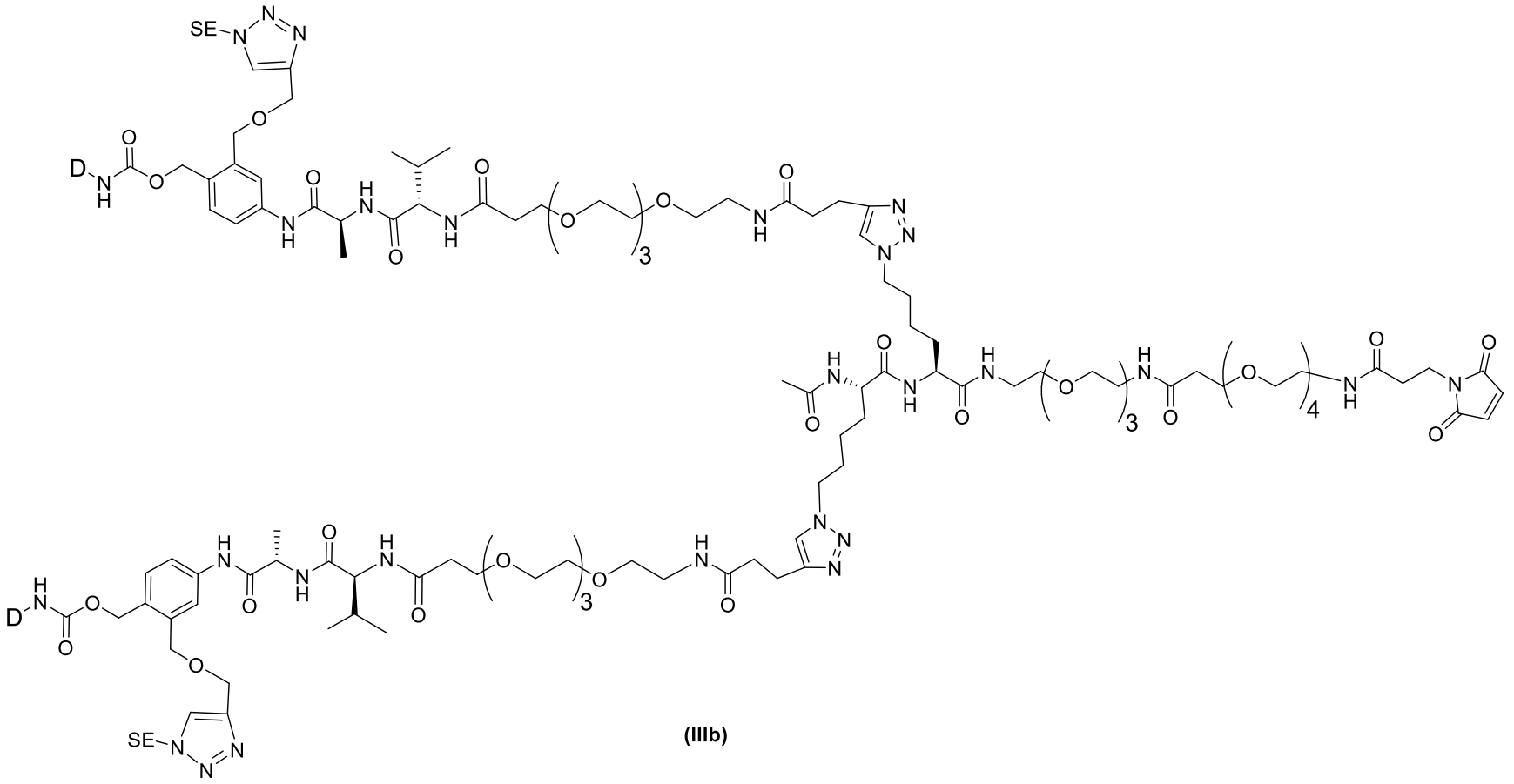
donde

SE es un grupo potenciador de la solubilidad como se ha descrito anteriormente,

D es una sustancia farmacéuticamente activa como se ha descrito anteriormente, preferiblemente D se selecciona entre camptotecinas,

preferiblemente exatecan, SN38 y topotecan; auristatinas, preferiblemente seleccionadas entre monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF); maitansinoides, preferiblemente seleccionados de mertansina (DM1) y ravtansina (DM4); calicheamicinas; agonistas del receptor tipo Toll 7 (TLR7); inhibidor de la nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT)i: duocarmicinas; antraciclinas, preferiblemente doxorrubicina; amatoxinas, preferiblemente alfa-amanitina, beta-amanitina, amanina y amaninamida; faloidinas; seco-ciclopropilpirroloindolina (seco-CPI); seco-ciclopropilbenzoindolina (seco-CBI); taxoles; vinblastinas; colchicinas; triptolida; y sus derivados.

En modalidades más preferidas, los compuestos enlazadores modulares de la invención se seleccionan entre



(IIIb)

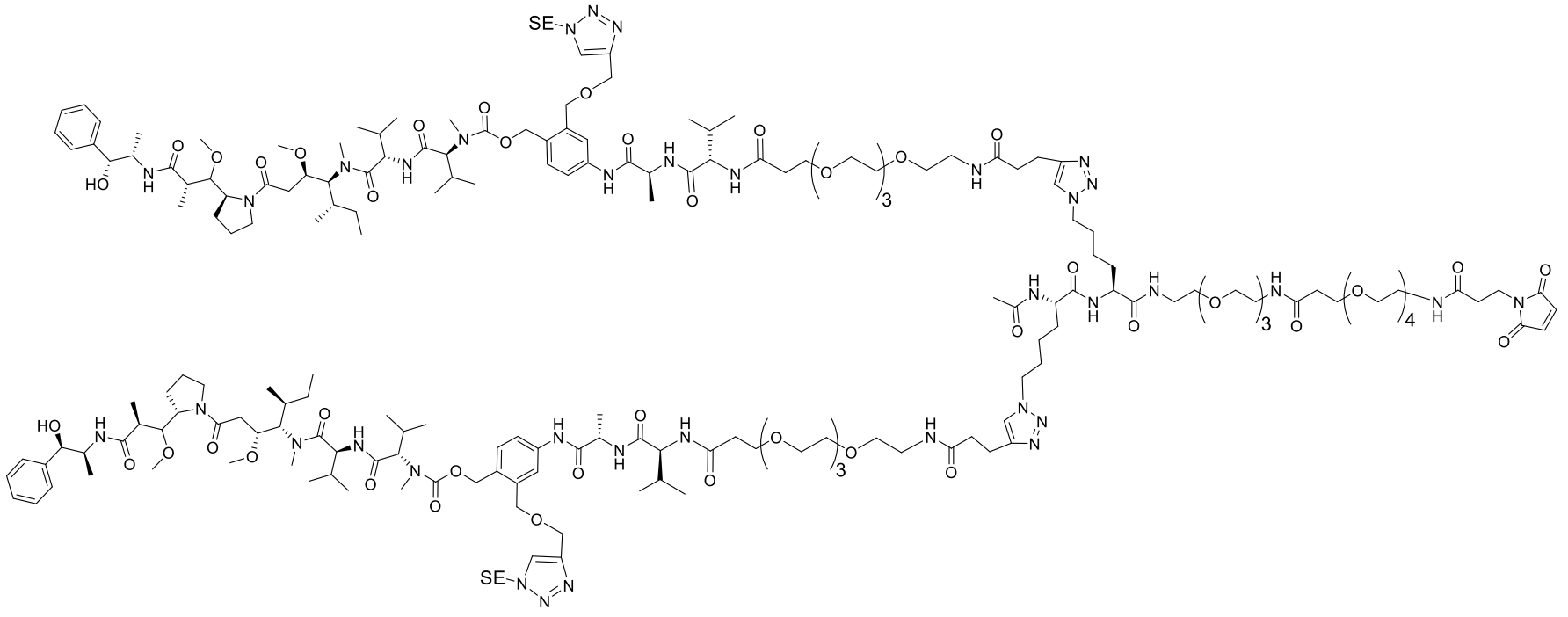
,

donde

SE es un grupo potenciador de la solubilidad como se ha descrito anteriormente,

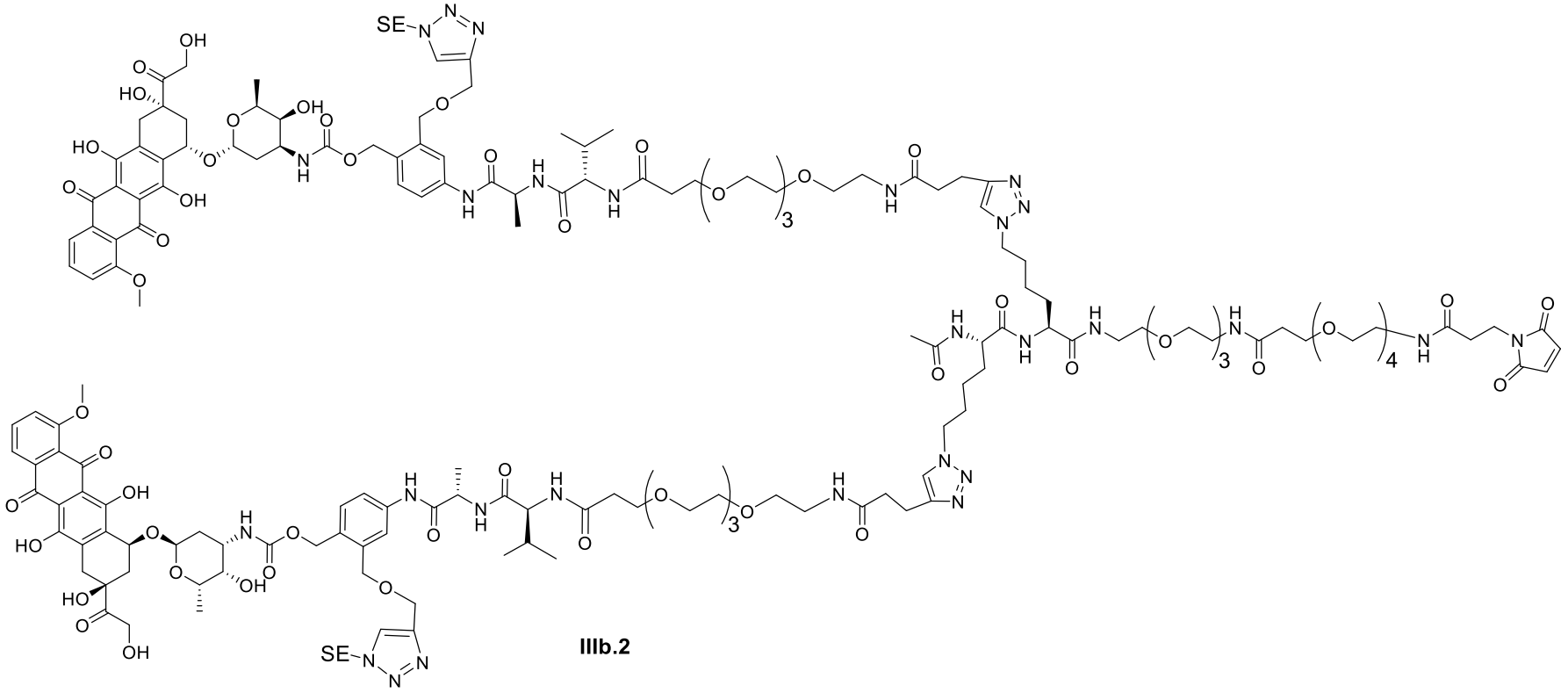
D es una sustancia farmacéuticamente activa como la descrita anteriormente, preferiblemente D se selecciona entre camptotecinas, preferiblemente exatecan, SN38 y topotecan; auristatinas, preferiblemente seleccionadas entre monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF); maitansinoides, preferiblemente seleccionados de mertansina (DM1) y ravtansina (DM4); calicheamicinas; agonistas del receptor tipo Toll 7 (TLR7); inhibidor de la nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT)i: duocarmicinas; antraciclinas, preferiblemente doxorrubicina; amatoxinas, preferiblemente alfa-amanitina, beta-amanitina, amanina y amaninamida; faloidinas; seco-ciclopropilpirroloindolina (seco-CPI); seco-ciclopropilbenzoindolina (seco-CBI); taxoles; vinblastinas; colchicinas; triptolida; y sus derivados.

Según modalidades aún más preferidas, los compuestos enlazadores modulares de la invención se seleccionan del grupo que comprende:



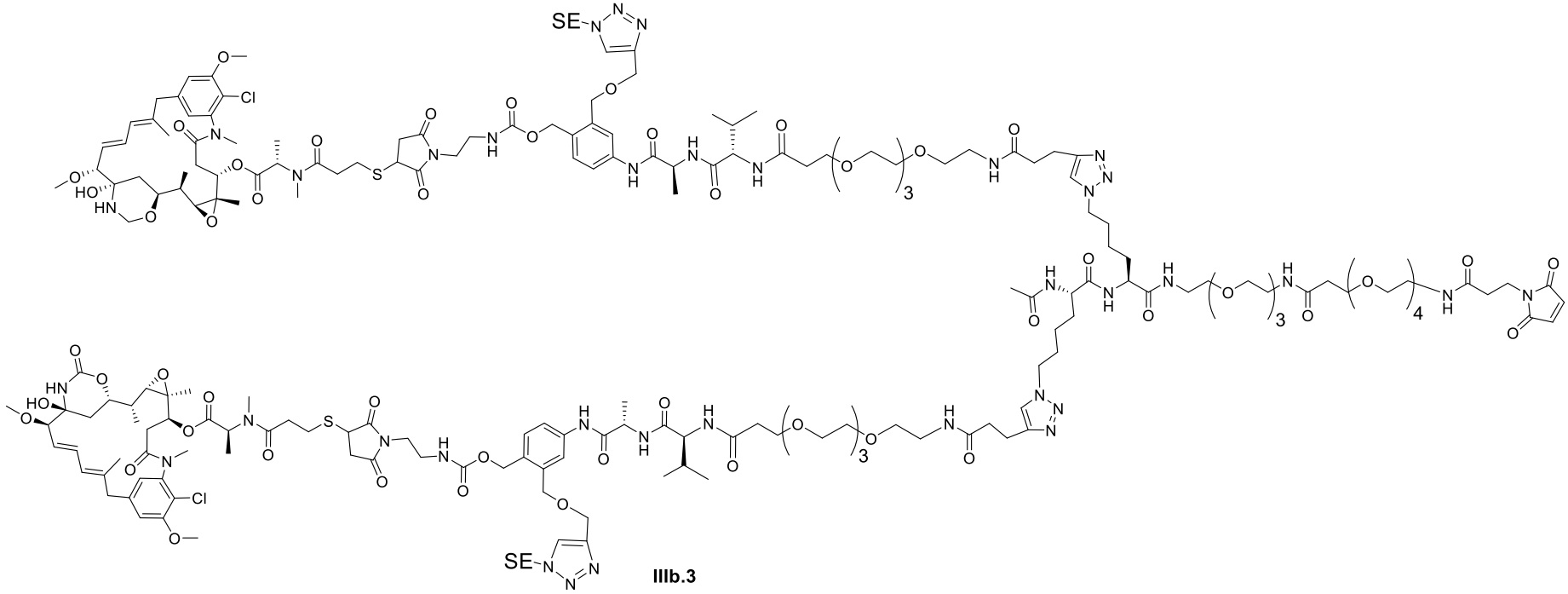
IIIb.1

,



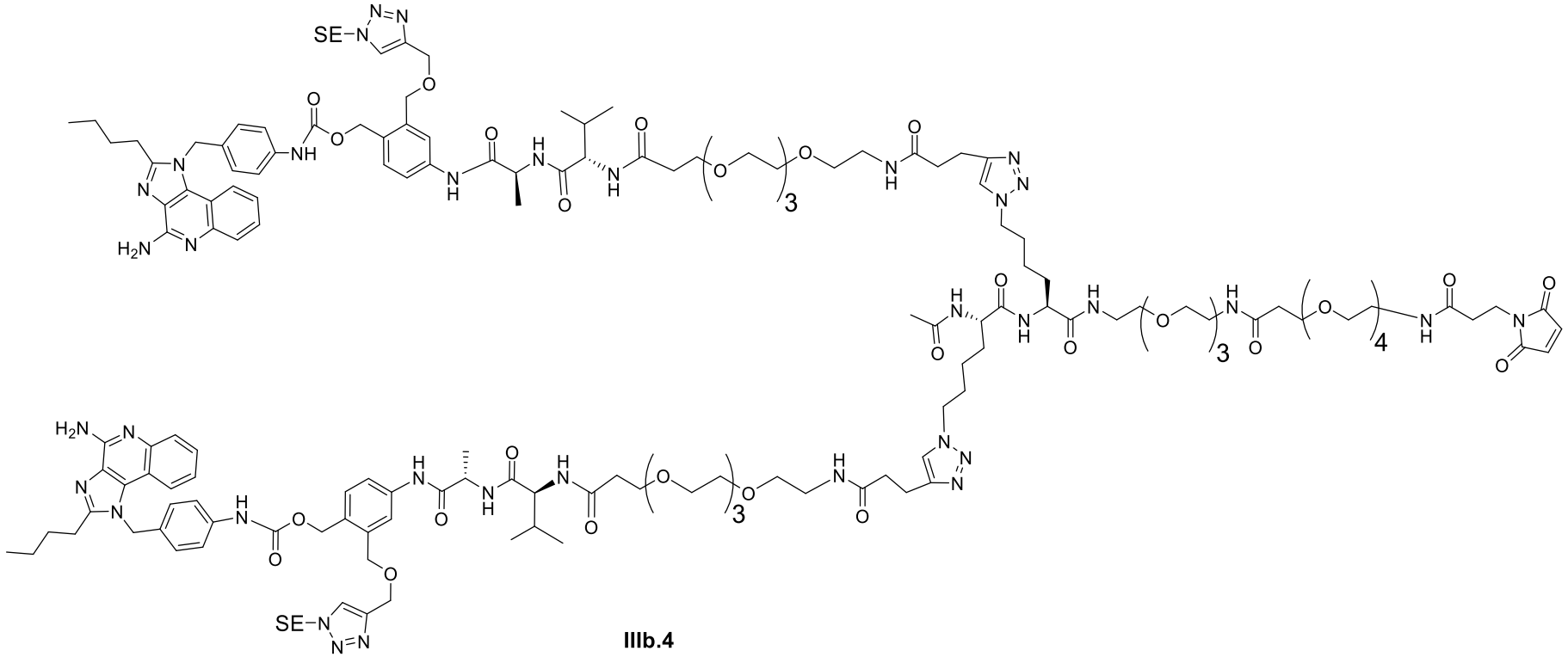
IIIb.2

,



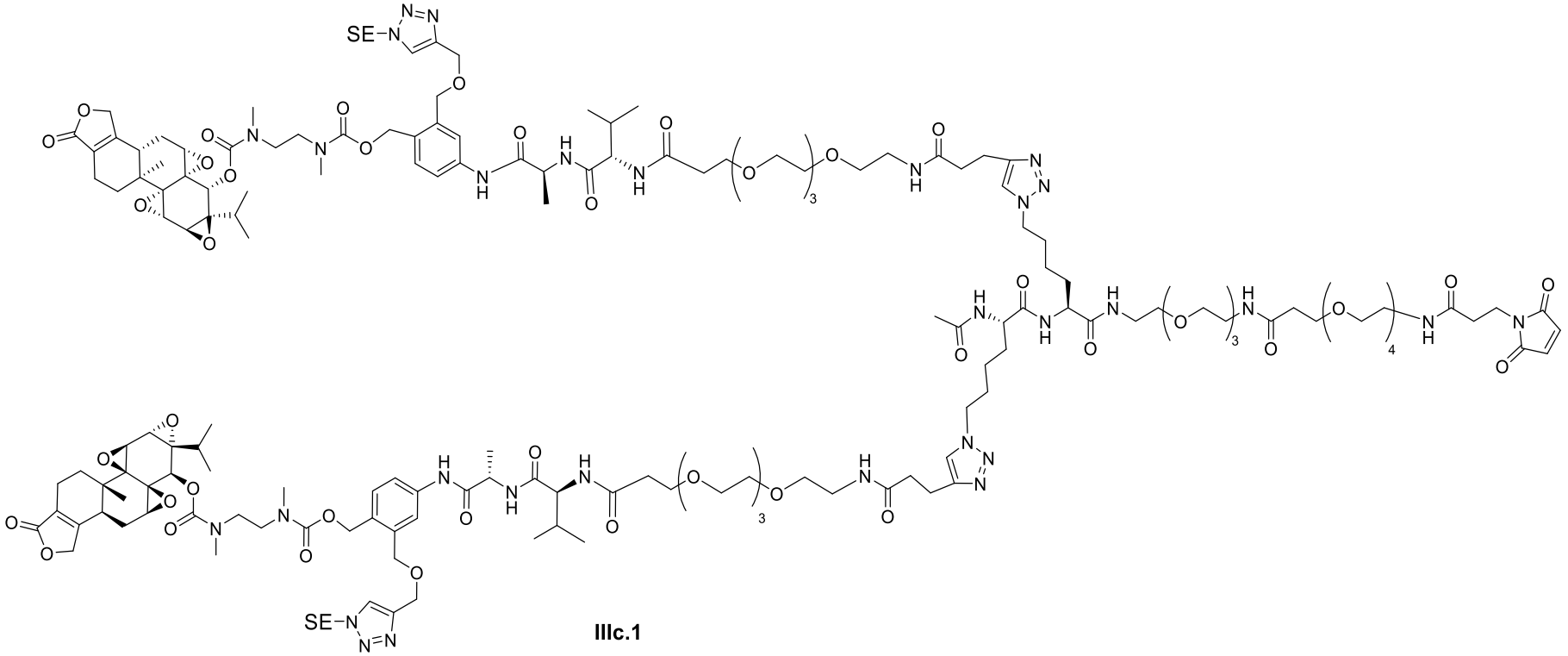
IIIb.3

,



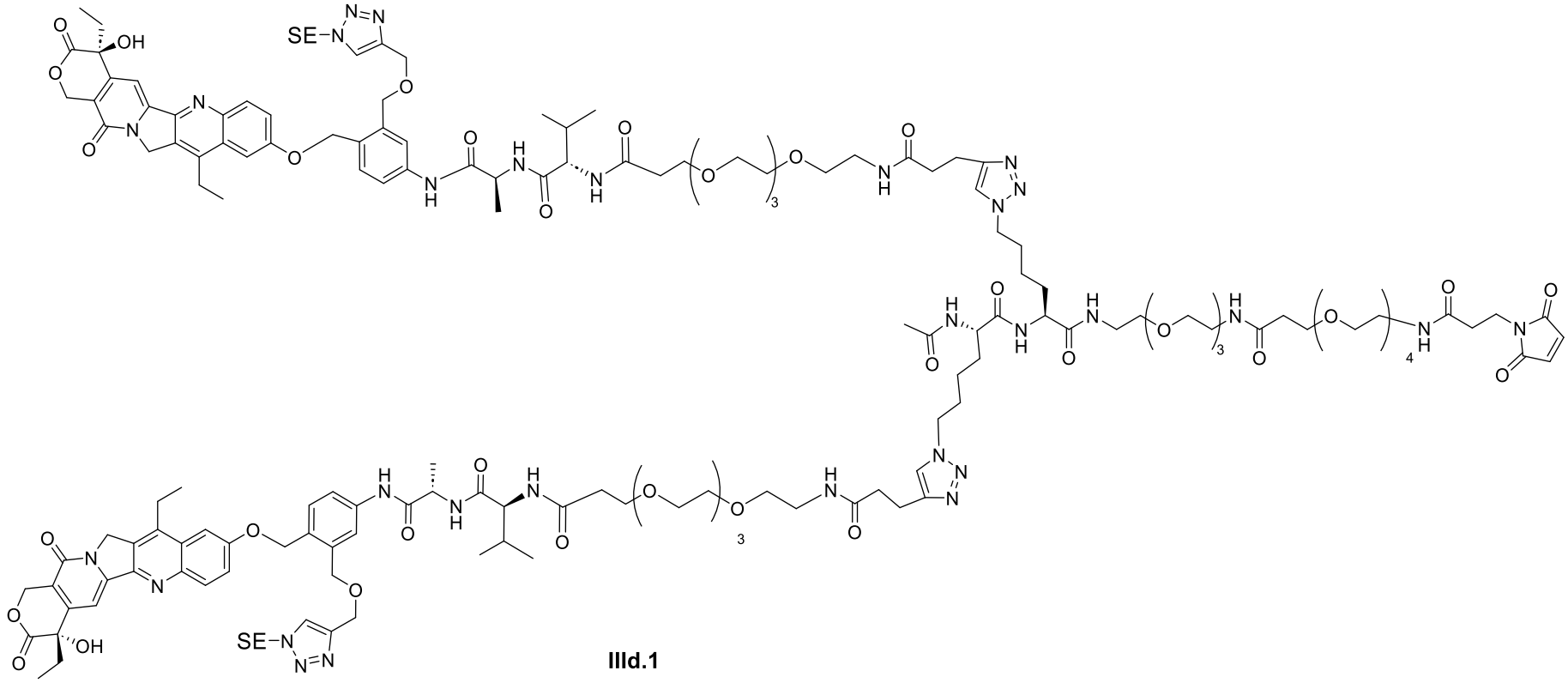
IIIb.4

,



IIIc.1

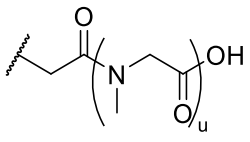
,

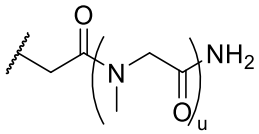


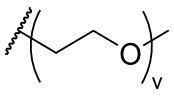
IIId.1

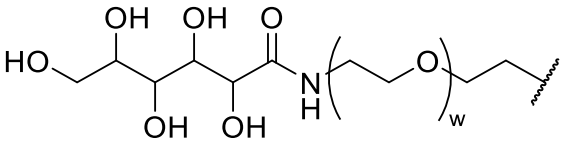
,

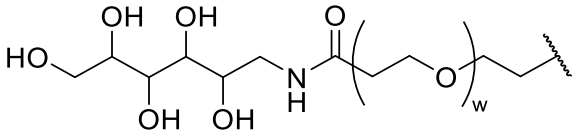
donde SE se selecciona entre

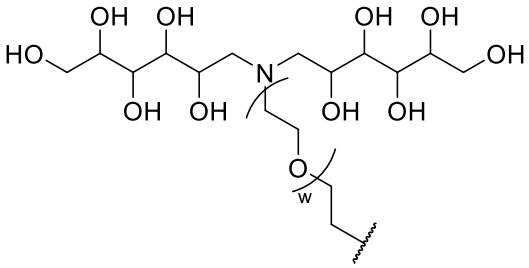
una polisarcosina  , donde u es al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; 12 o 14,

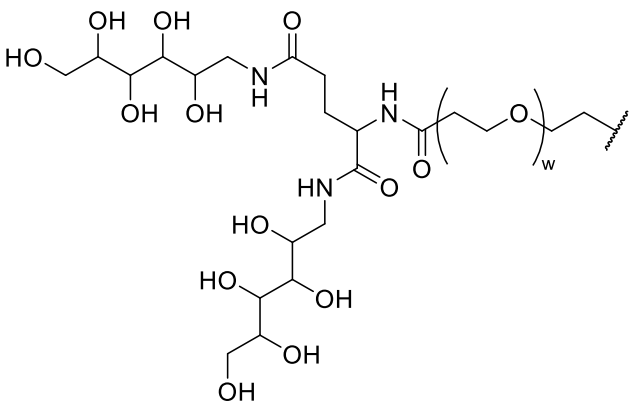
una amida de polisarcosina  , donde u es al menos 1, donde u es al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; 12 o 14;

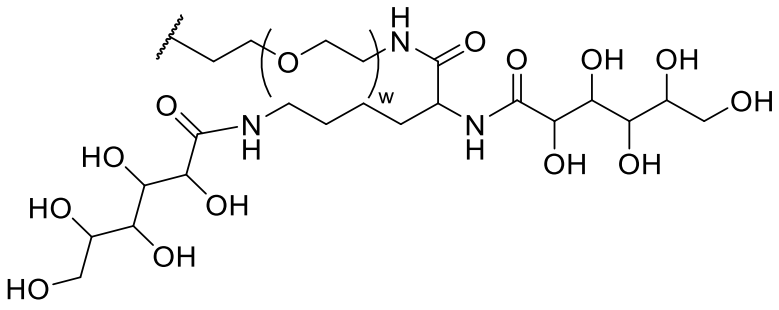
una cadena de PEG  , donde v es de 4 a 24, por ejemplo de 4 a 22, de 4 a 20, de 4 a 18, de 4 a 16, de 4 a 14, de 4 a 12, de 4 a 10 o de 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12 o 14;

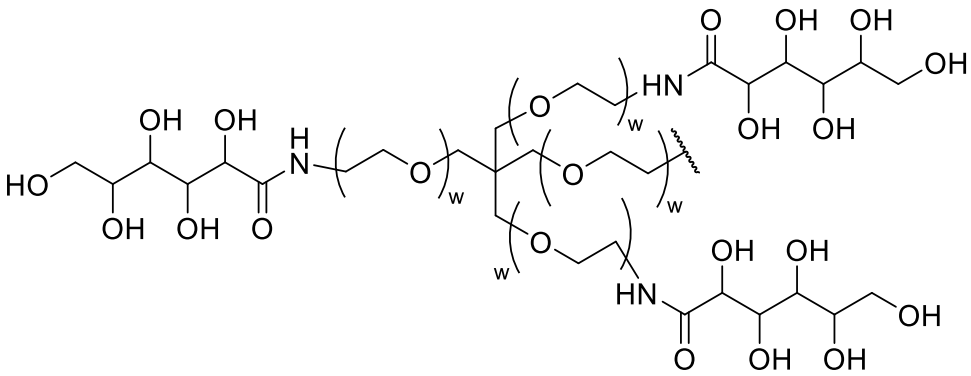
una  ,

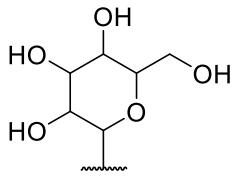
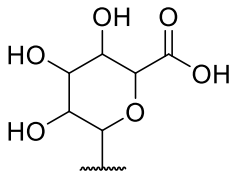
una PEG-glucamida  ,

una, 

una, 

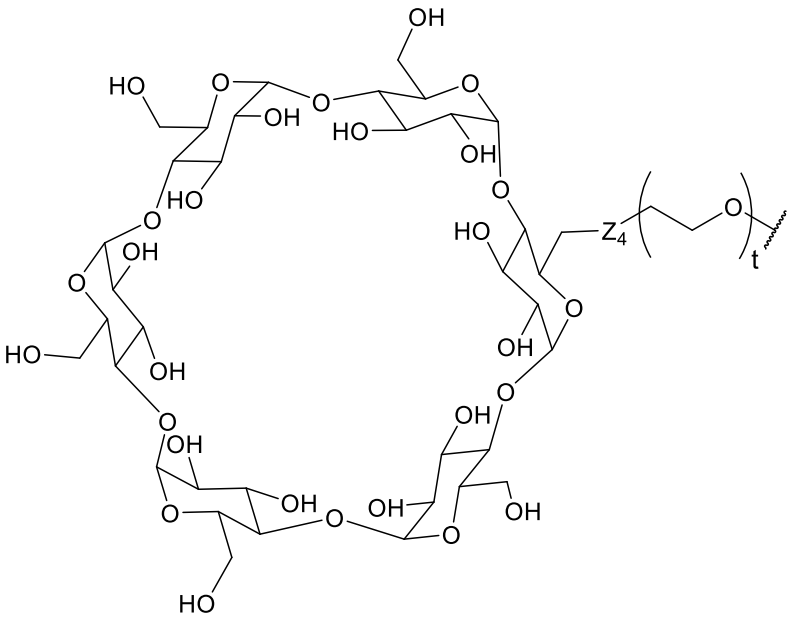
una, 



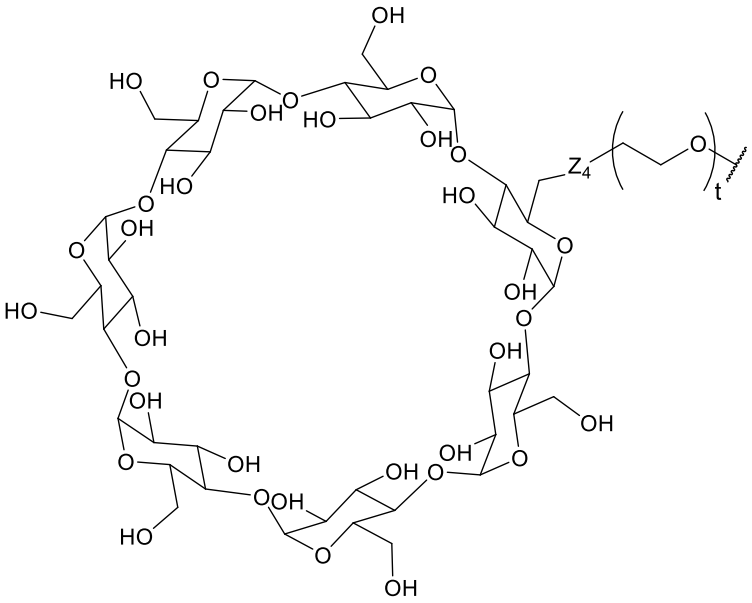
 o ;  ,

donde w es de 2 a 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10 o de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o

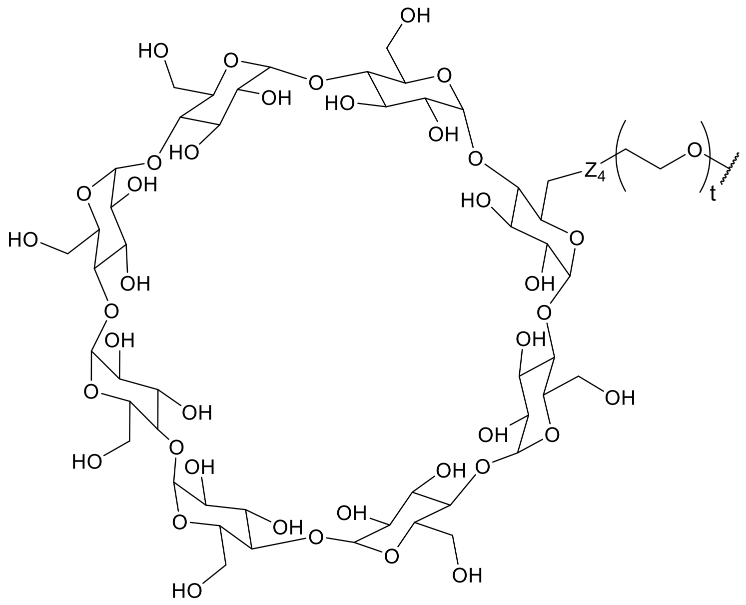
alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina o gamma-ciclodextrina, unidas a una cadena de PEG directamente o a través de un espaciador Z^4 tal como


OH
HO
O
OH
HO
OH
HO
O
HO
Z4
O
t
OH
O
HO
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
OH
O
O
OH
HO

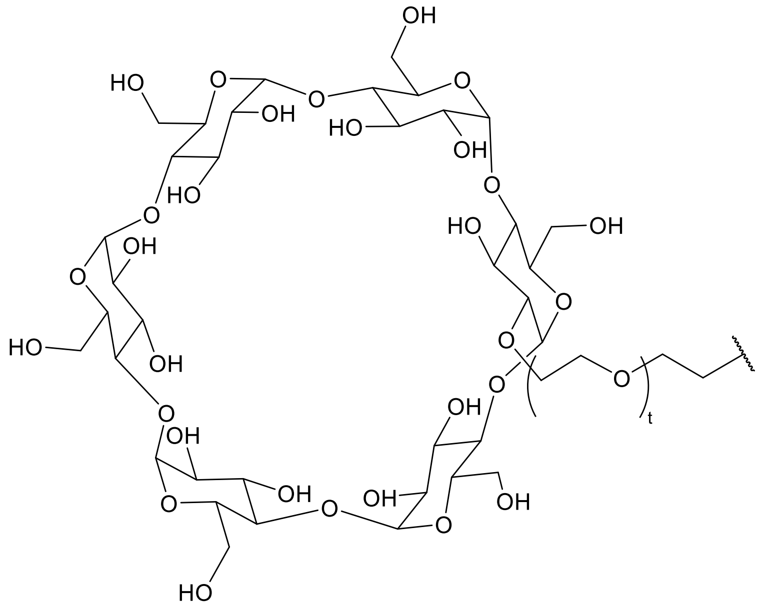
,


OH
HO
O
OH
HO
OH
O
Z4
O
t
HO
HO
O
OH
O
HO
OH
O
OH
HO
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
O
OH
O
OH
OH
HO
O
OH

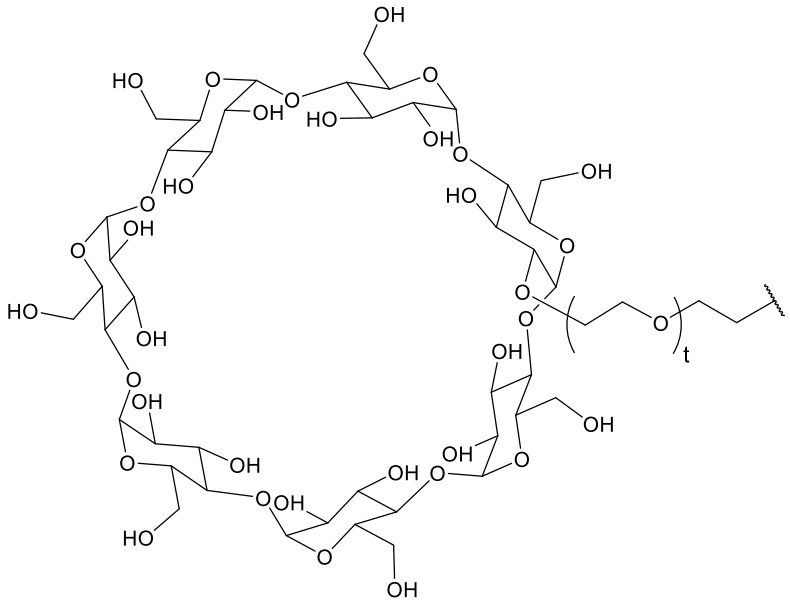
,



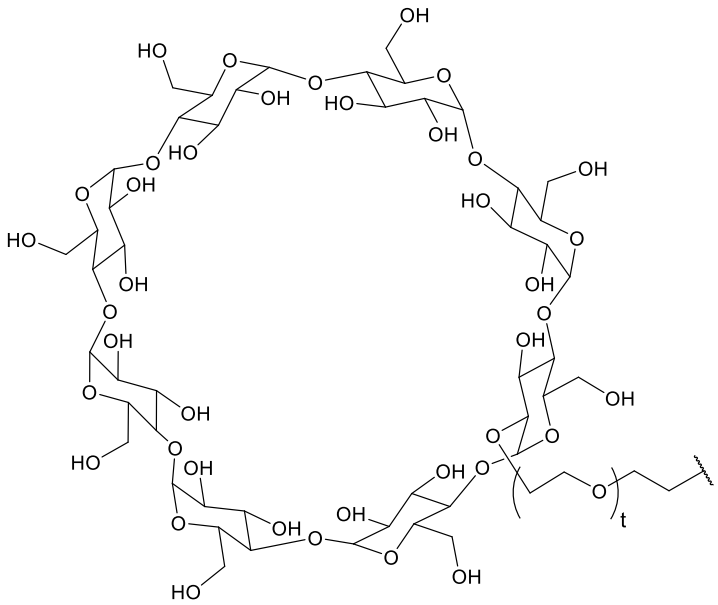
,



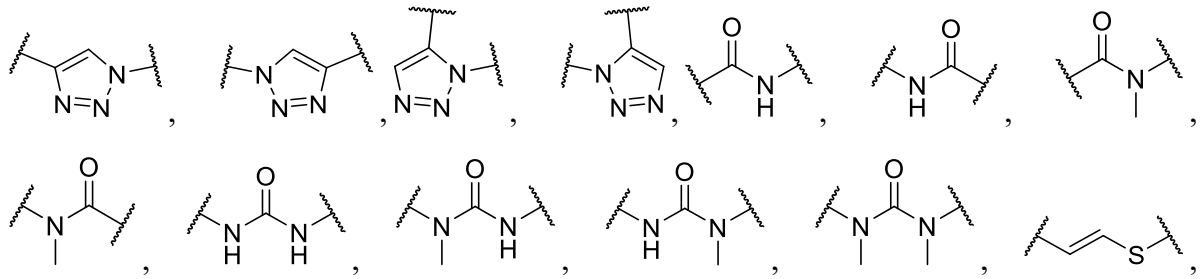
,

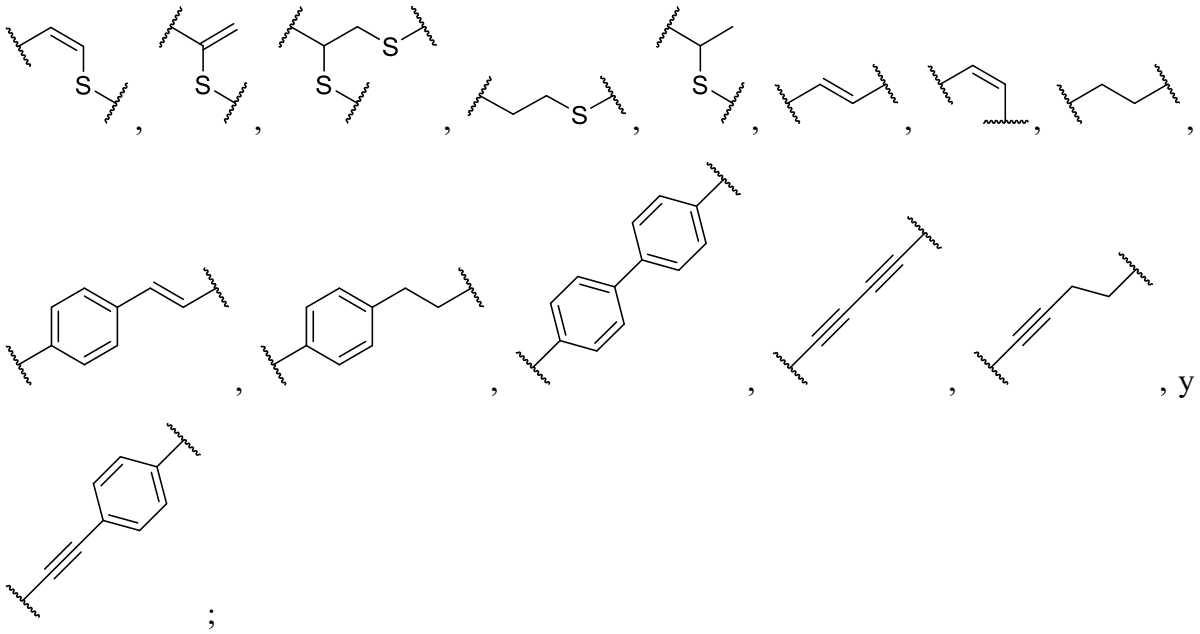


”



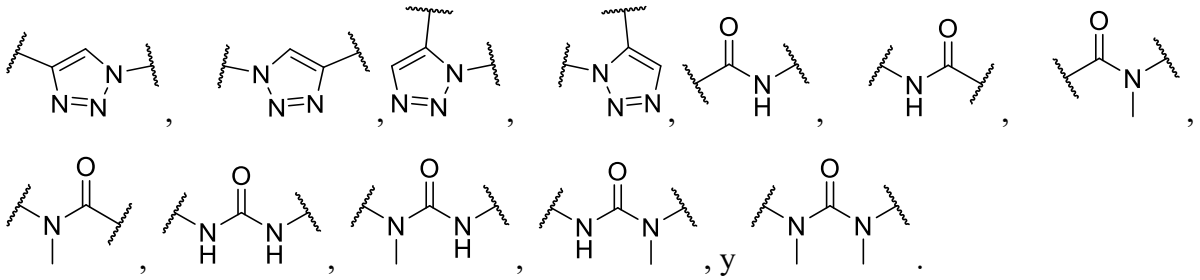
donde Z^4 es



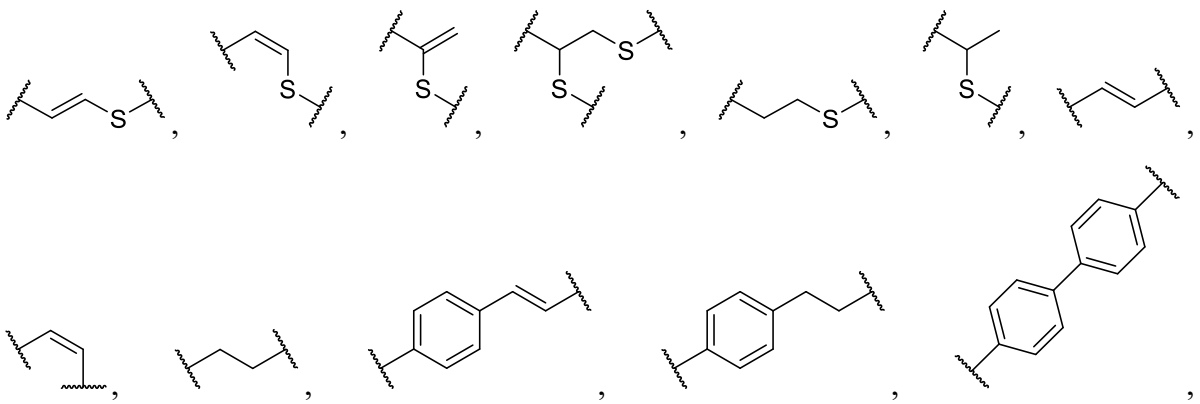


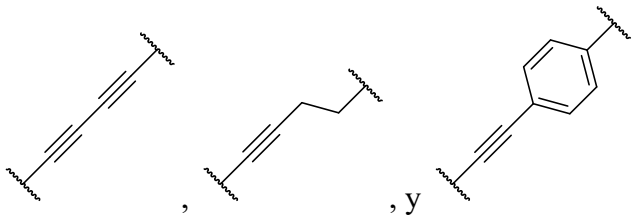
y donde la cadena de PEG comprende entre 2 y 19 PEG, es decir, donde t es de 2 a 18, de 4 a 16, de 6 a 14 y más preferiblemente de 8 a 12.

En una modalidad preferida Z^4 es un 1,2,3-triazol, una amida, una amida o un derivado de urea, seleccionado del grupo que consiste en:



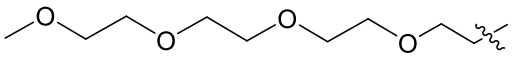
Si Z^4 se selecciona del grupo formado por





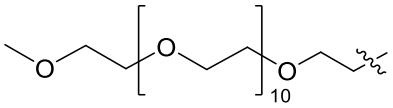
puede unirse o utilizarse en reacciones tiol-ino/eno, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado como, por ejemplo, acoplamiento de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y Glaser.

En algunas modalidades, el grupo potenciador de la solubilidad SE para los compuestos enlazadores modulares anteriores (IIIb,1) a (IIIb,6) se selecciona entre



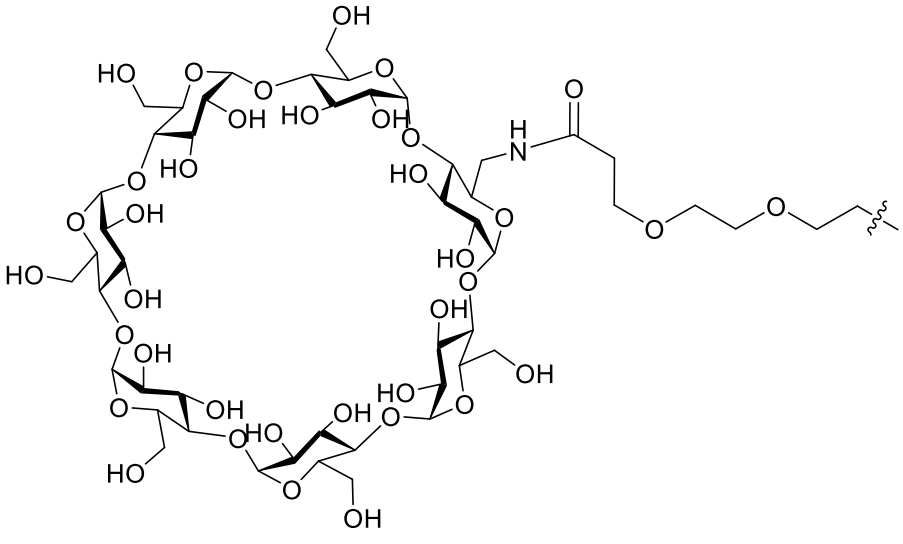
(SE.1)

,



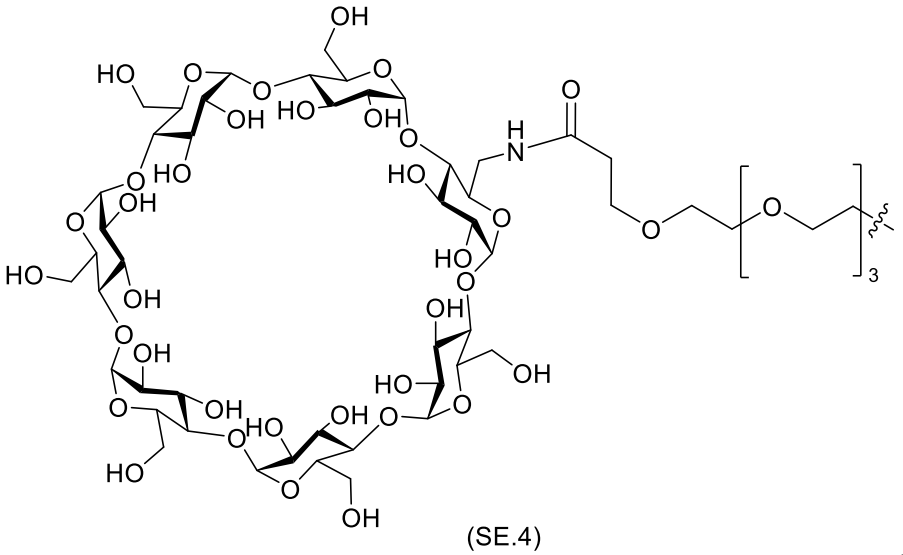
(SE.2)

,



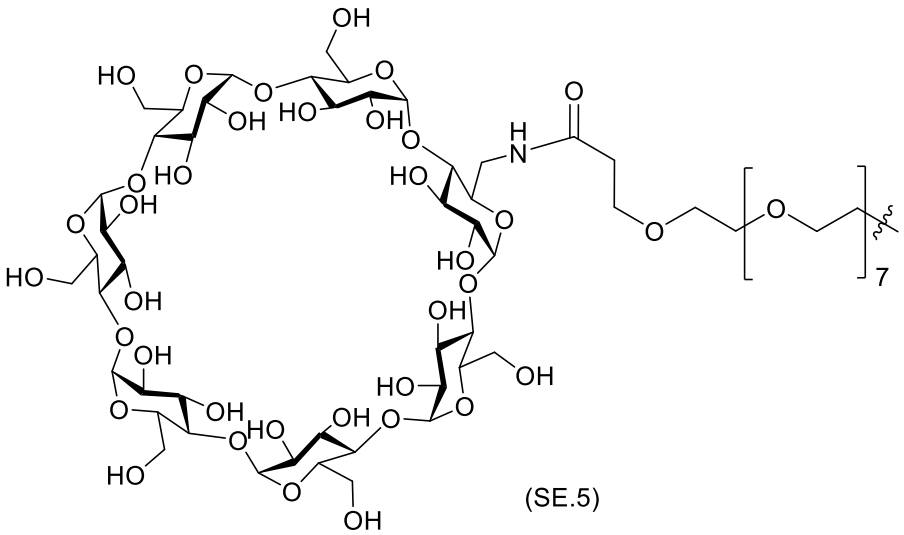
(SE.3)

,



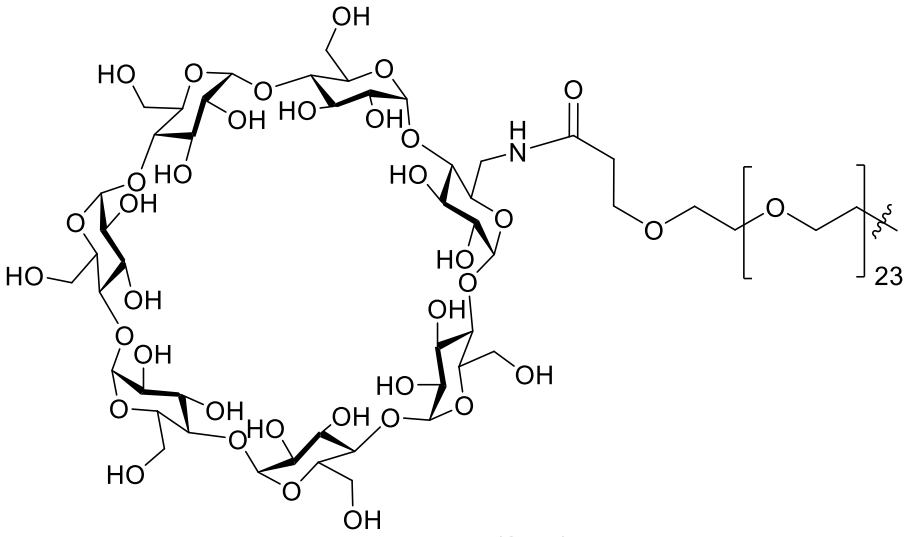
(SE.4)

,



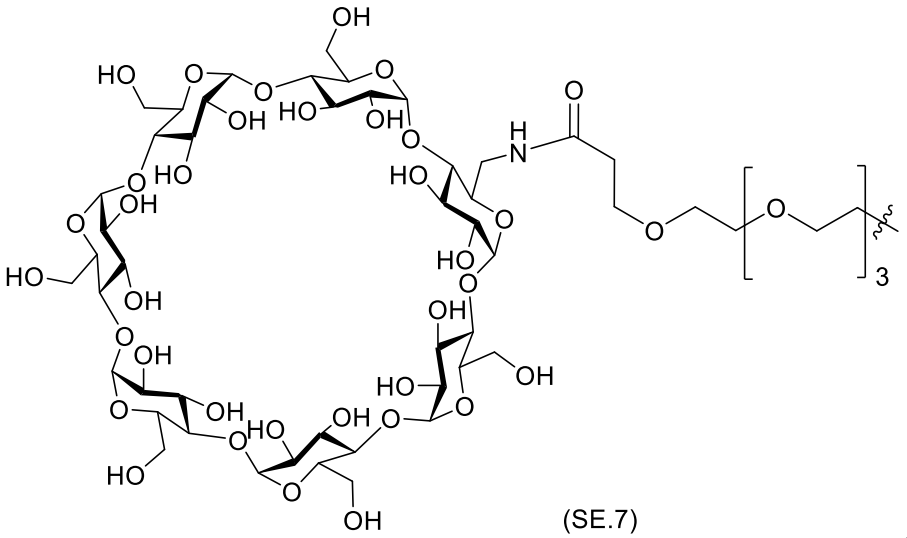
(SE.5)

,



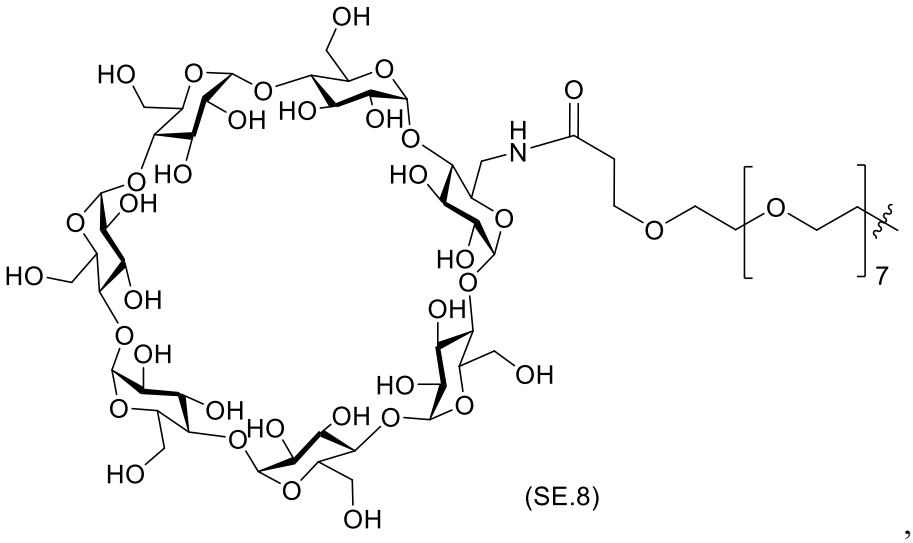
(SE.6)

,



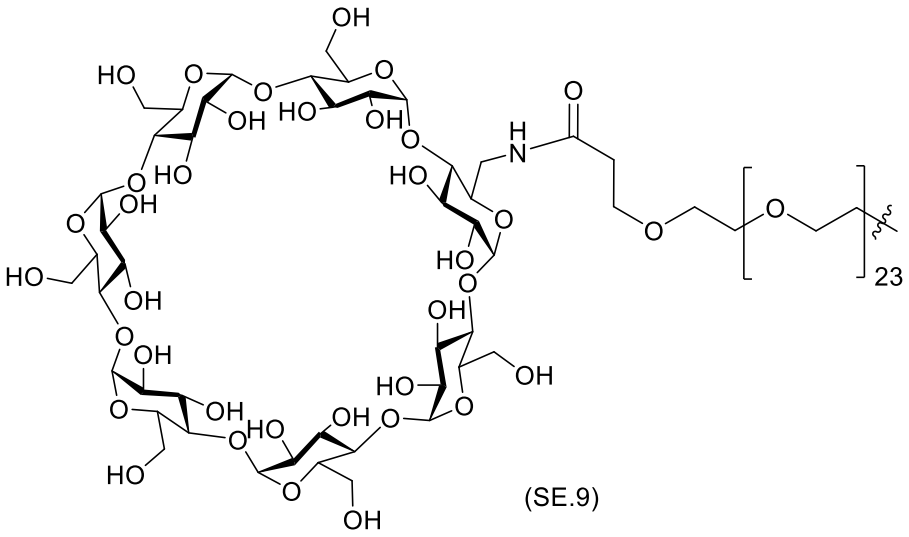
(SE.7)

,



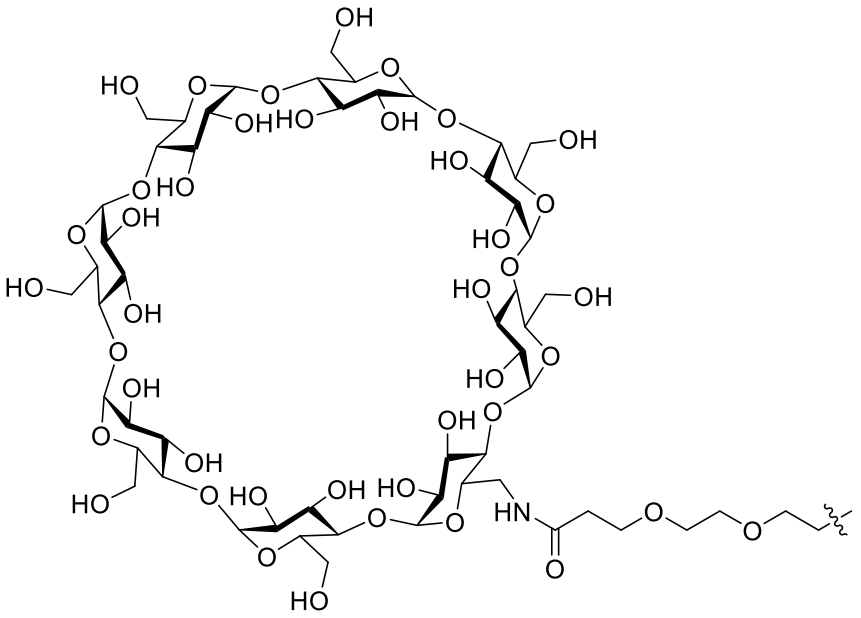
(SE.8)

,



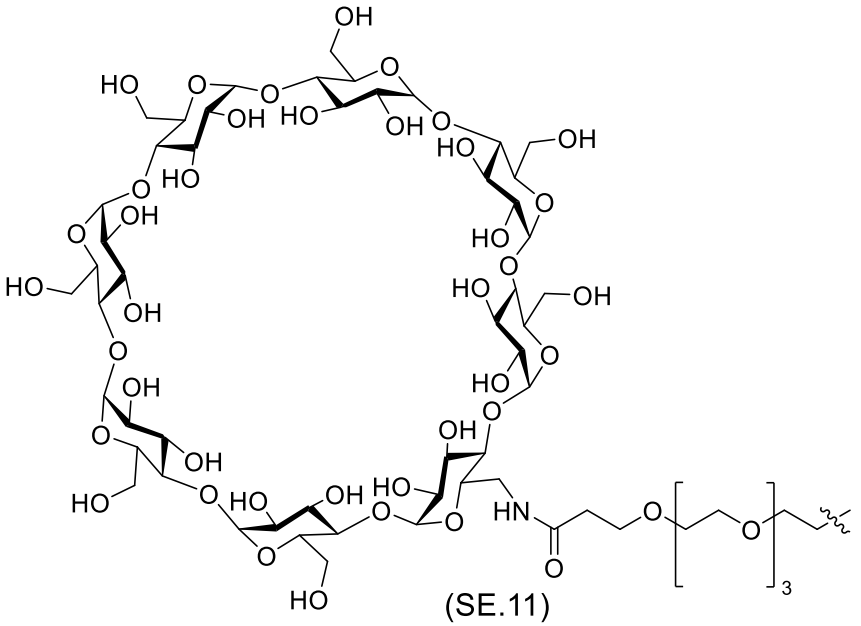
(SE.9)

,

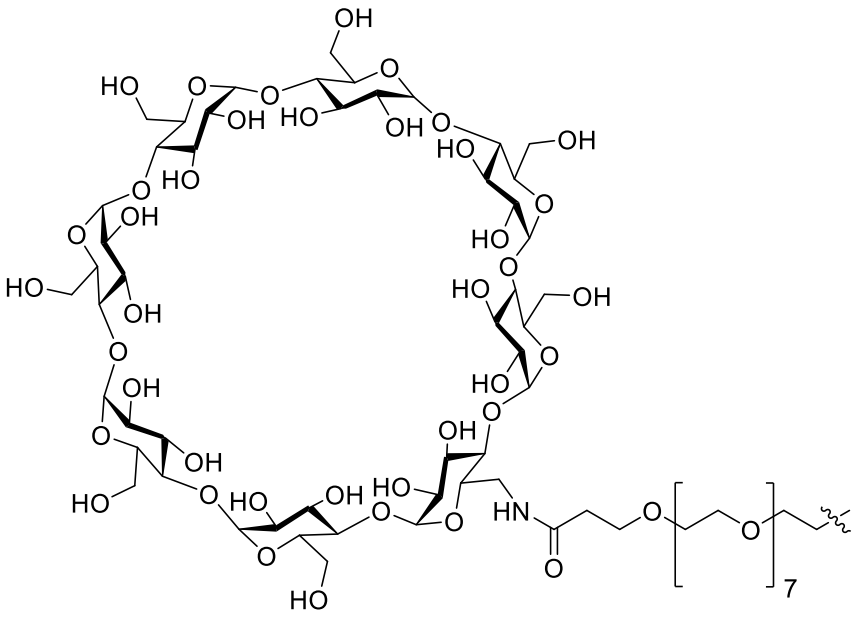


(SE.10)

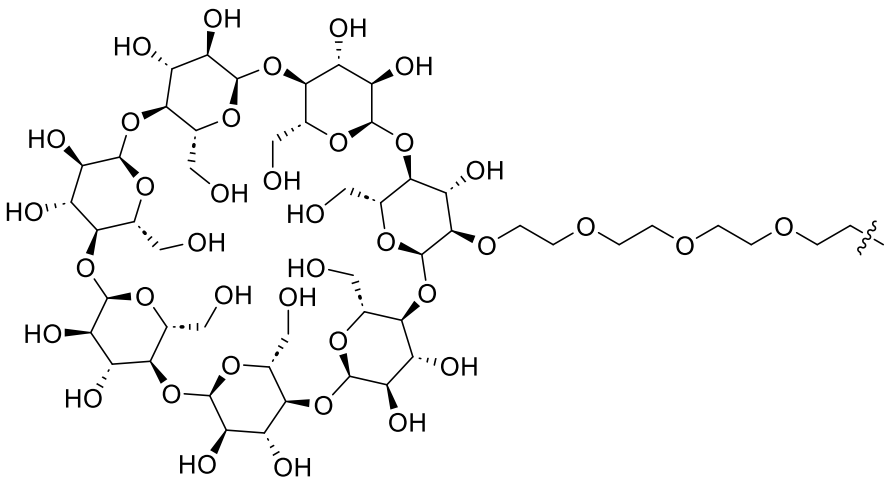
,



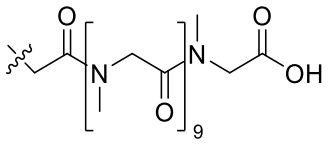
(SE.11) ,



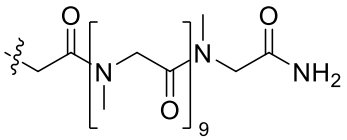
(SE.12) ,



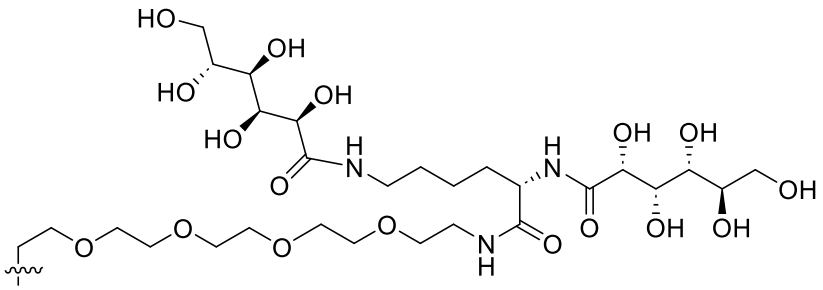
(SE.13) ,



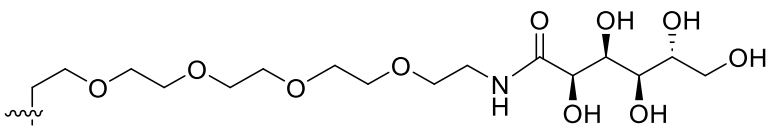
(SE.14) ,



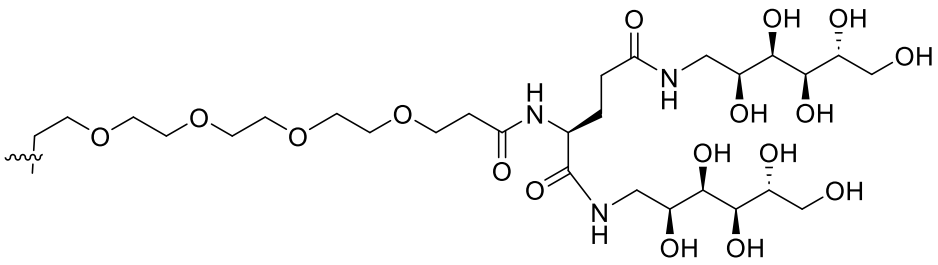
(SE.15) ,



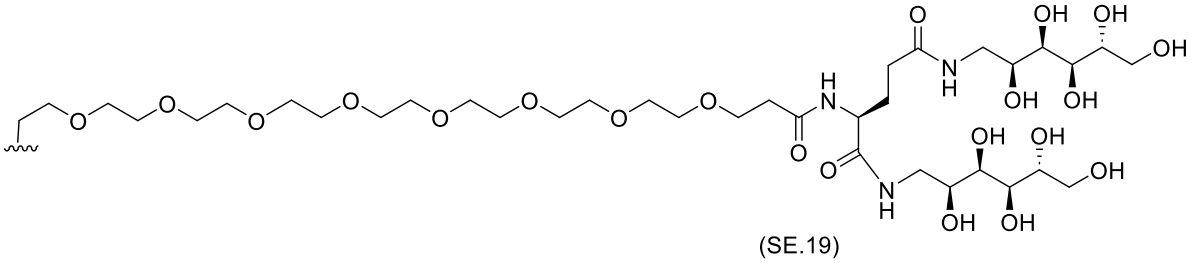
(SE.16) ,



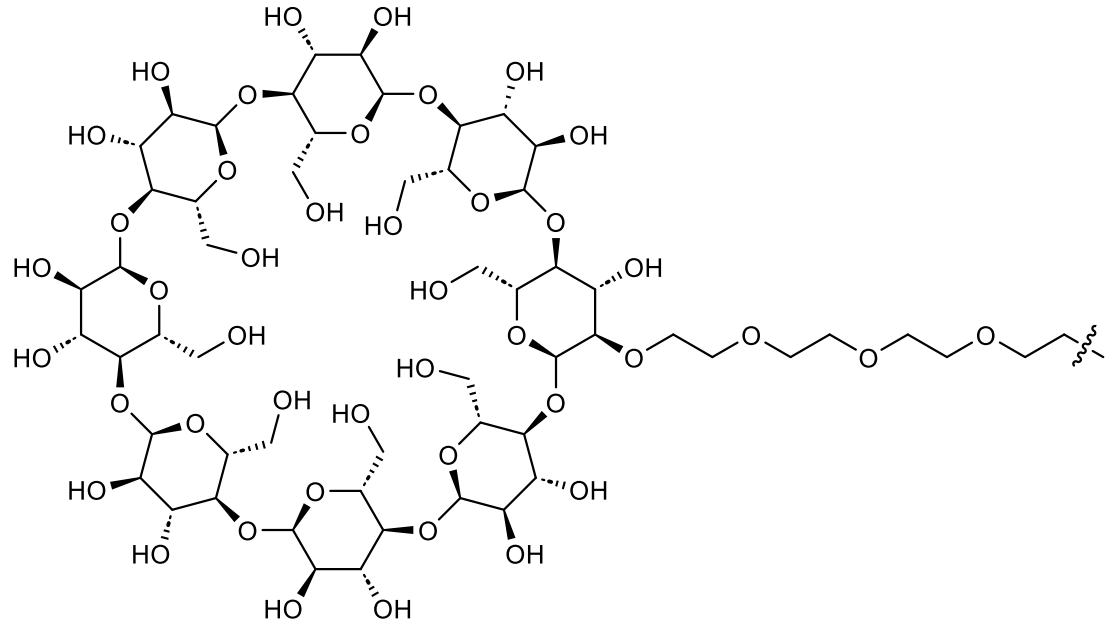
(SE.17) ,



(SE.18)

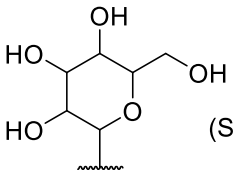


(SE.19)



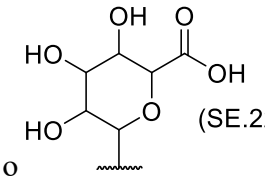
(SE.20)

,



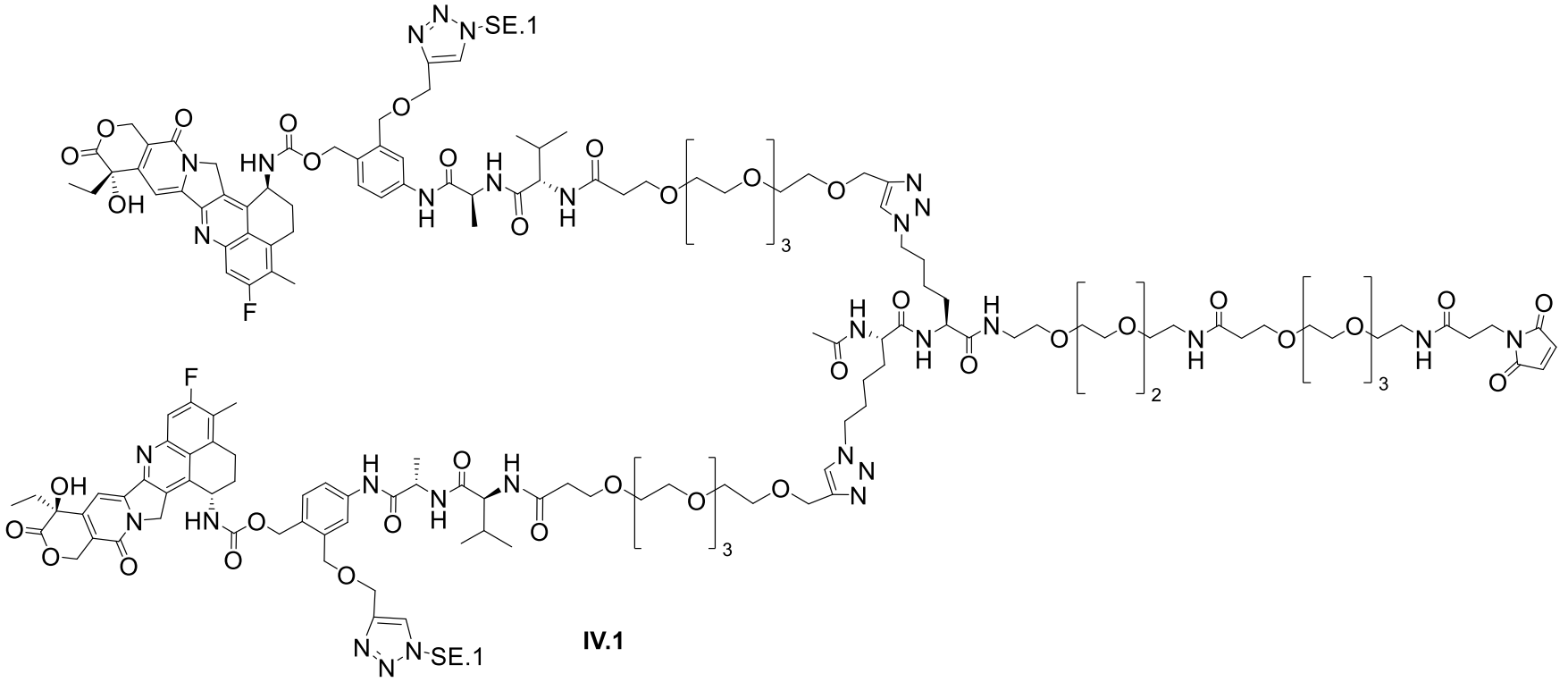
(SE.21)

o

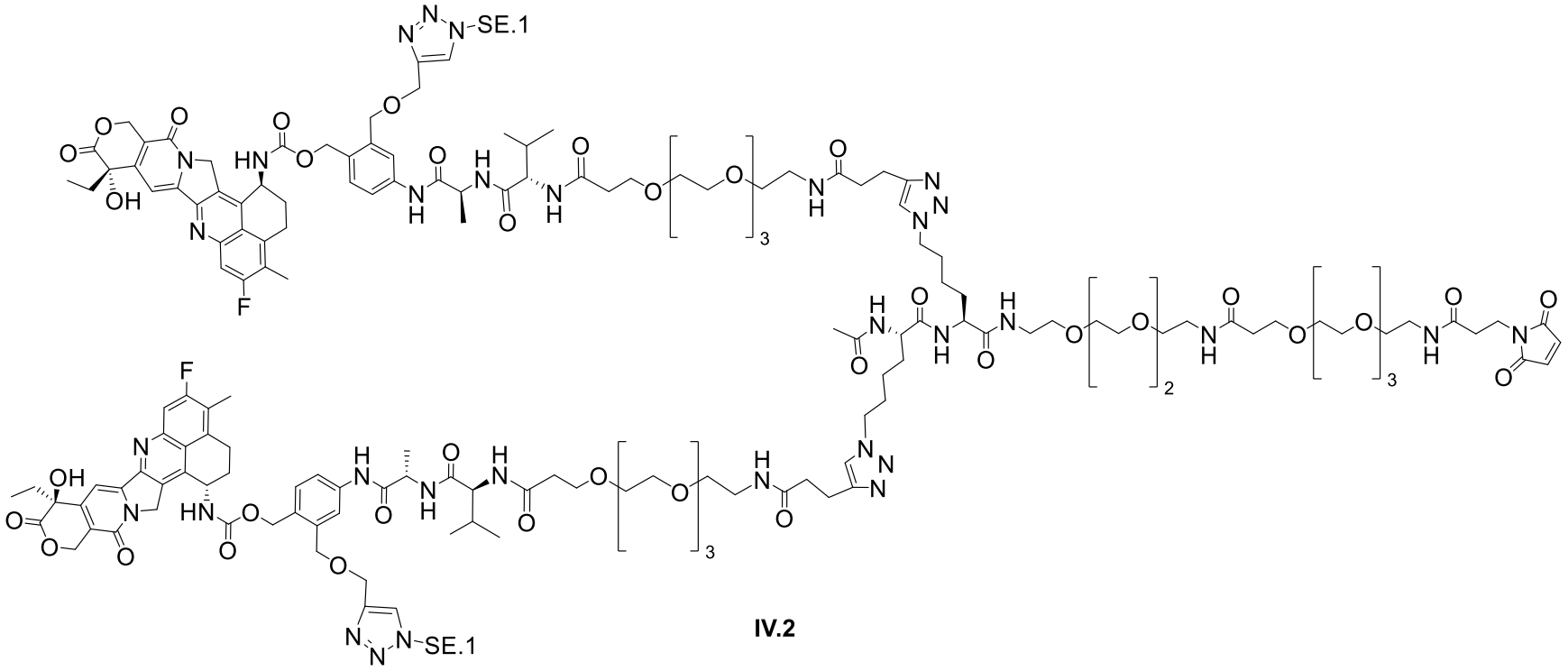


(SE.22)

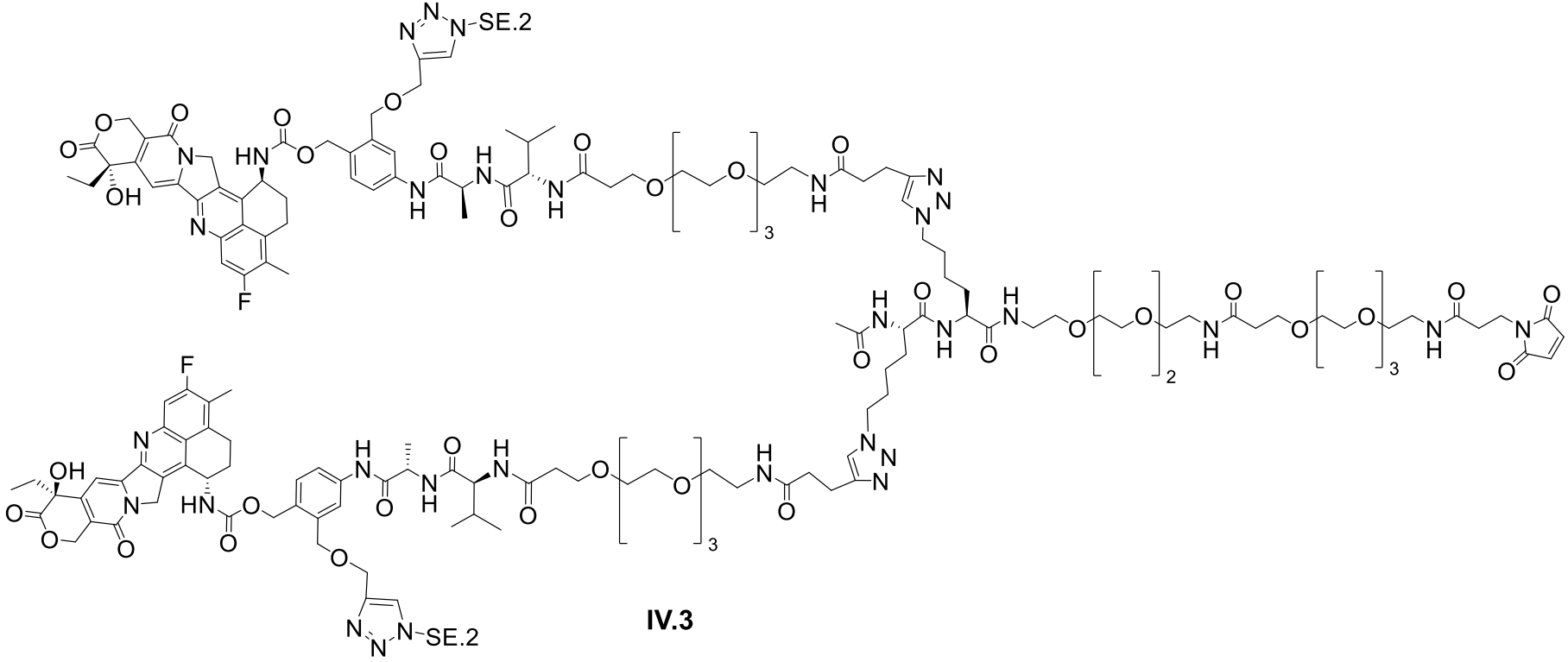
. Las modalidades específicamente preferidas de los compuestos enlazadores modulares de la invención son: ----------



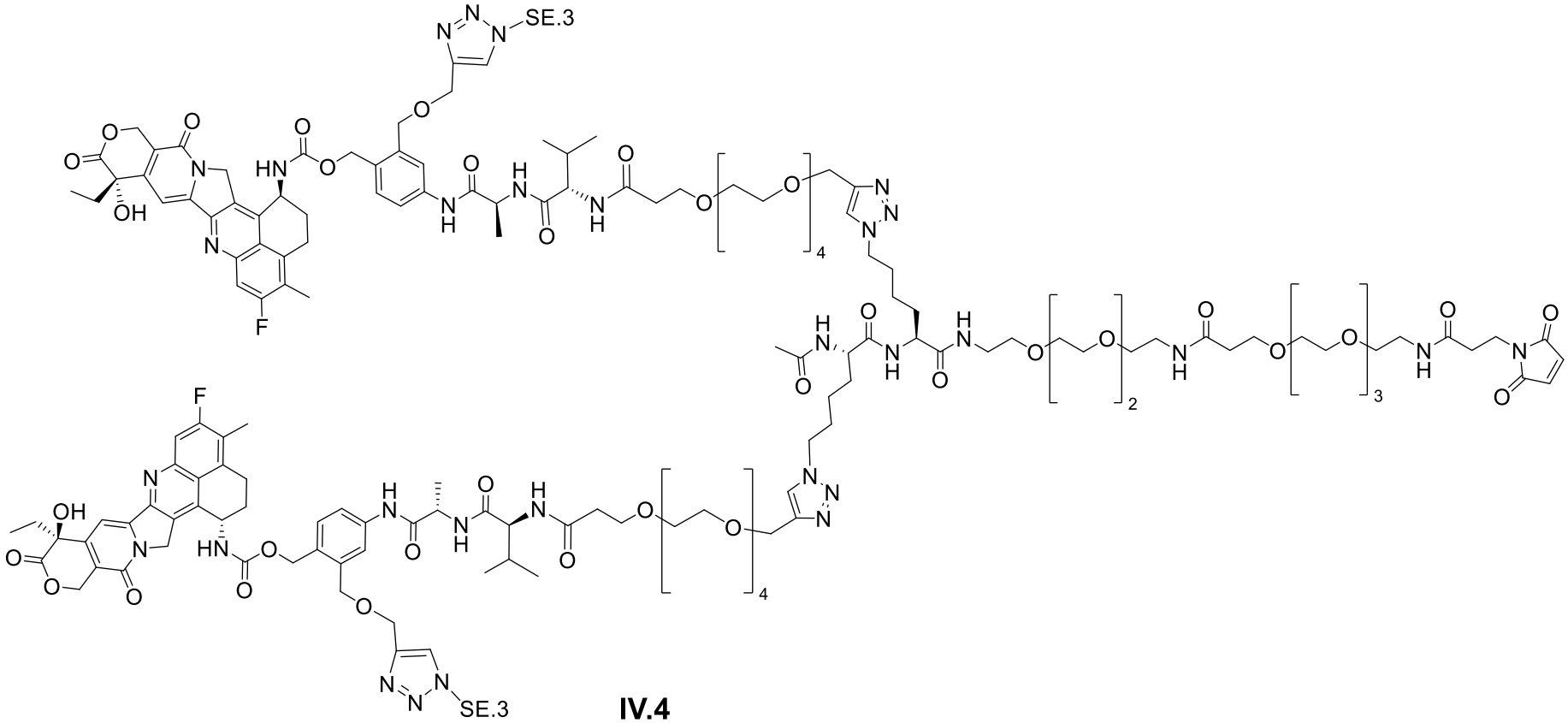
IV.1



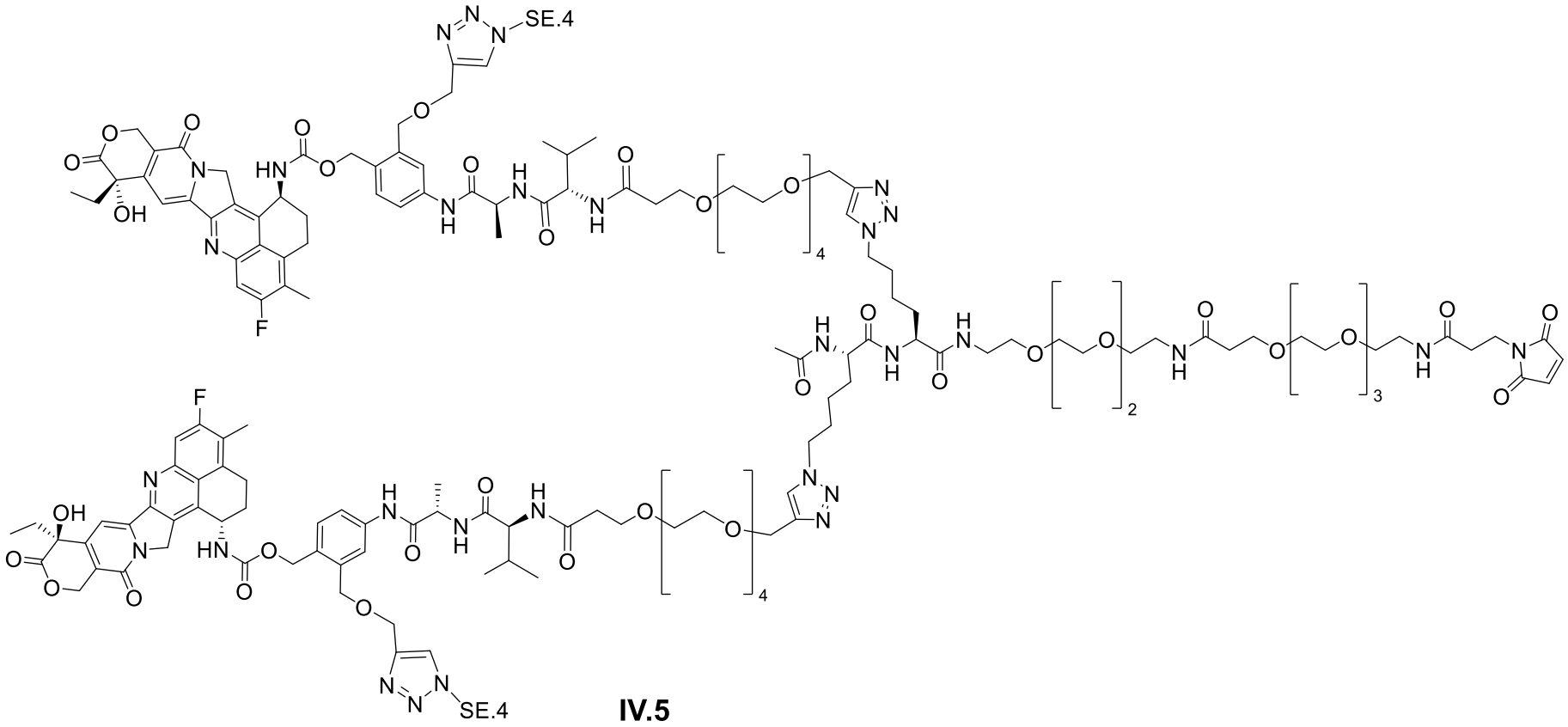
IV.2



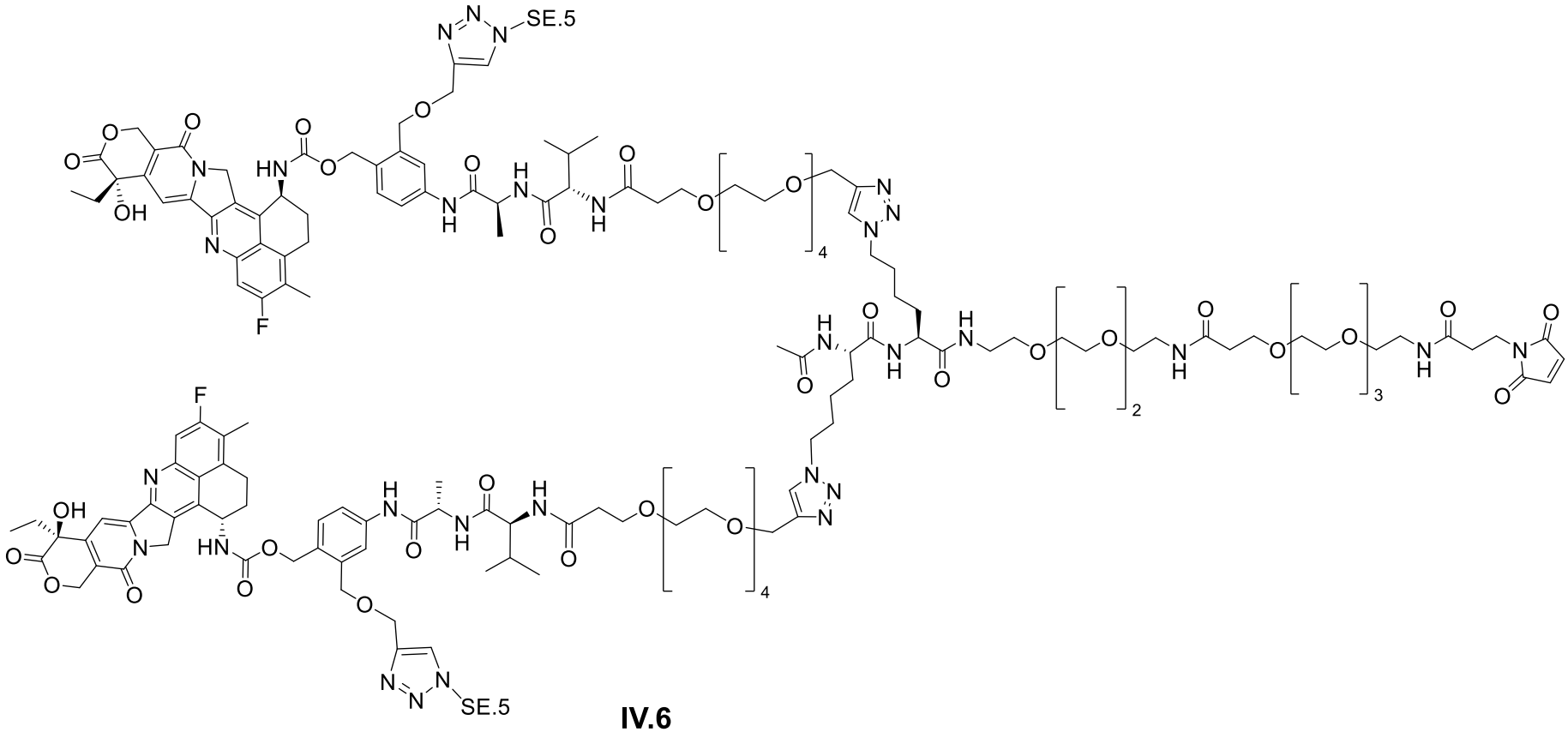
IV.3



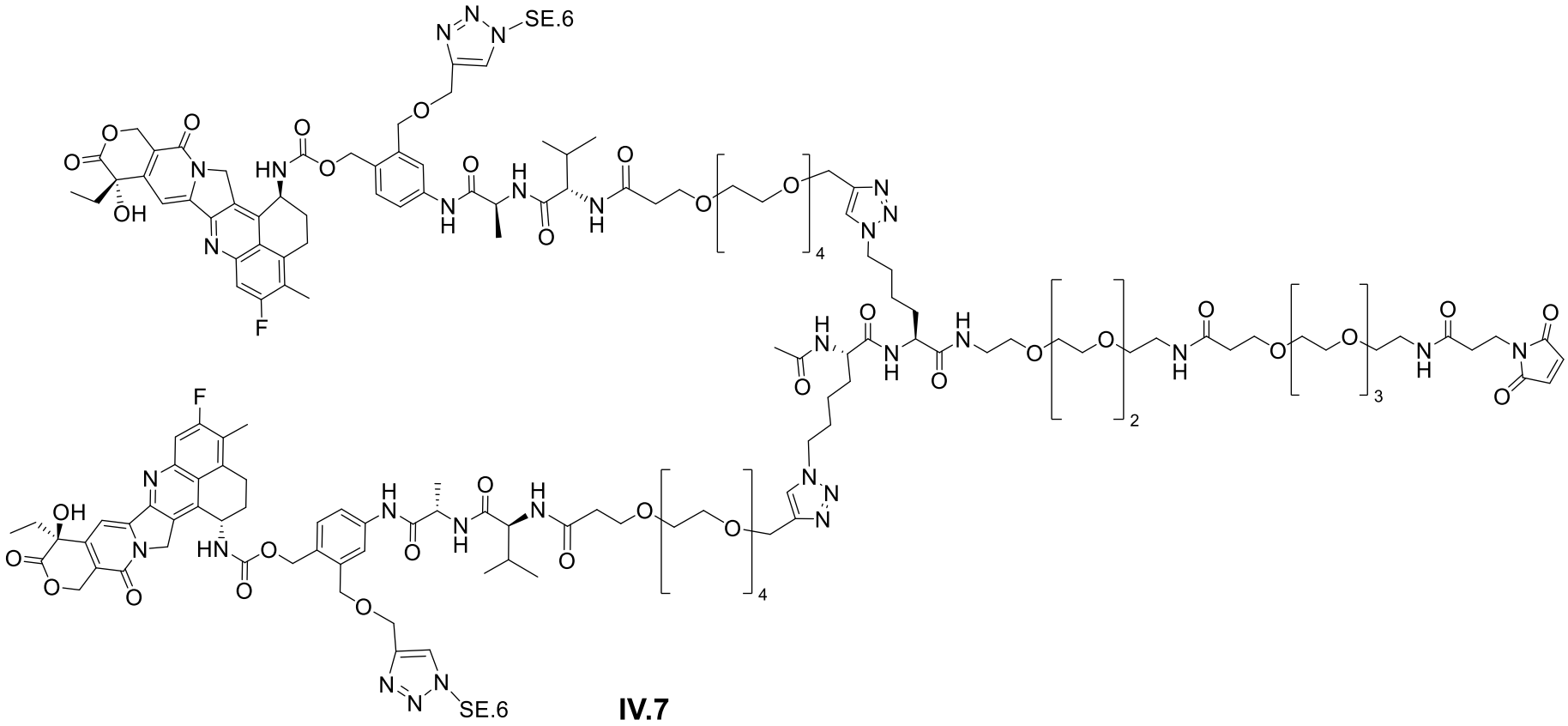
IV.4



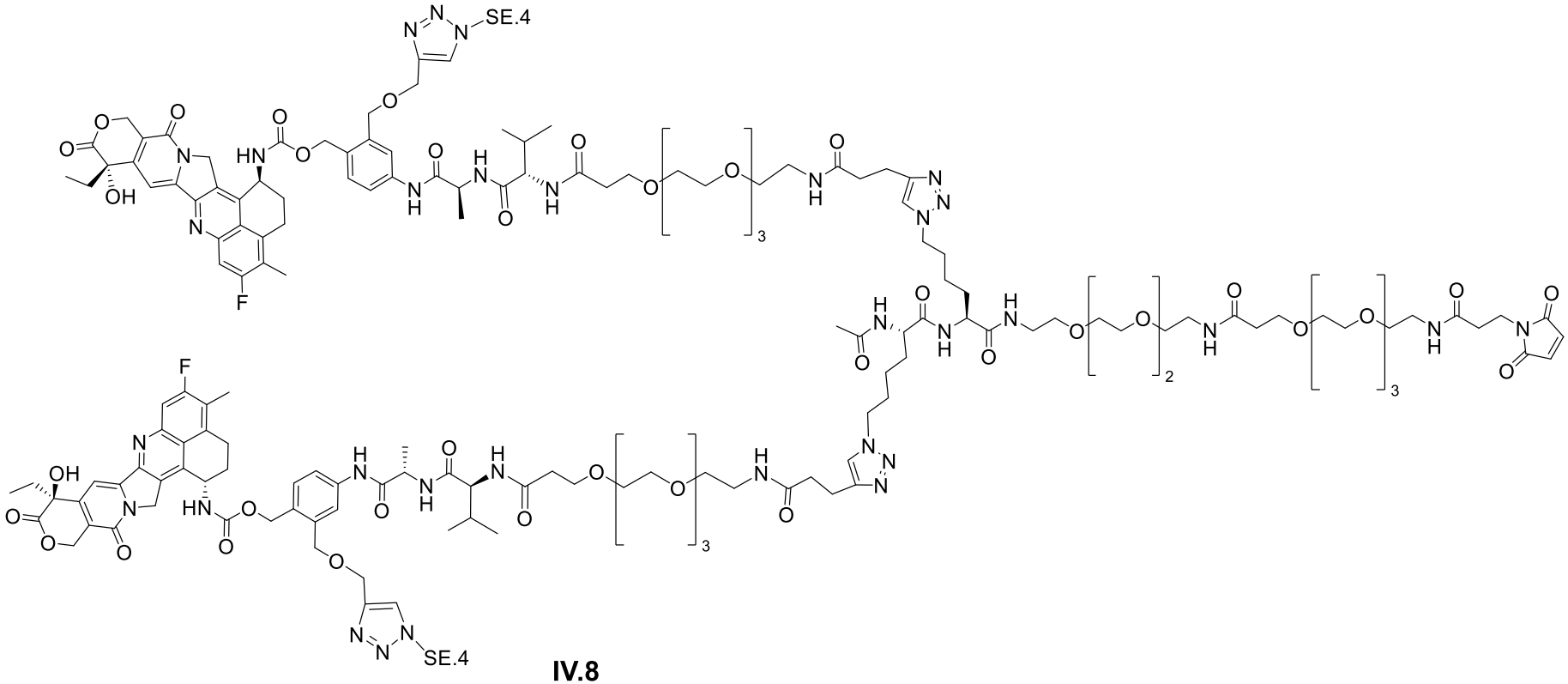
IV.5



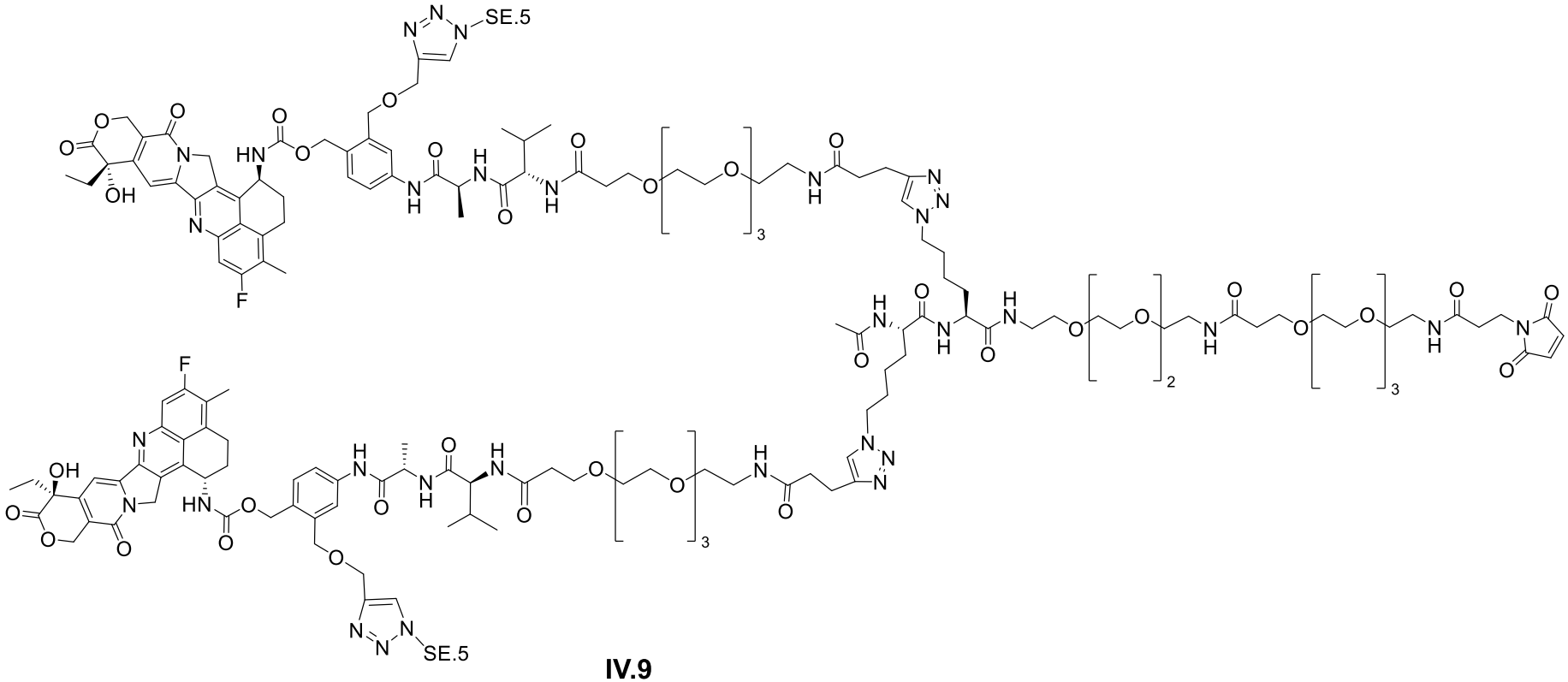
IV.6



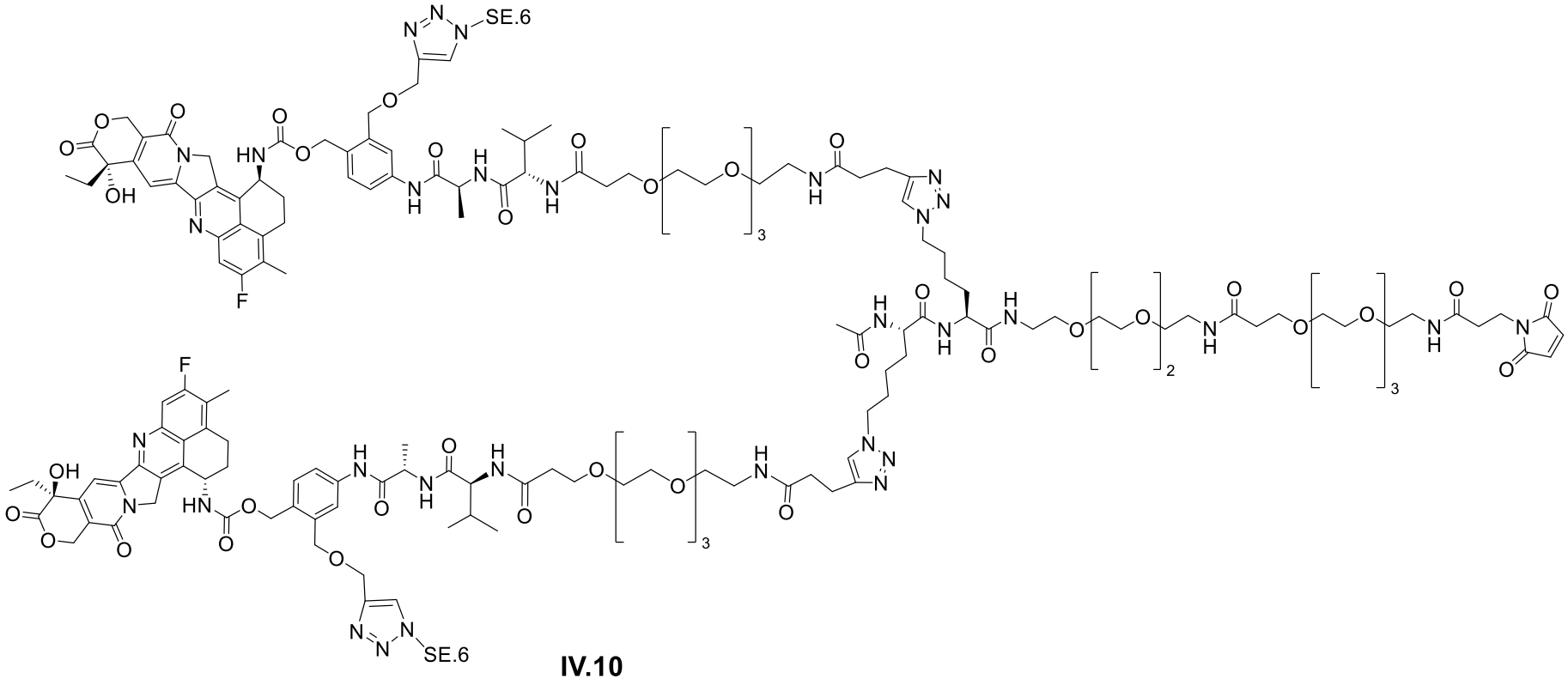
IV.7



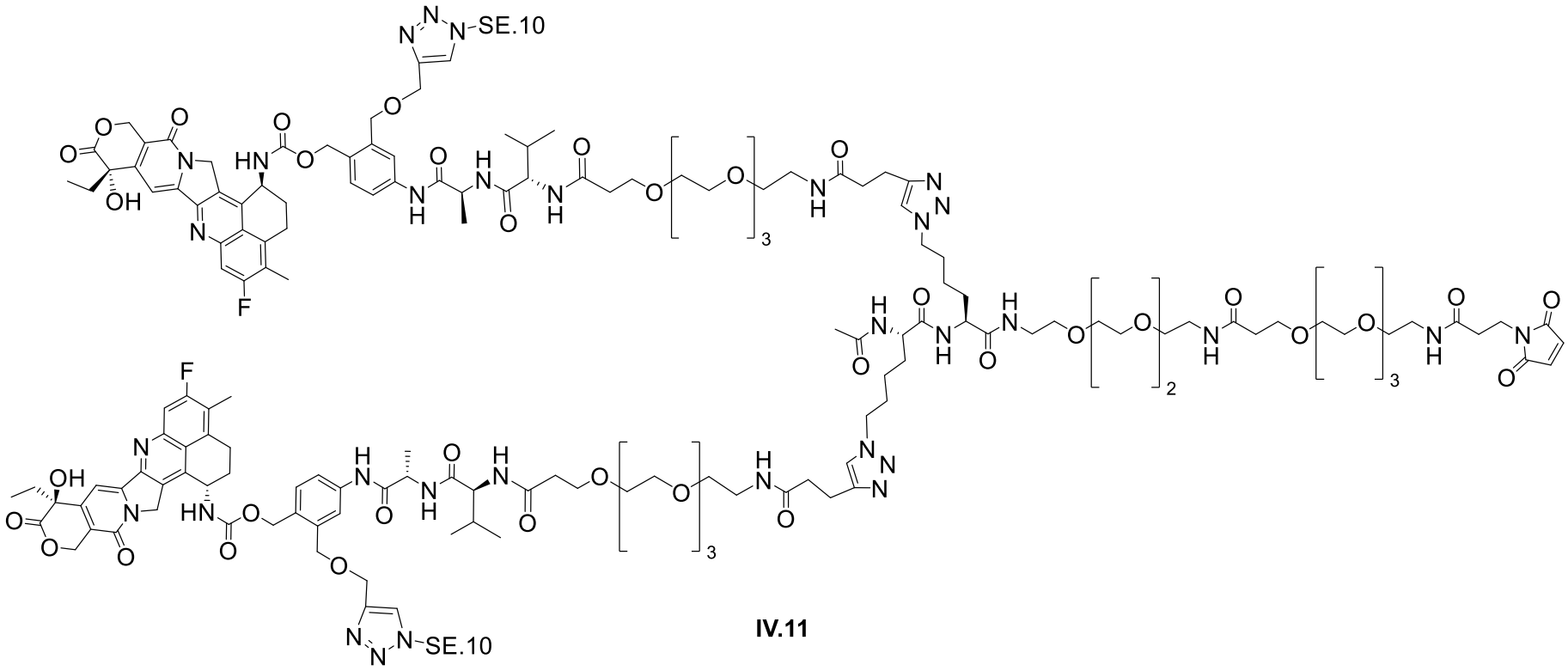
IV.8



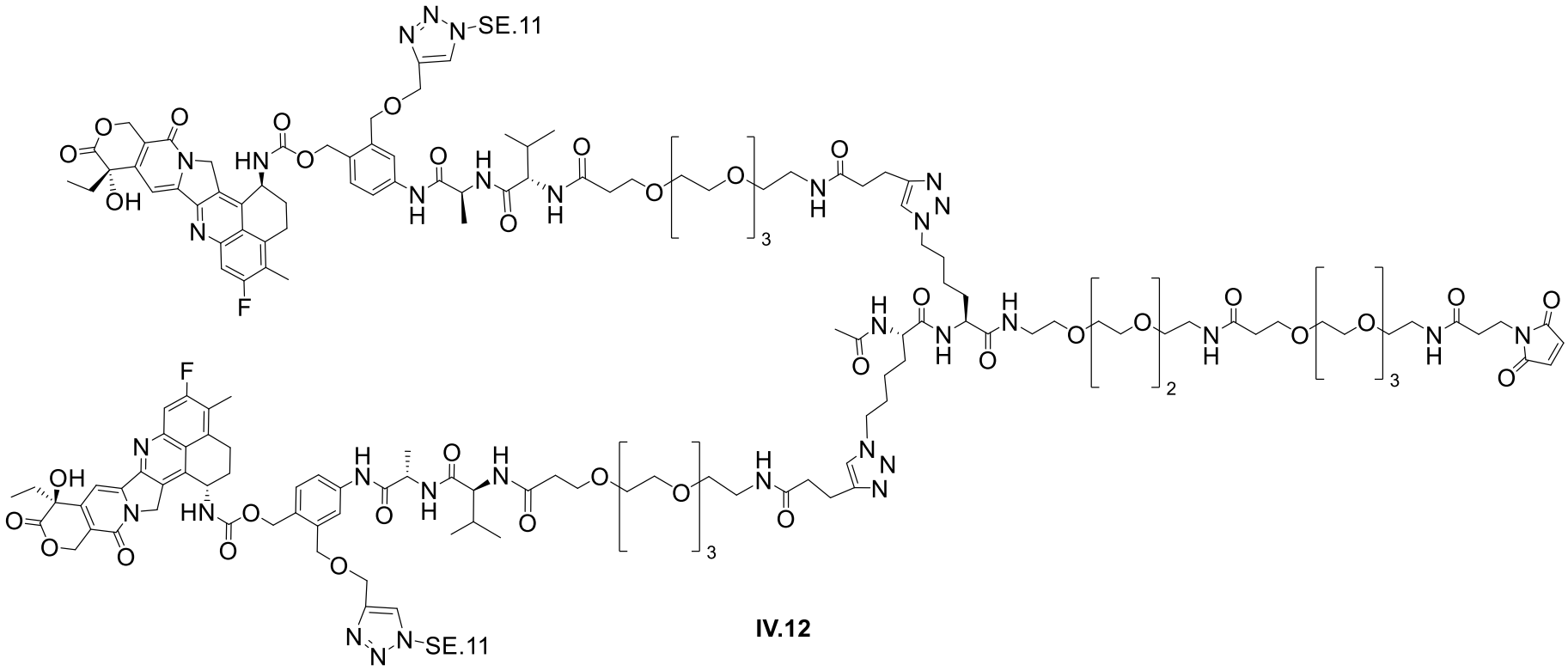
IV.9



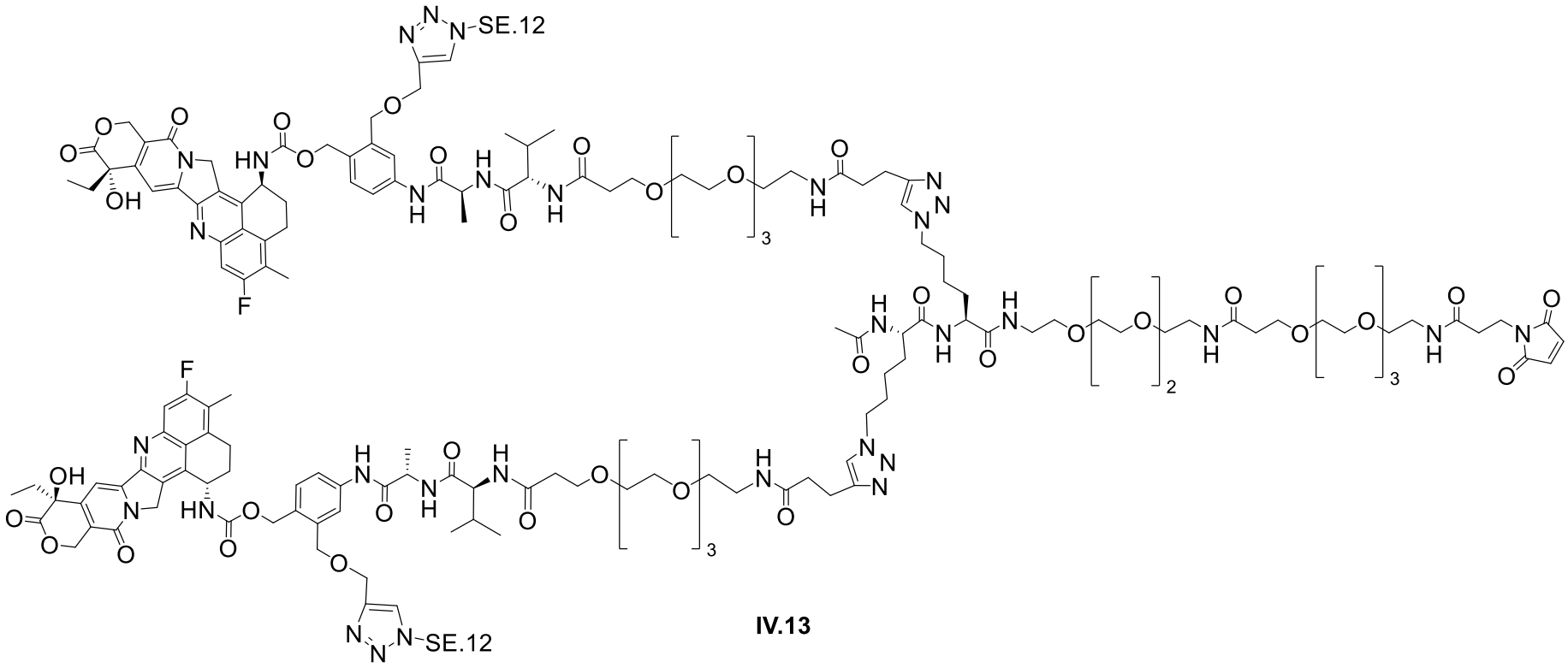
IV.10



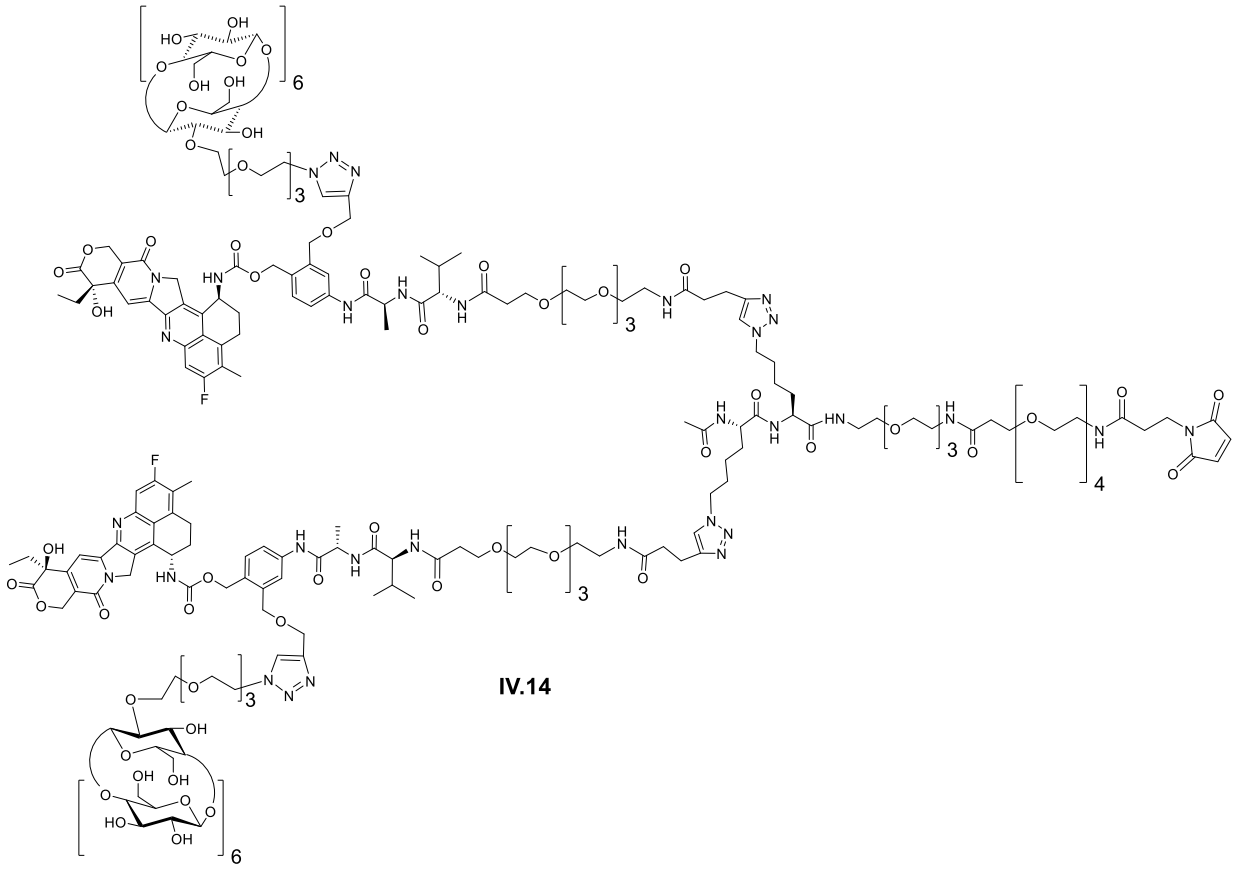
IV.11



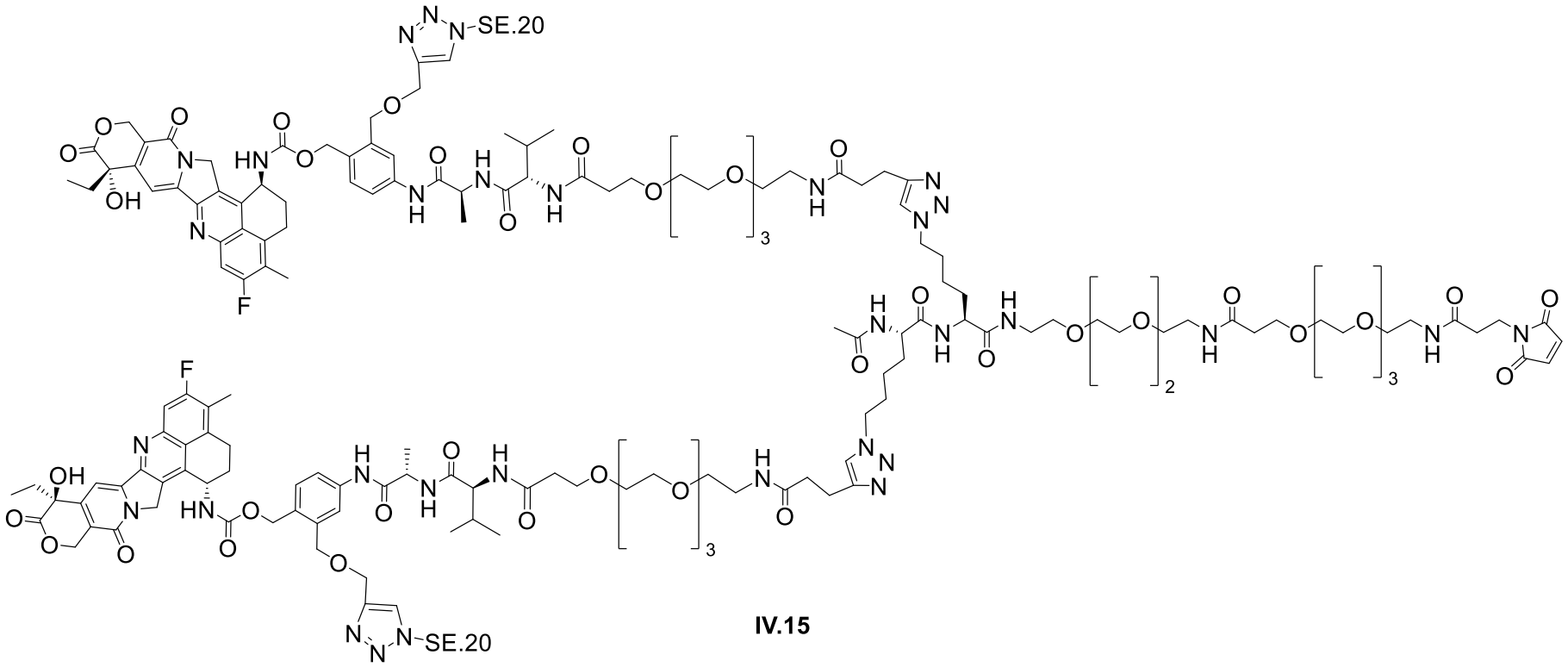
IV.12



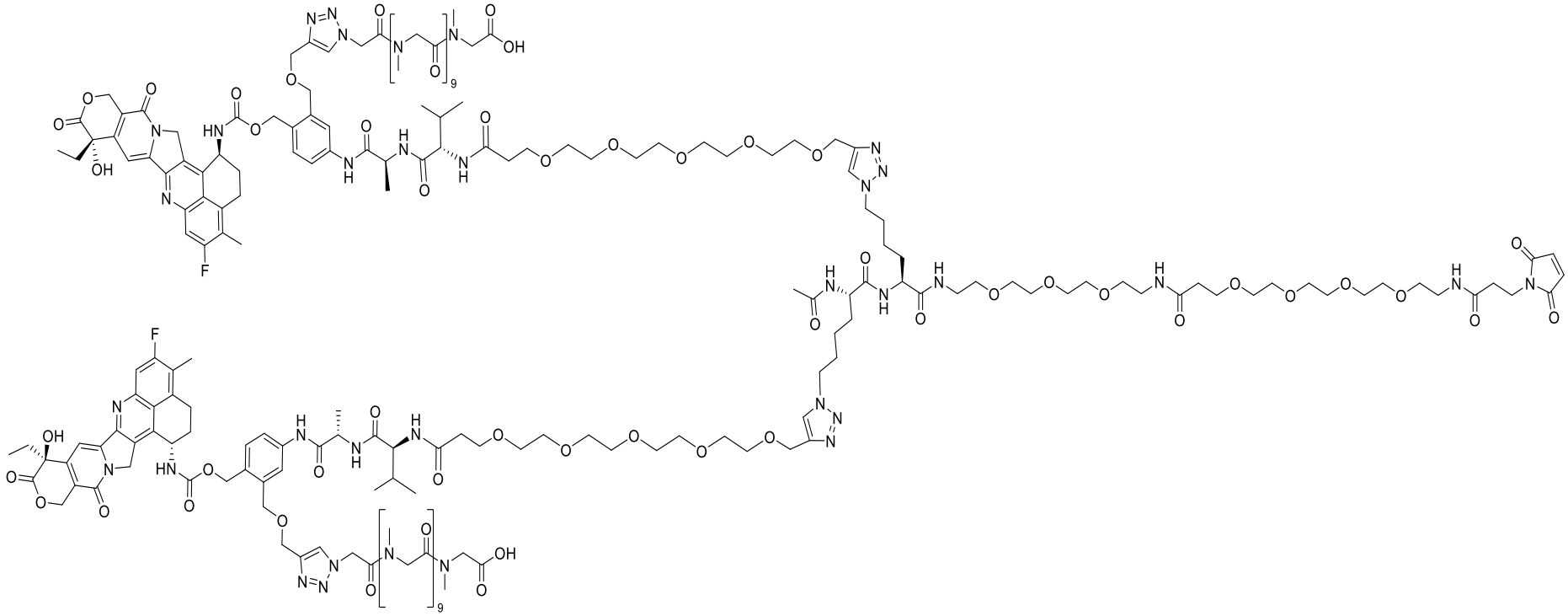
IV.13



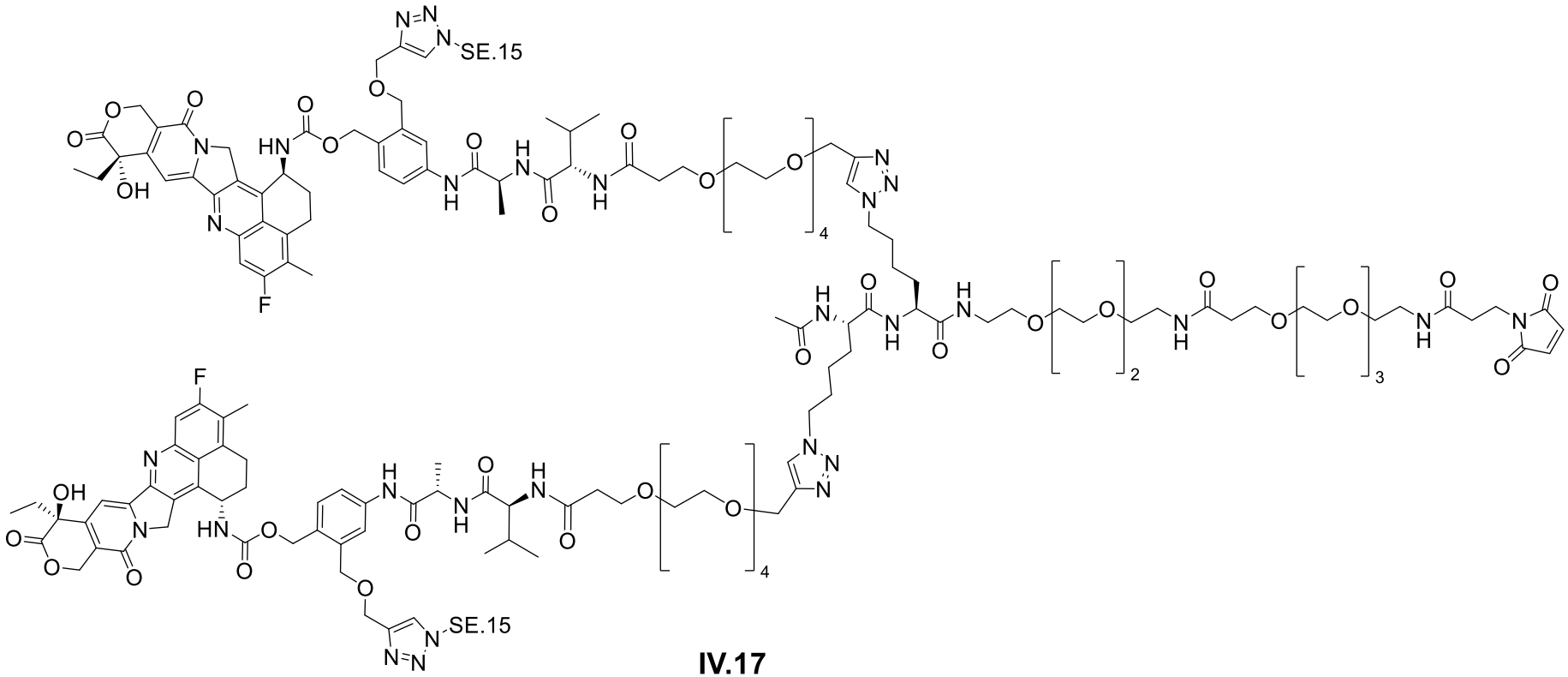
IV.14



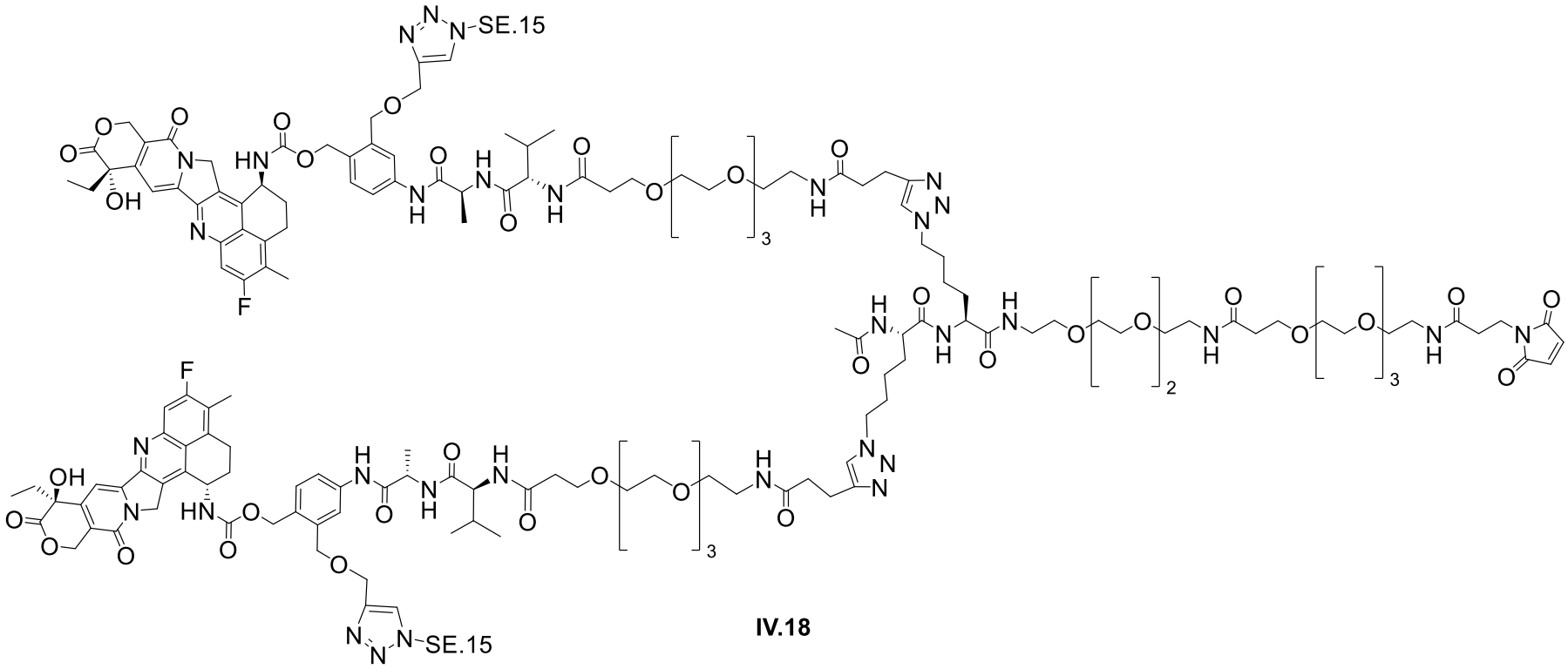
IV.15



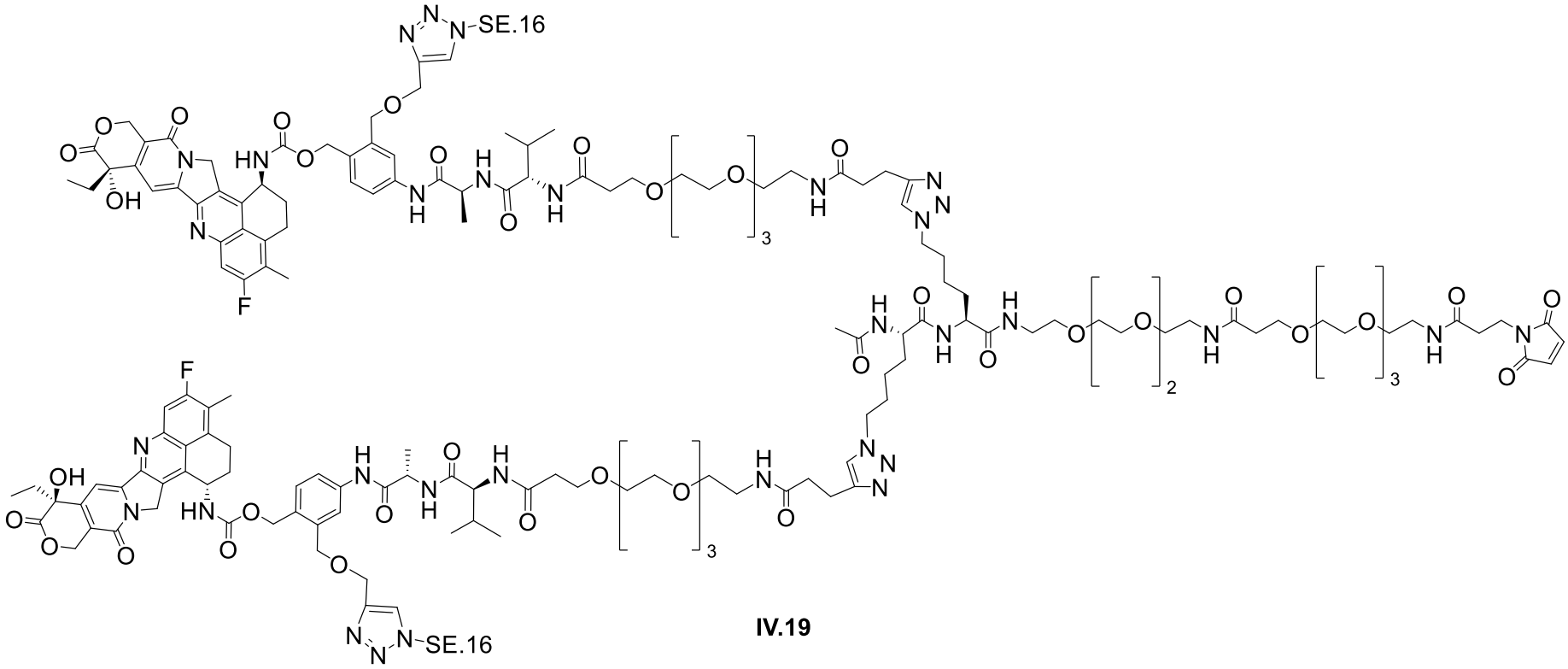
IV.16



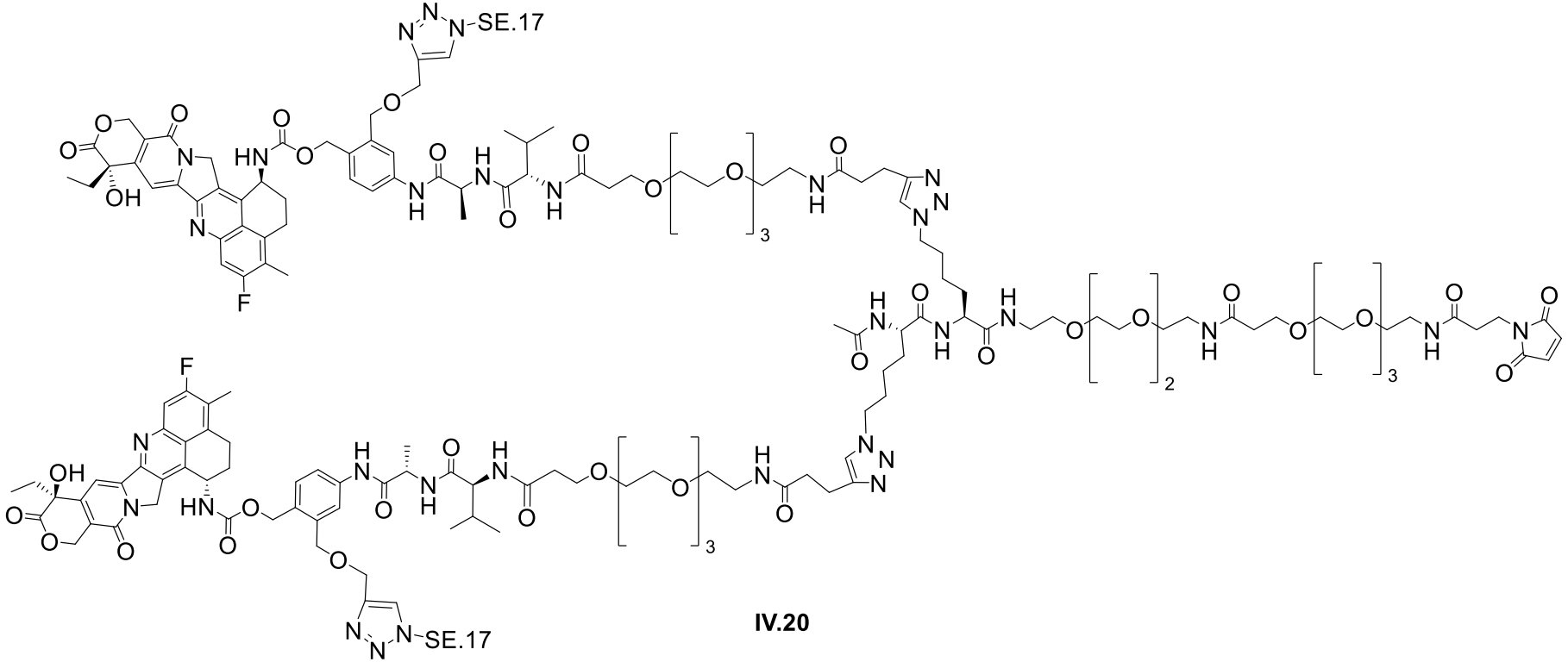
IV.17



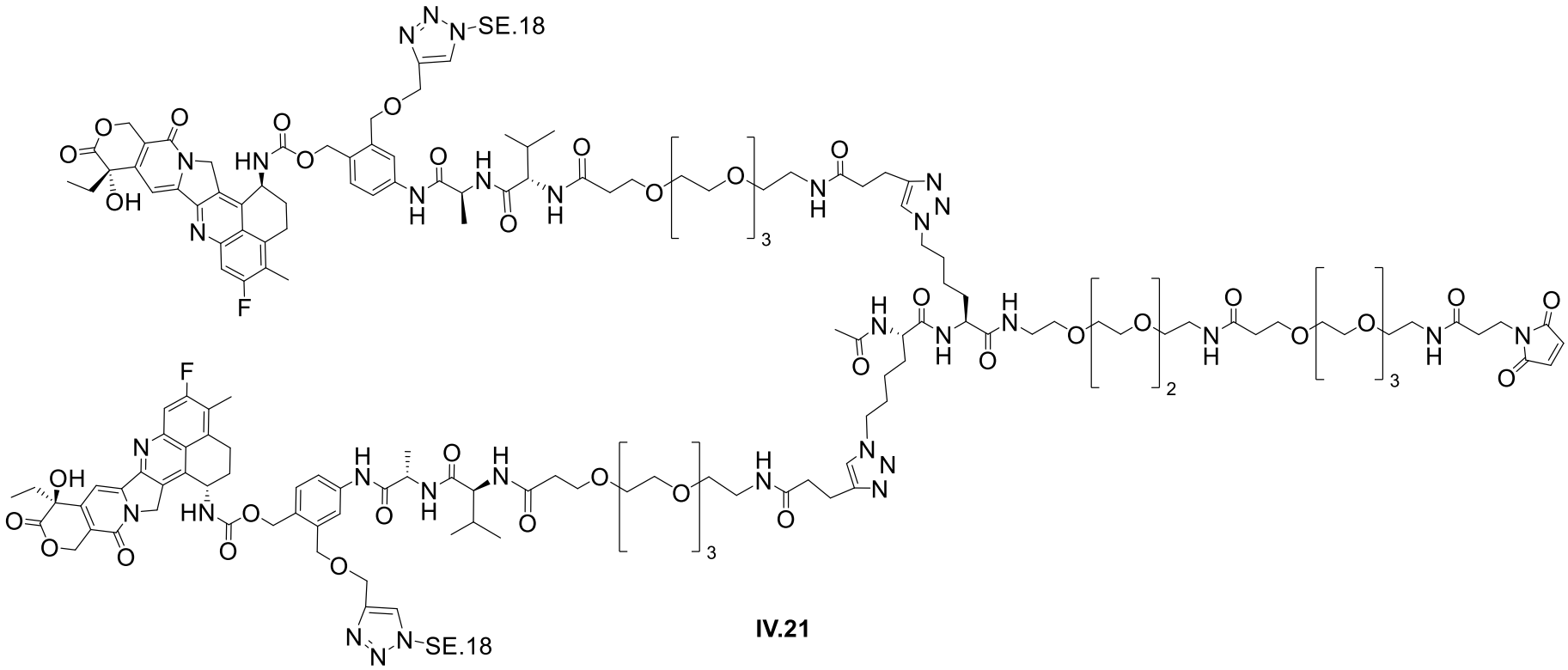
IV.18



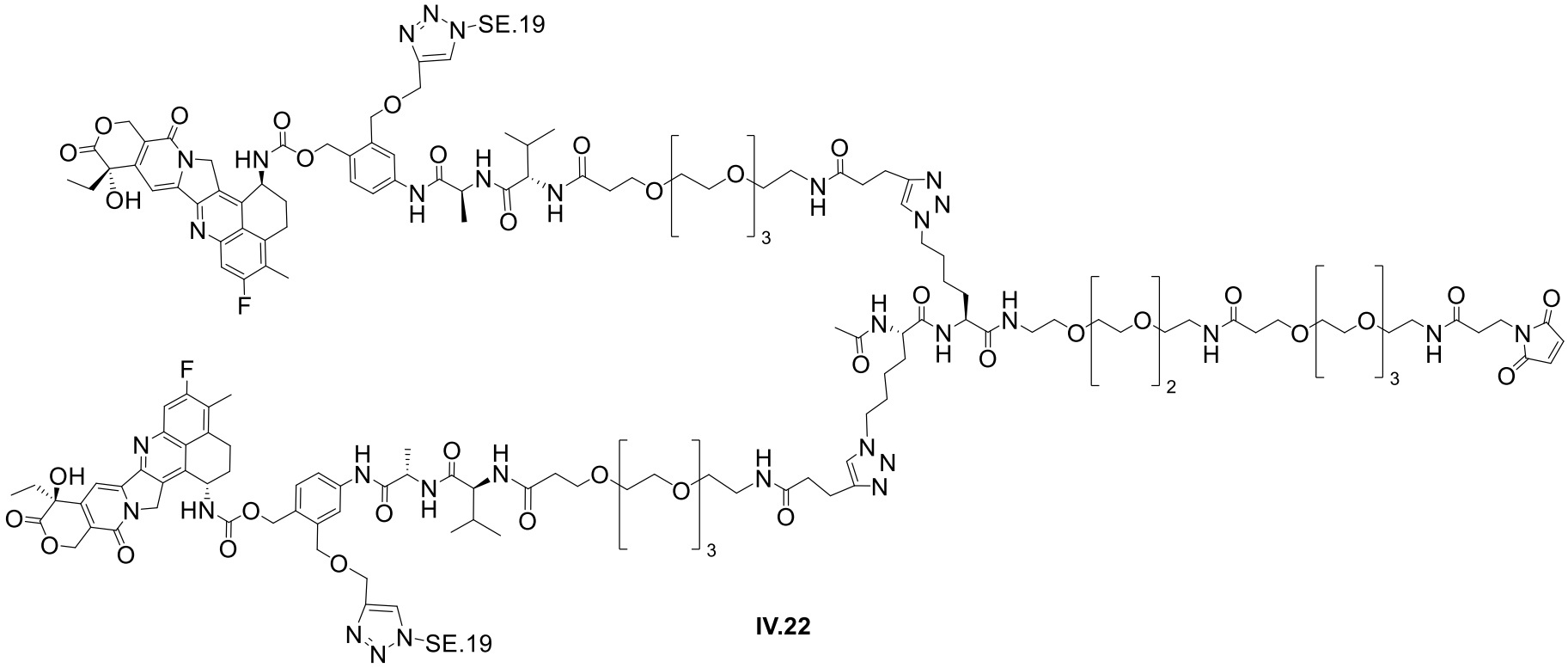
IV.19



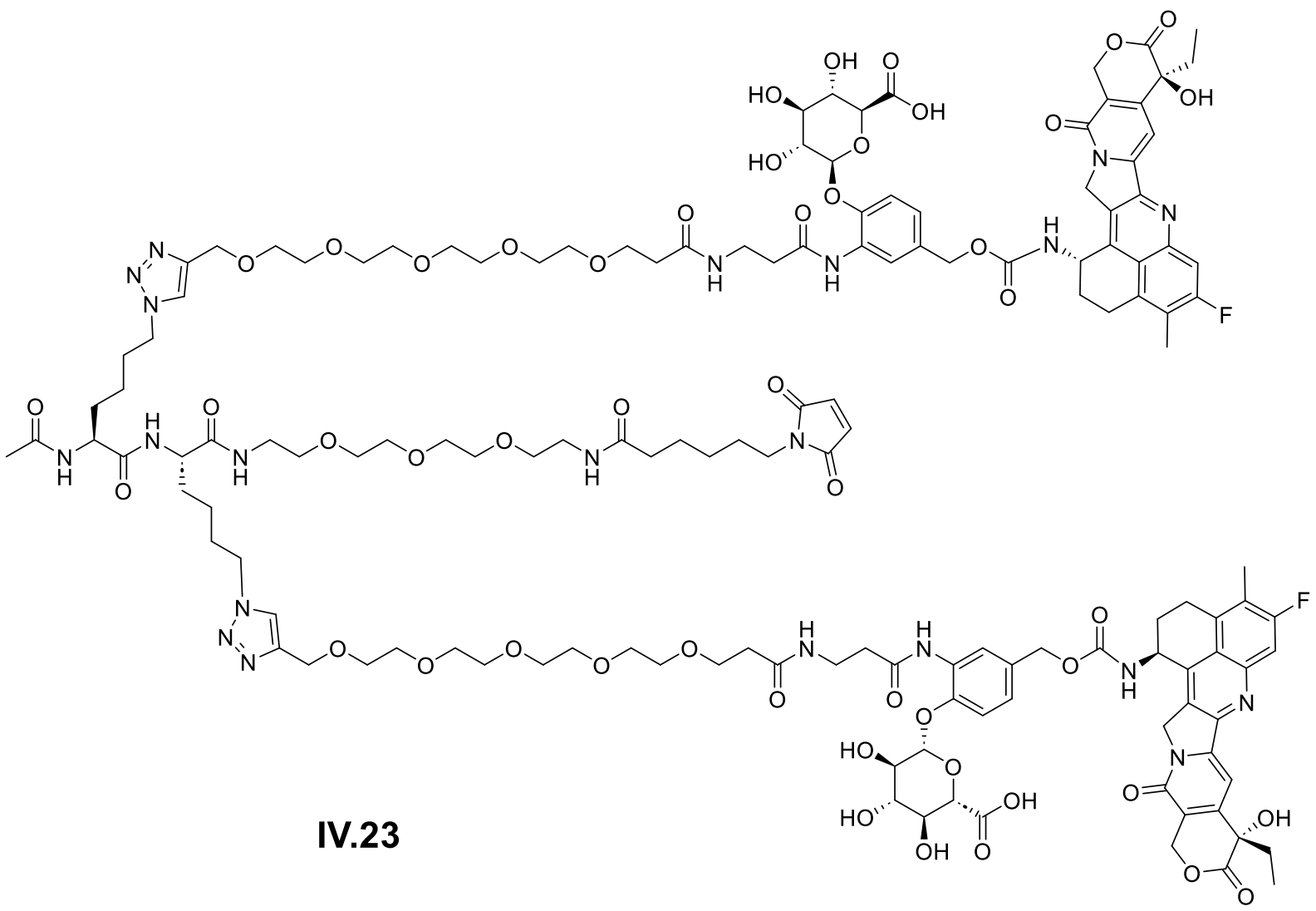
IV.20



IV.21



IV.22



IV.23

Los inventores se han dado cuenta además de que el compuesto enlazador modular del primer aspecto puede sintetizarse en un método particularmente ventajoso de alto rendimiento utilizando bloques de construcción ("building blocks"), que pueden ensamblarse de forma fiable en los compuestos enlazadores modulares de la presente invención mediante reacciones de química CLICK robustas, predecibles y ortogonales.

En consecuencia, en un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (I) según el primer aspecto, método que comprende:

(i) Poner en contacto un primer compuesto que comprende:

– una fracción inmolante,

– una secuencia peptídica W escindible,

– un grupo amino protector Pg^1, que está unido covalentemente a W,

– una sustancia farmacéuticamente activa D y

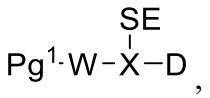
– un primer grupo complementario Cg^1

con un segundo compuesto que comprende

– un grupo potenciador de la solubilidad SE y

– un segundo grupo complementario Cg^2

para formar un intermediario de Fórmula II:



Fórmula II

donde SE está unido a X a través de R^2 y donde R^2 está formado por la reacción de Cg^1 y Cg^2;

(ii) Eliminar el grupo protector amina Pg^1 de la Fórmula II para exponer una amina primaria;

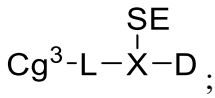
(ii) Poner en contacto dicha amina primaria con un tercer compuesto que comprende

– un espaciador Z^3,

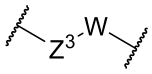
– un grupo amina reactivo, y

– un tercer grupo complementario Cg^3

para formar el intermediario de Fórmula III:



Fórmula III

donde L es 

(iv)Poner en contacto el intermediario de Fórmula III con un cuarto compuesto ramificado que comprende

– un cuarto grupo complementario Cg^4 y

– un quinto grupo complementario Cg^5,

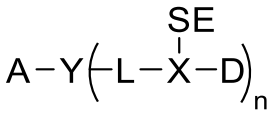
donde Cg^3 reacciona con Cg^4 para formar Z ;[2]

(v) Poner en contacto el producto de iv) con un quinto compuesto que comprende

– una fracción A reactiva para conjugación con una fracción de unión a diana y

⁻ un sexto grupo complementario Cg^6

donde la reacción de Cg^5 y Cg^6 forma Z^1, para formar el compuesto enlazador modular de Fórmula I:



Fórmula (I)

En las modalidades del método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (I) del segundo aspecto (incluyendo en las modalidades posteriormente descritas de este método del segundo aspecto),

Cg^1 puede ser un grupo alquino y Cg^2 puede ser un grupo azida o

Cg^1 puede ser un grupo amina primaria o secundaria y Cg^2 puede ser un grupo ácido carboxílico, éster carboxílico preferiblemente éster de N-hidroxisuccinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo o éster de N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo o amida.

Además, en las modalidades del método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (I) del segundo aspecto (incluyendo en las modalidades descritas posteriormente de este método del segundo aspecto),

Cg^3 puede ser un grupo alquino y Cg^4 puede ser un grupo azida;

Cg^3 puede ser un grupo azida y Cg^4 puede ser un grupo alquino;

Cg^3 puede ser un grupo amina primaria o secundaria y Cg^4 puede ser un grupo ácido

carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster N-hidroxisuccinimida, éster tetrafluorofenílico, éster pentafluorofenílico o éster N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo, amida, carbamato, haluro de carbamoilo o urea; o

Cg^3 puede ser un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster de N-hidroxisuccinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo o éster de N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, halogenuro de acilo, amida, carbamato, halogenuro de carbamoilo o grupo urea y Cg^4 puede ser un grupo amina primaria o secundaria.

En otras modalidades del método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (I) del segundo aspecto (incluyendo en las modalidades descritas posteriormente de este método del segundo aspecto),

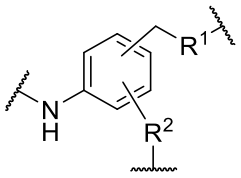
Cg^5 puede ser un grupo amina primaria o secundaria y Cg^6 puede ser un grupo ácido carboxílico, un éster carboxílico, preferiblemente un éster N-hidroxisuccinimida, un éster tetrafluorofenílico, un éster pentafluorofenílico o un éster N-hidroxiftalimida, un anhídrido carboxílico, un haluro de acilo o amida; o

Cg^5 puede ser un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster N-hidroxisuccinimida, éster tetrafluorofenílico, éster pentafluorofenílico o éster N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo o grupo amida y Cg^6 puede ser un grupo amina primaria o secundaria.

En algunas modalidades del método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (I) del segundo aspecto (incluyendo en las modalidades posteriormente descritas de este método del segundo aspecto), el grupo amino protector Pg^1 puede ser un grupo carbobenciloxi (Cbz), terc-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetilo (Ac), benzoilo (Bz), bencilo (Bn), p-betoxibencilo (PMB), p-toluenosulfonilo (Ts) o carbamato.

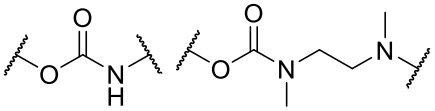
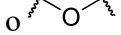
Como se describirá con más detalle en los Ejemplos siguientes, en algunas modalidades, se emplea la conocida reacción de química de clic de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (reacción CuAAC) para conectar de forma altamente eficiente varios bloques de construcción del compuesto enlazador modular de Fórmula (I) durante los pasos del método para sintetizar el compuesto enlazador modular del segundo aspecto.

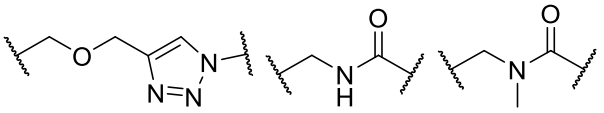
En este método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (I),

X es un espaciador autoinmolante, 

donde:

R^1 une covalentemente X a D en para, meta u orto al grupo amino de X y

es un enlace o,  o  ; y

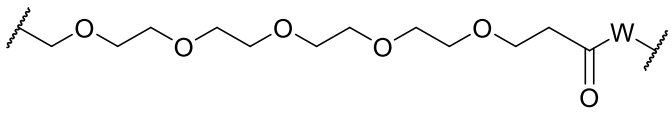
R^2 conecta X con SE y es,  o -O-;

En algunas modalidades, la secuencia peptídica W escindible o no escindible se selecciona del grupo que consiste en:

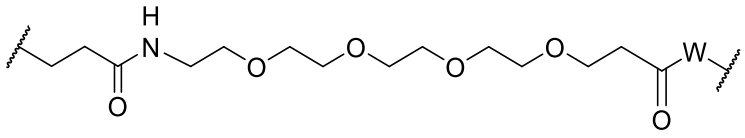
Val-Ala, Val-Cit, Met-Thr, Thr-Thr, Phe-Lys, Glu-Val-Ala, Glu-Val-Cit, Gly-Gly-Phe-Gly, Gly-Gly-Tyr-Gly, cBu-Ala, cBu-Cit, Glu-cBu-Ala, Glu-cBu-Cit, Asp-cBu-Ala, Asp-cBu-Cit, Asp-Pro-Val, Asn-Pro-Val, iGlu-cBu-Ala, iGlu-cBu-Cit, Val-Lys, Val-Arg, Val-Gln, Val-Met, Val-Thr, AcLys-Val-Cit, AcLys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, iGlu-Val-Ala, Asp-Val-Cit, iGlu-Val-Cit, Tyr-Arg, Tyr-Met, Phe-Cit, Phe-Ala, Phe-Arg, Phe-Met, Phe-Gln, Phe-Arg-Arg-Gly, Phe-Arg-Arg-Leu, Phe-Arg-Arg-Leu-Gly, Phe-Leu-Arg-Arg-Gly, Ala-Lys, Leu-Cit, Leu-Gln, Ile-Cit, Ala-Ala-Asn, Ala-Asn, Ala-Ala, Asn-Asn, Asn, beta-Ala, y Lys o sus combinaciones; y

en donde Z^3 es un enlace o un espaciador que comprende una cadena de alquilo C_{1-20} o un polietilenglicol de 1 a 10 $(PEG)_{1-10}$ o un C_2-amida-PEG_{1-10} ;

en donde L es preferiblemente

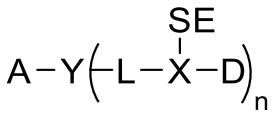


o



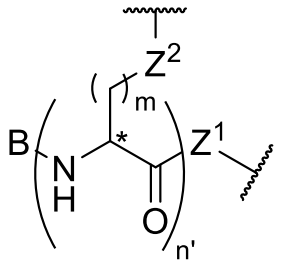
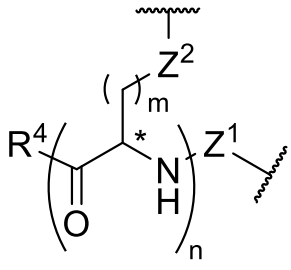
Como se ha descrito anteriormente, la unidad de ramificación Y del compuesto enlazador modular de

Fórmula (I)

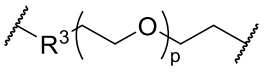
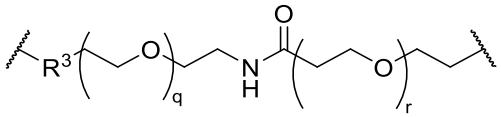


Fórmula (I)

que se sintetiza en el método del segundo aspecto es:


o

;

m es un número entero entre 1 y 6;

Z^1 conecta Y a A y es  o  , donde

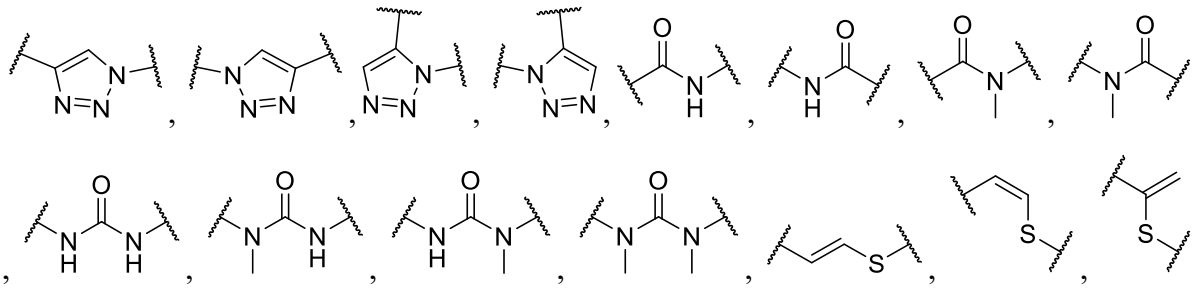
R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH_3)C(=O)-, y

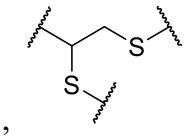
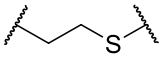
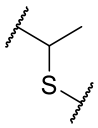
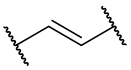
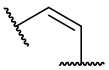
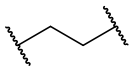
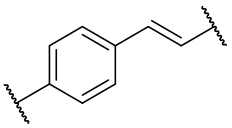
p es un número entero entre 1 y 24, preferiblemente de 4 a 24, más preferiblemente de 8 a 24, como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24;

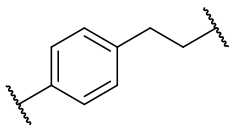
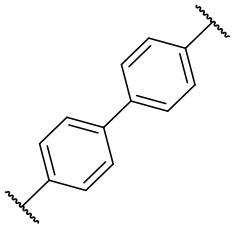
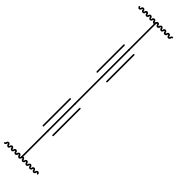
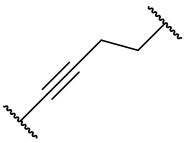
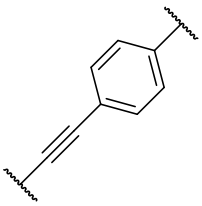
q es un número entero entre 1 y 8, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

r es un número entero entre 1 y 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, de 4 a 16, de 6 a 14, de 8 a 12, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

Z^2 conecta Y a L y es un 1,2,3-triazol, una amida o un derivado de urea, seleccionado del grupo que consiste en:

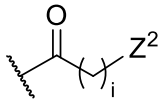
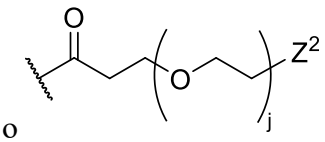



,  ,  ,  ,  ,  ,  ,


,  ,  ,  , y  .

B es:

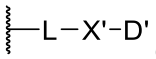
una caperuza, preferiblemente un grupo acilo, y n' es n; o


o  , donde

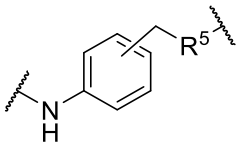
i es un número entero entre 1 y 20,

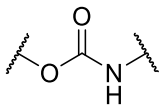
j es un número entero comprendido entre 1 y 10, y

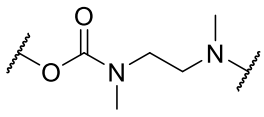
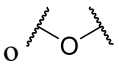
n' es n menos 1; o


donde

D' es una sustancia farmacéuticamente activa diferente de D; y

X' es el espaciador autoinmolante  , donde:

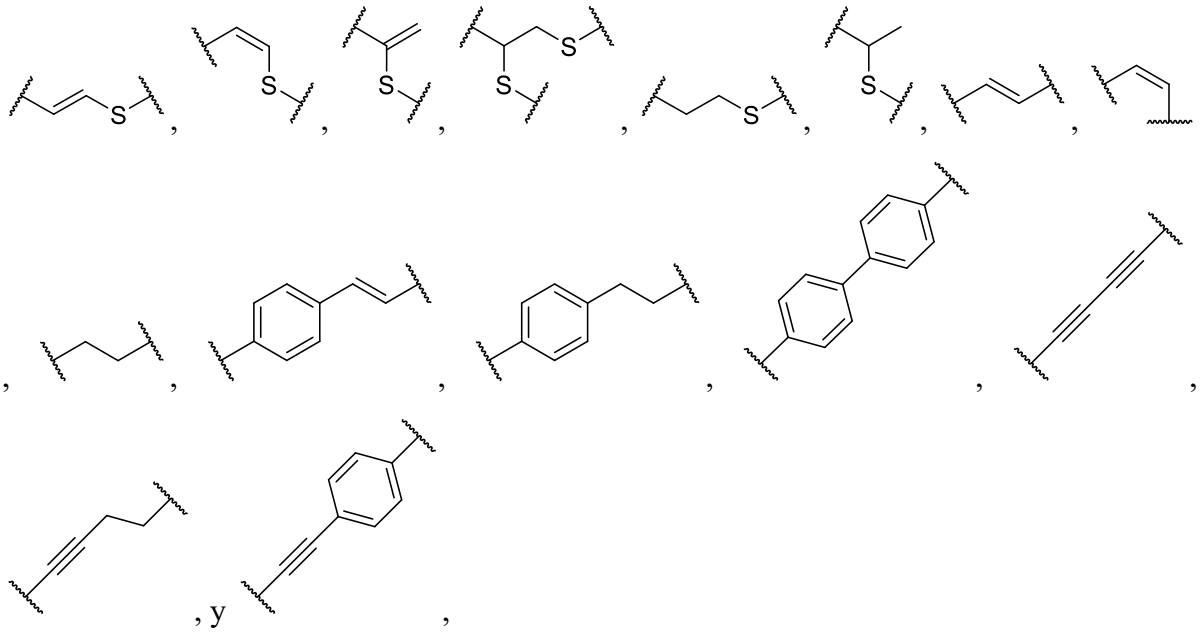
R^5 une covalentemente X' a D' en para u orto al grupo amino de X' y es un enlace, 

, 
o  ,

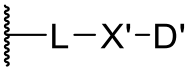
y n' es n;

R^4 es OH o NH_2

Si Z^4 se selecciona del grupo formado por

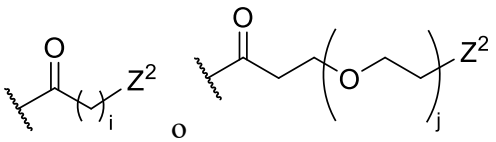


puede unirse o utilizarse en reacciones tiol-ino/eno, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado como, por ejemplo, acoplamiento de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y Glaser.

En modalidades en las que B es  Z^3 en L puede comprender además una fracción carbonílica terminal, como un ácido dicarboxílico, para la unión de L al grupo amino de Y.

Independientemente de si B es

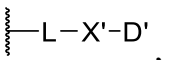
una caperuza, preferiblemente un grupo acilo, donde n' es n; o

 , donde

i es un número entero entre 1 y 20,

j es un número entero comprendido entre 1 y 10, y

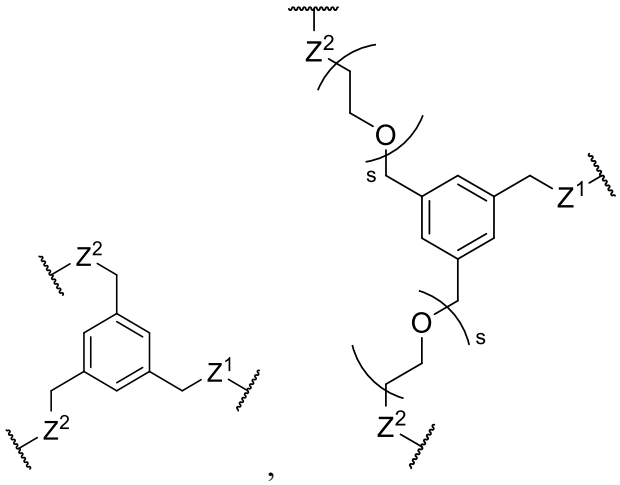
n' es n menos 1; o

una unidad  ,

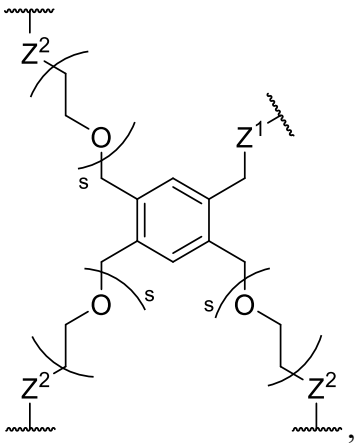
B constituye la terminación de la unidad de ramificación final Y en el núcleo multimérico del compuesto enlazador modular de Fórmula (I) sintetizado en estas modalidades del segundo aspecto.

Como se ha descrito anteriormente, el núcleo multimérico en un compuesto enlazador modular de Fórmula (I) sintetizado por el método del segundo aspecto puede comprender n=2 a 5, preferiblemente 2, 3, 4 o 5, unidades de ramificación Y, donde la unidad de ramificación proximal a A está conectada a A a través de Z^1 y la unidad de ramificación final (es decir, la unidad de ramificación distal a A comprende B. Cada unidad de ramificación Y en esta modalidad está indirectamente unida a una molécula de una sustancia farmacéutica D a través del espaciador Z^2, el espaciador L y el espaciador inmolante X.

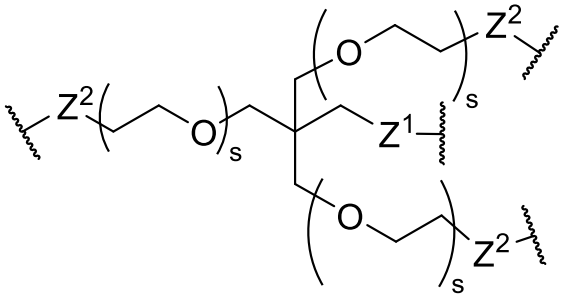
En modalidades alternativas, la unidad de ramificación Y del compuesto enlazador modular de la Fórmula (I) que se sintetiza en este método del segundo aspecto es:



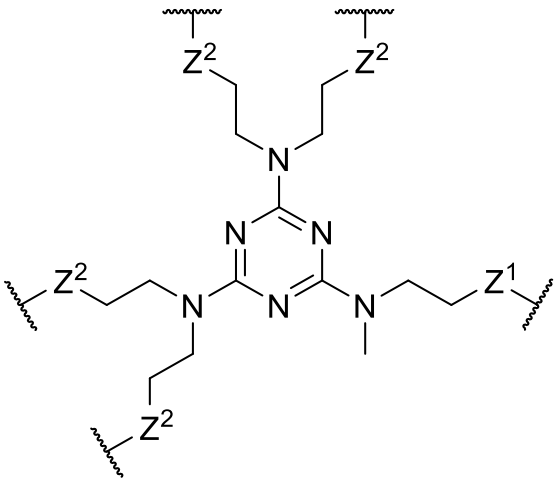
,



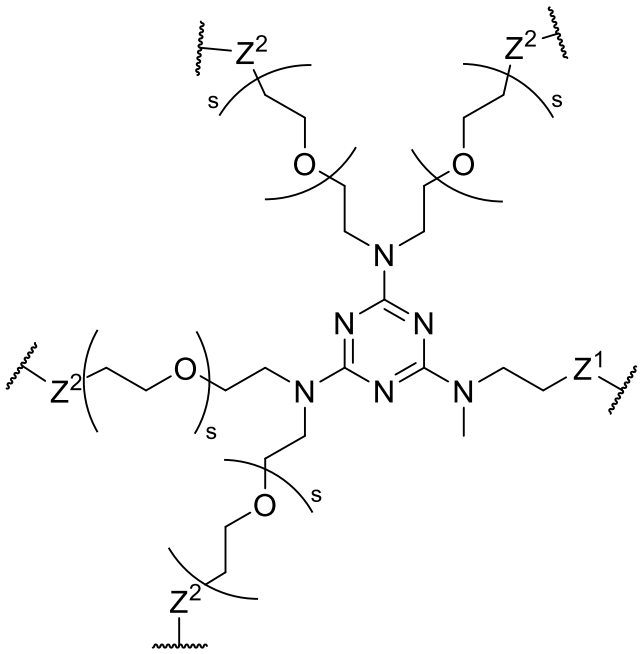
,



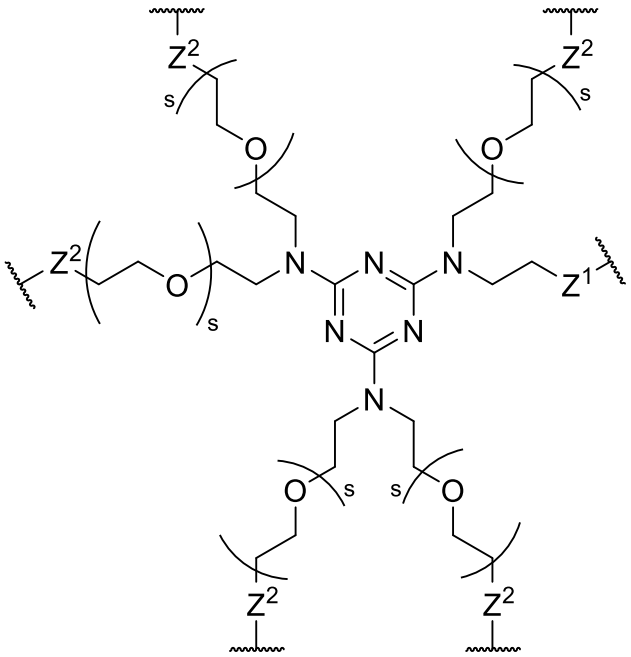
,



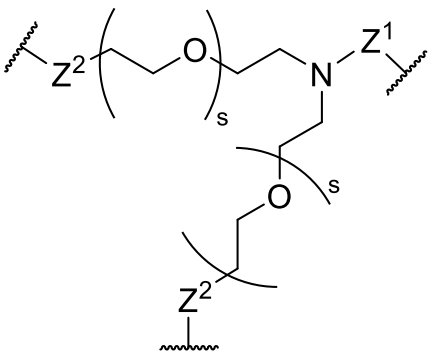
,



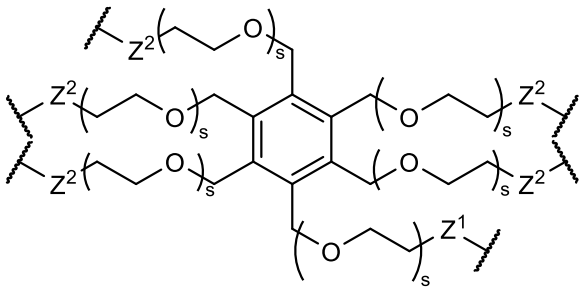
,



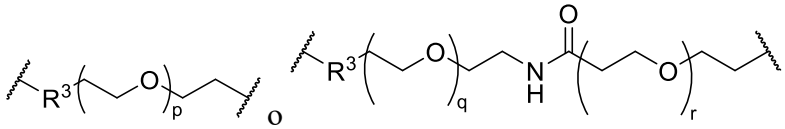
,



o


;

Z^1 conecta Y con A y es


, donde

R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH_3)C(=O)-,

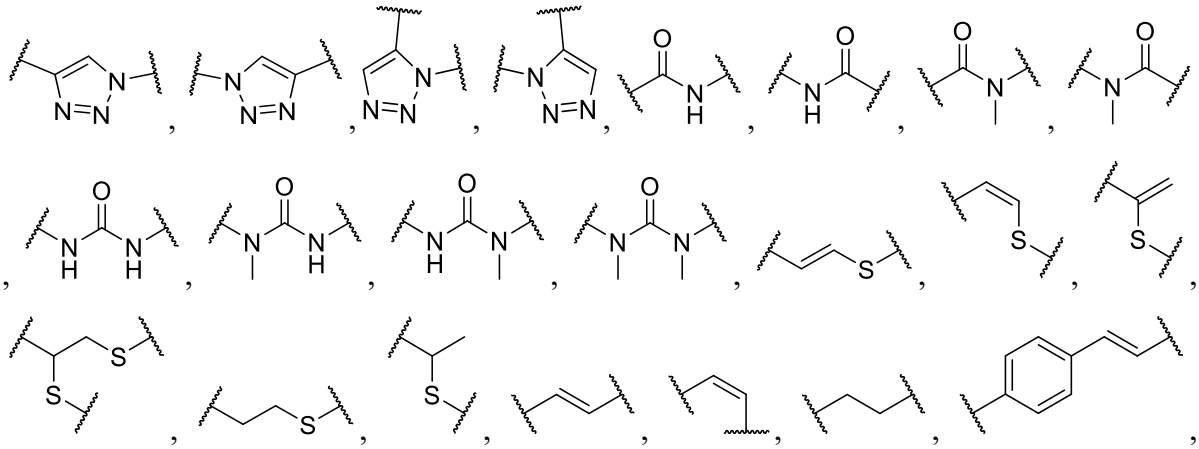
p es un número entero entre 1 y 24, preferiblemente de 4 a 24, más preferiblemente de 8 a 24, como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24;

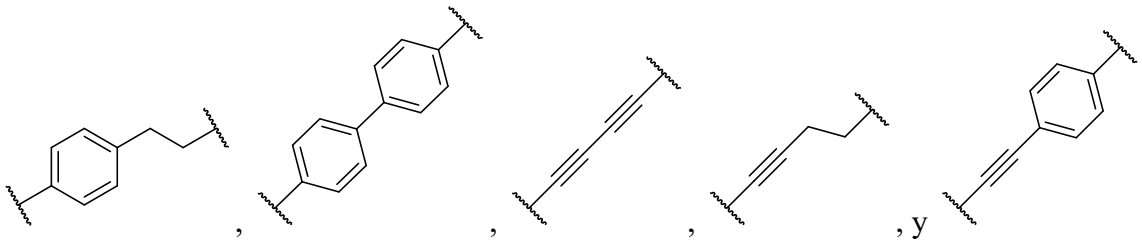
q es un número entero entre 1 y 8, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

r es un número entero entre 1 y 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, de 4 a 16, de 6 a 14, de 8 a 12, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

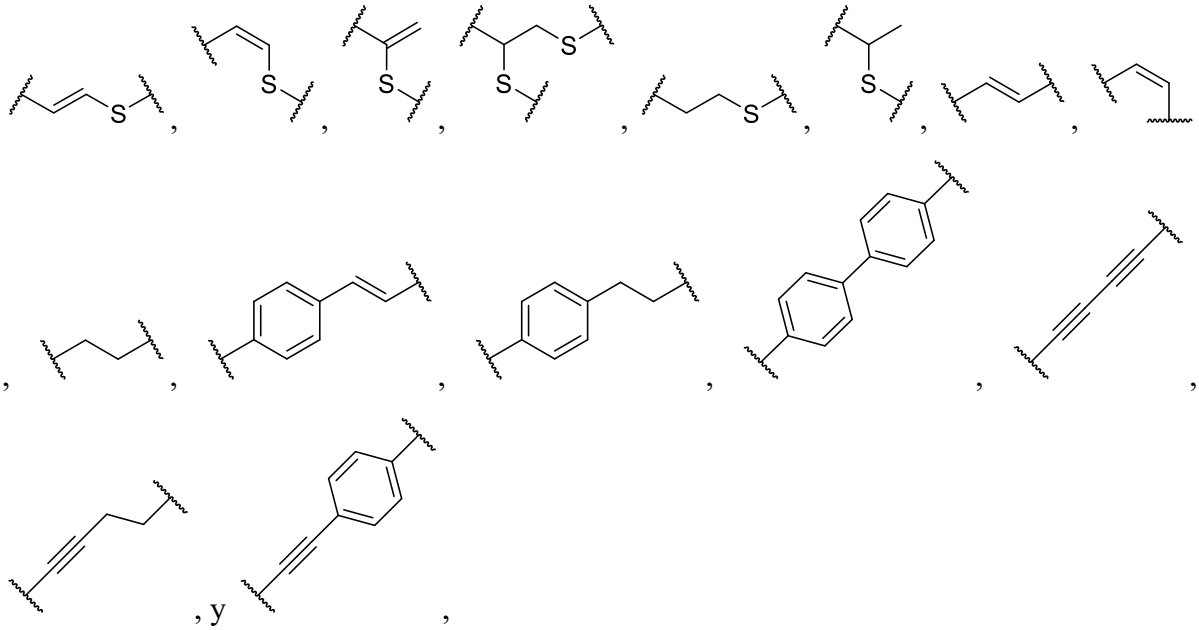
s es un número entero entre 0 y 4, como 0, 1, 2, 3 o 4;

Z^2 conecta Y a L y es un 1,2,3-triazol, una amida, una amida o un derivado de urea, seleccionado del grupo que consiste en:





Si Z^4 se selecciona del grupo formado por



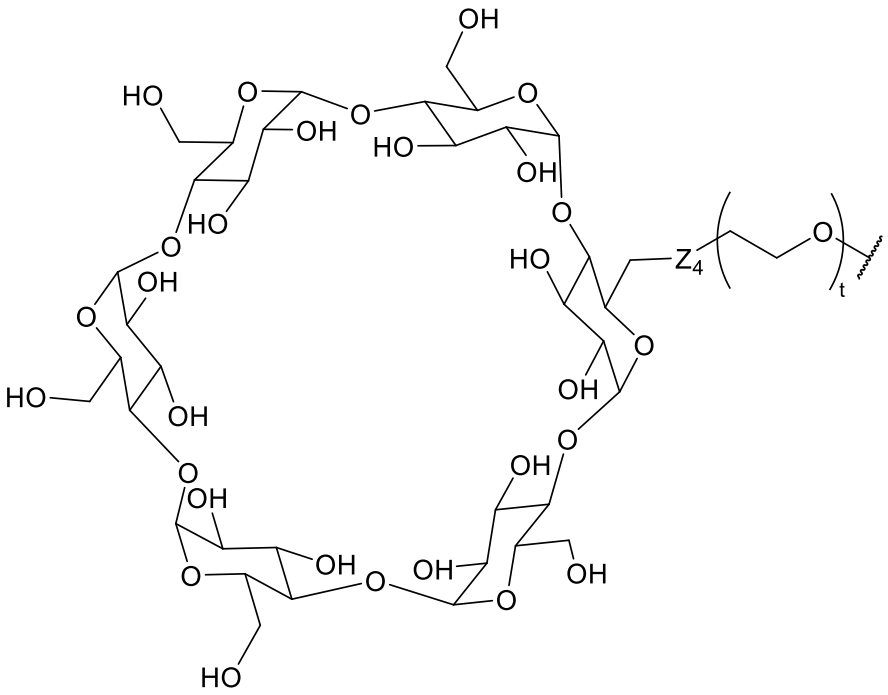
puede unirse o utilizarse en reacciones tiol-ino/eno, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado como, por ejemplo, acoplamiento de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y Glaser.

Dependiendo de cuál de las unidades de ramificación alternativas Y mostradas anteriormente se emplee, el DOL del compuesto enlazador modular de Fórmula (I) puede ser 2, 3, 4 o 5.

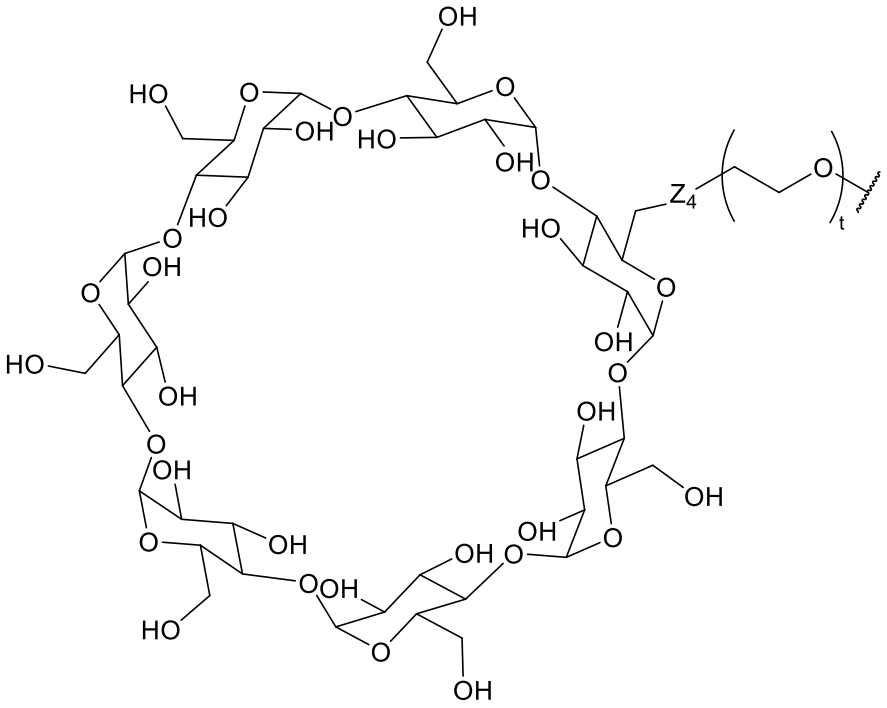
Por consiguiente, en algunas modalidades del método para sintetizar un compuesto de enlazador modular de la presente invención, las sustancias farmacéuticamente activas D y D', es decir. la sustancia o sustancias farmacológicas citotóxicas incorporadas en el compuesto de enlazador modular con el DOL descrito anteriormente y que se administrarán a las células diana cancerosas, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: camptotecinas, preferiblemente exatecán, SN38 y topotecán; auristatinas, preferiblemente seleccionadas entre monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF) maitansinoides, seleccionados preferiblemente entre mertansina (DM1) y ravtansina (DM4); calicheamicinas; agonistas del receptor tipo Toll 7 (TLR7); inhibidor de la nicotinamida

fosforribosiltransferasa (NAMPT) ($NAMPT_i$): pirrolobenzodiazepinas (PBD); duocarmicinas; antraciclinas, preferiblemente doxorrubicina; amatoxinas, preferiblemente alfa-amanitina, beta amanitina, amanina y amaninamida; criptoficinas; faloidinas; seco-ciclopropilpirroloindolina (seco-CPI); seco-ciclopropilbenzoindolina (seco-CBI); taxoles; vinblastinas; colchicinas; eribulinas; metotrexato (MTX); triptolida; y sus derivados.

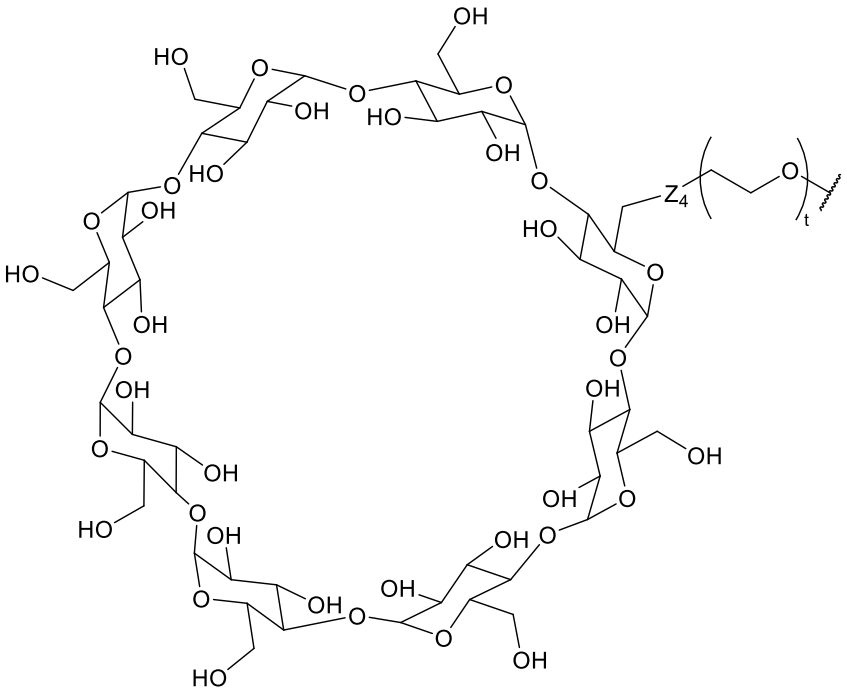
Además de lo anterior, las ciclodextrinas son grupos potenciadores de la solubilidad SE especialmente adecuados en el contexto de los compuestos enlazadores aquí descritos y su método de síntesis. Por ejemplo, las alfa-ciclodextrinas (que comprenden seis moléculas de glucosa), las beta-ciclodextrinas y las gamma-ciclodextrinas, cuando se unen a una cadena de PEG directamente o a través de un espaciador Z^4 tal como:



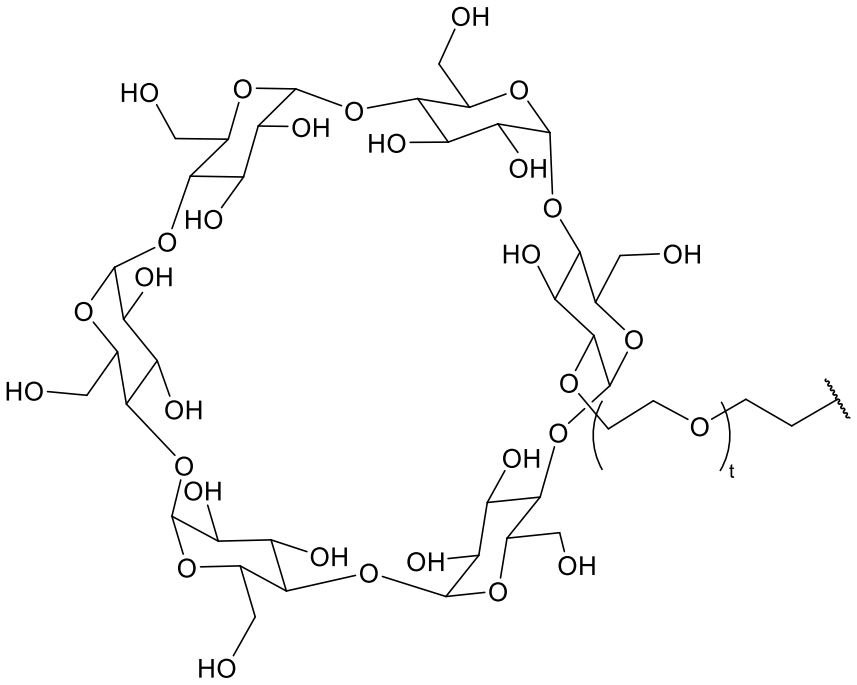
,


OH
HO
O
OH
HO
O
HO
OH
O
Z4
O
t
HO
O
OH
O
OH
HO
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
O
OH
O
OH
HO
O
OH
O
OH
HO

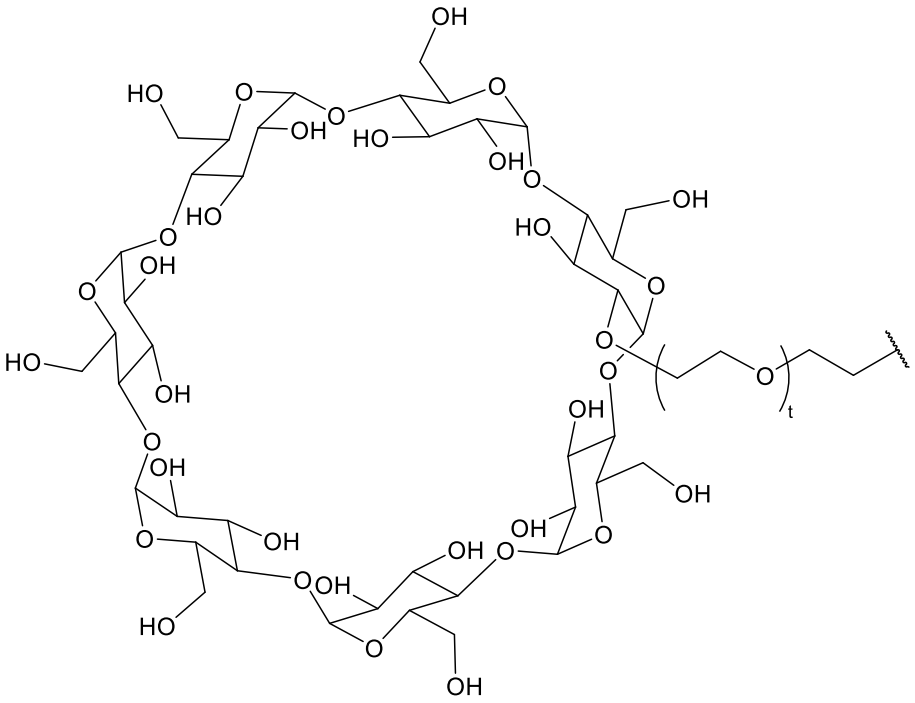
,


OH
HO
O
OH
HO
O
HO
OH
O
Z4
O
t
HO
O
OH
O
OH
HO
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
O
OH
O
OH
HO
O
OH
O
OH
HO

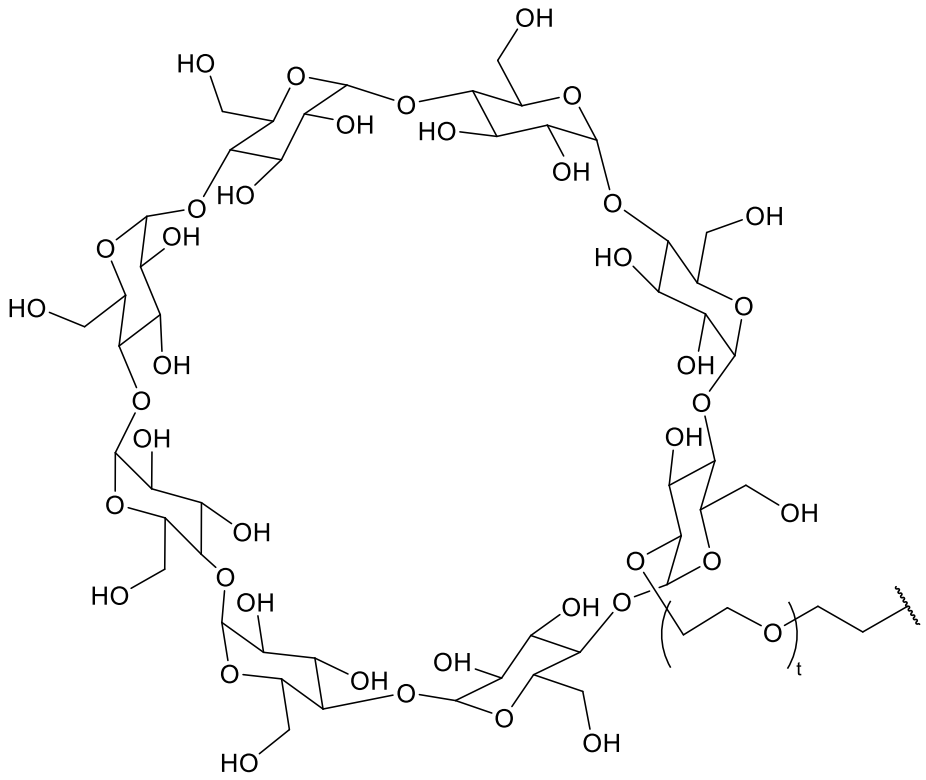
,


OH
HO
O
OH
HO
OH
HO
O
HO
OH
O
OH
O
HO
OH
O
O
O
t
O
OH
OH
O
OH
OH
OH
O
O
OH
HO

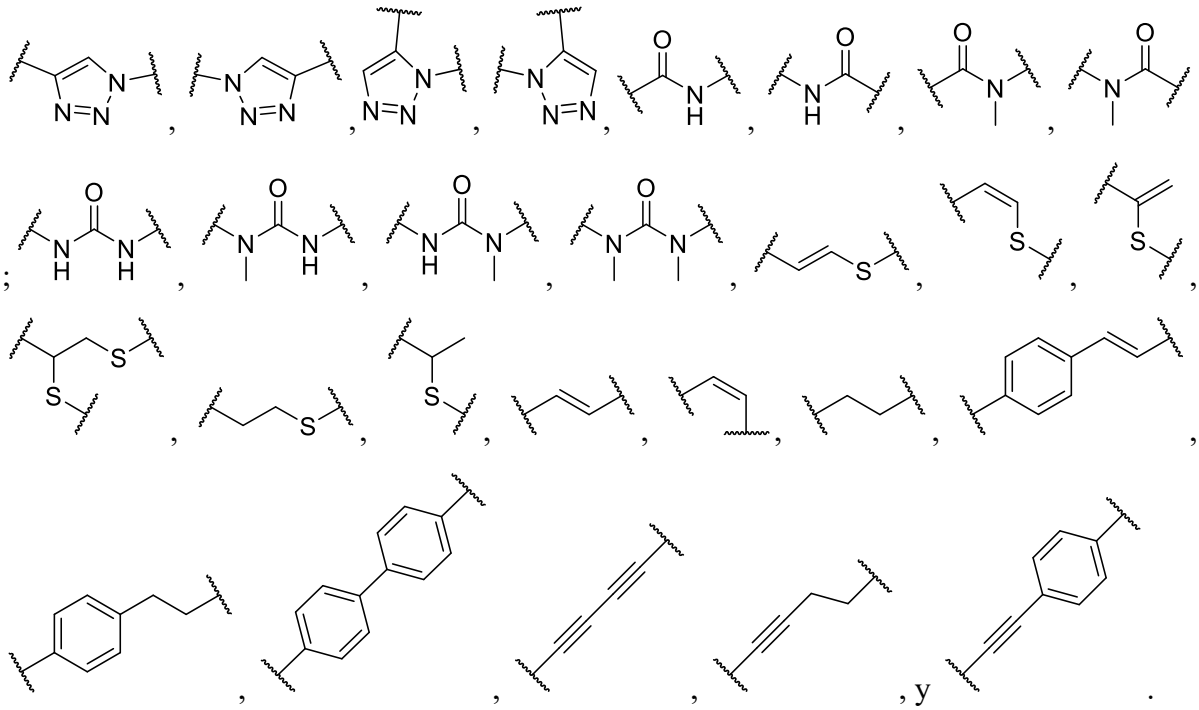
,


OH
HO
O
OH
HO
OH
HO
O
HO
OH
O
OH
O
HO
OH
O
O
O
t
O
OH
OH
O
OH
OH
OH
O
O
OH
HO

,



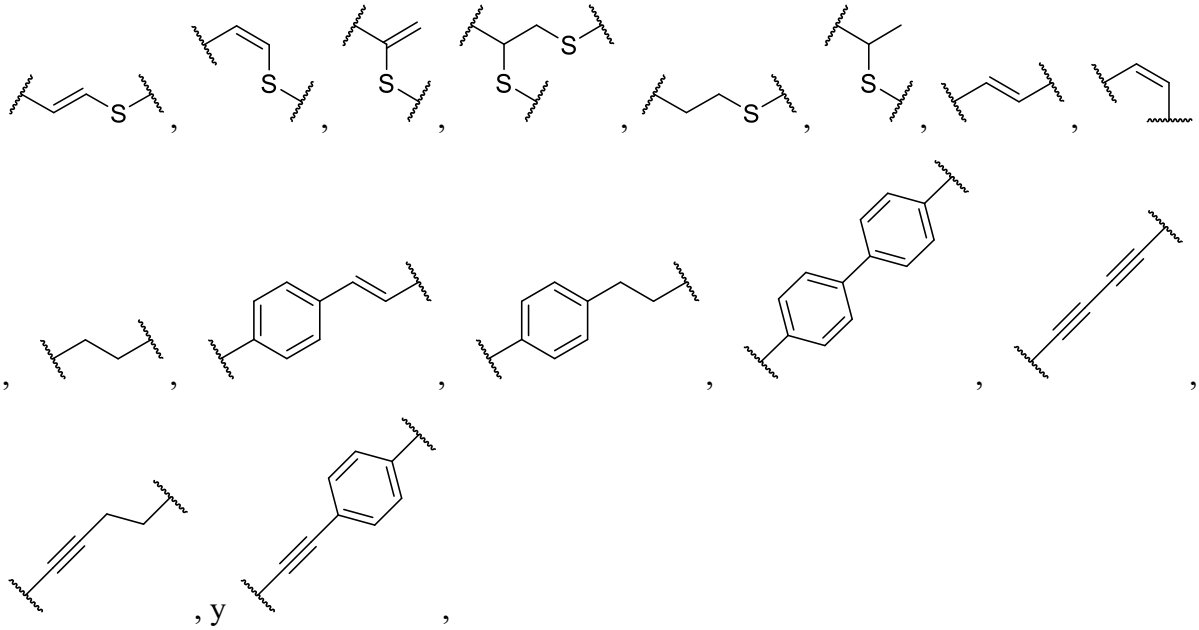
donde Z^4 es



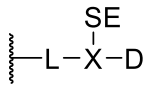
y donde la cadena de PEG comprende entre 2 y 19 PEG, es decir, donde t es de 2 a 18, de 4 a 16, de 6 a 14 y más preferiblemente de 8 a 12,

constituyen una varianza adecuada del grupo potenciador de la solubilidad SE.

Si Z^4 se selecciona del grupo formado por

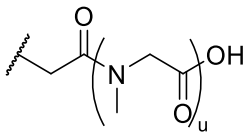


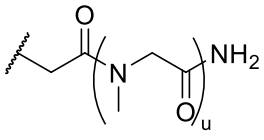
puede unirse o utilizarse en reacciones tiol-ino/eno, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado como, por ejemplo, acoplamiento de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y Glaser.

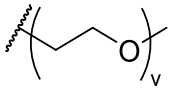
En una modalidad donde la sustancia farmacéutica D dentro de una 

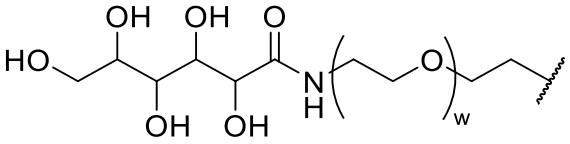
unidad de un enlazador modular el compuesto que es sintetizado en el método del segundo aspecto es una camptotecina, Es particularmente ventajoso unir un grupo potenciador de ciclodextrina de los tipos anteriormente ilustrados al espaciador autoinmolante X a través de una cadena de PEG de 8 a 12 miembros, es decir, donde t= 8 a 12. Dichas longitudes de cadena de PEG favorecen una disposición conformacional del compuesto de enlace que permite la colocación de un complejo de inclusión de la sustancia farmacológica lipófila en el bolsillo de la ciclodextrina, lo que anula sustancialmente las propiedades hidrófobas/lipófilas de la camptotecina.

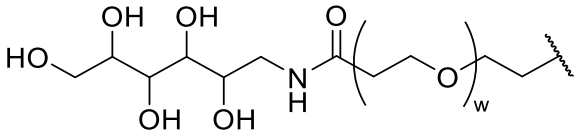
Otros grupos adecuados que mejoran la solubilidad de un compuesto enlazador modular que se sintetiza en el método del segundo aspecto incluyen otros grupos polares tales como

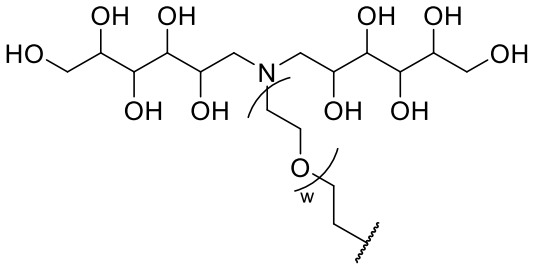
una polisarcosina  , donde u es al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 14,

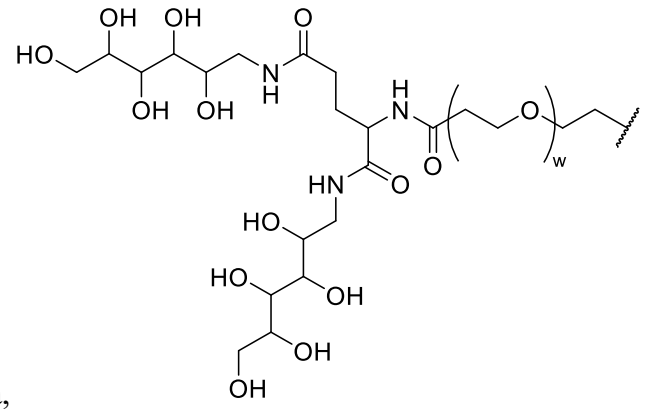
una amida de polisarcosina  , donde u es al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 14,

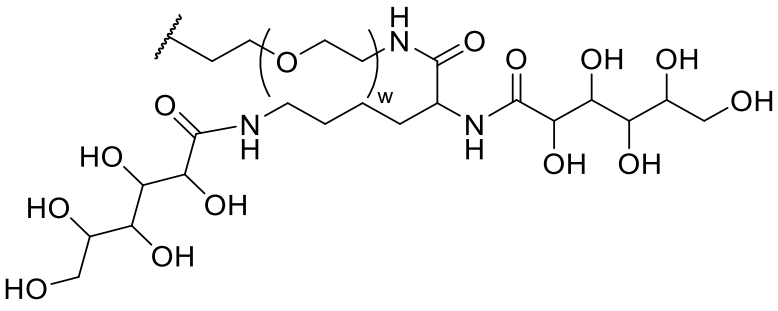
una cadena de PEG  , donde v es de 4 a 24, por ejemplo de 4 a 22, de 4 a 20, de 4 a 18, de 4 a 16, de 4 a 14, de 4 a 12, de 4 a 10 o de 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 o 12,

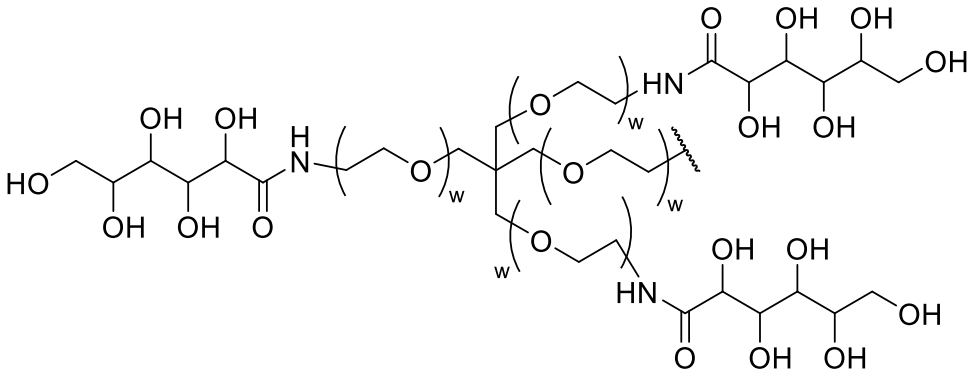
una  ,

una PEG-glucamida  ,

una, 

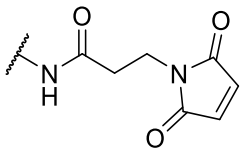
una, 

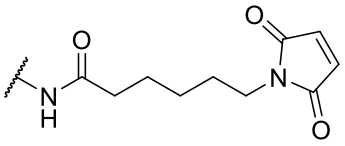
una  ,

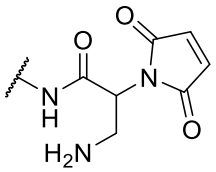
o una  ;

siendo w de 2 a 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10 o de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

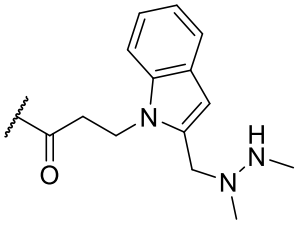
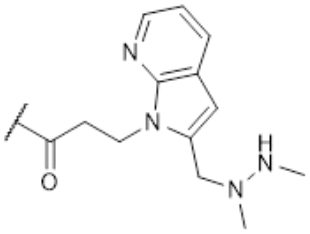
Como se ha descrito anteriormente, el grupo reactivo terminal A de un compuesto enlazador modular de Fórmula (I), es decir, de un compuesto enlazador modular que se sintetiza en el método del segundo aspecto, garantiza la conjugación específica y controlada del compuesto enlazador con la fracción de unión a la diana, de forma que se puede generar un TBDC estable. A este respecto, varios grupos A reactivos han demostrado ser útiles. Por ejemplo, en algunas modalidades, el grupo A reactivo es un grupo reactivo tiol tal como

un grupo 3-maleimidopropanamida  ,

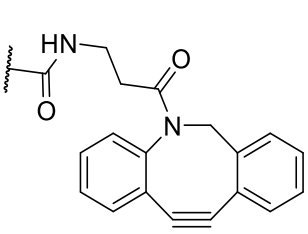
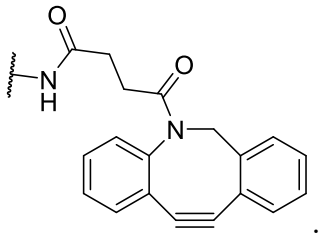
un grupo 6-maleimidohexanamida  o

un grupo 3-amino-2-maleimidopropanamida . 

En otras modalidades, el grupo A reactivo puede ser una 3-(2-((1,2-dimetilhidrazinil)metil)-1H-indol-1-il)propanamida o un derivado de 7-aza para la conjugación con la fracción de formilglicina en una fracción de unión diana mediante la ligadura Hidrazino-Pictet-Spengler (HIPS).

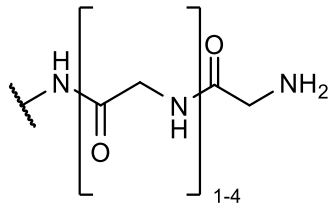
 o . 

En modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser un compuesto de triazina que permite una conjugación basada en triazina del compuesto enlazador con grupos amina (principalmente en residuos de lisina) en la molécula de unión a la diana. En particular, el grupo A reactivo puede ser

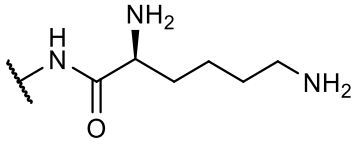
 o  .

En otras modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser un derivado de glicina, que es, por ejemplo, particularmente útil para reacciones de acoplamiento enzimático utilizando Sortasa A. Los derivados de glicina ejemplares pueden ser una poliglicina que comprende

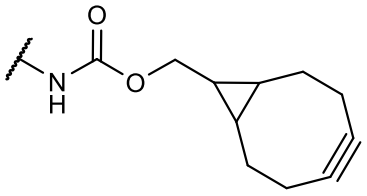
entre 2-5 residuos de glicina:



.

En otras modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser una amina primaria, por ejemplo, el grupo lisina 

o cualquier grupo que comprenda una amina primaria (por ejemplo, PEG amino-modificado). Tales conjugaciones pueden realizarse, por ejemplo, utilizando transglutaminasas como se describe en, por ejemplo, WO2015/162563 A1.

En otras modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser un grupo biciclo[6,1,0]non-4-ino-9-ilcarbonilo, BCN, 

.

El BCN puede reaccionar con moléculas que contengan enlaces alqueno o alquino tensos, como las tetrazinas u otros cicloalquinos, mediante una reacción bioortogonal conocida como reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones (IEDDA). Esta reacción permite la conjugación selectiva y eficiente del compuesto enlazador modular con la molécula de unión a la diana, proporcionando un medio para crear TBDCs con especificidad mejorada y efectos fuera de diana reducidos. El BCN y sus derivados han ganado popularidad en el desarrollo de ADCs debido a su naturaleza bioortogonal y a su capacidad para facilitar la conjugación precisa del fármaco con los anticuerpos.

Por consiguiente, en una modalidad específica del tercer aspecto, si el clogP del compuesto activo farmacéutico es inferior a -1, la presente invención se refiere a un método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia) según el primer aspecto, método que comprende:

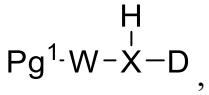
(i) Seleccionar un compuesto que comprende:

– una fracción inmolante,

– una secuencia peptídica W escindible,

– un grupo amino protector Pg^1, que está unido covalentemente a W,

– una sustancia farmacéuticamente activa D como intermediario de Fórmula IIa:



Fórmula IIa

(ii)Eliminar el grupo amino protector Pg^1 de la Fórmula IIa para exponer una amina primaria;

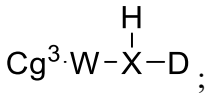
(iii) Poner en contacto dicha amina primaria con un tercer compuesto que comprende

– un espaciador Z^3,

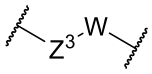
– un grupo amina reactivo, y

– un tercer grupo complementario Cg^3

para formar el intermediario de Fórmula IIIa:



Fórmula IIIa

donde L es 

(iv)Poner en contacto el intermediario de fórmula IIIa con un cuarto compuesto ramificado que comprende

– un cuarto grupo complementario Cg^4 y

– un quinto grupo complementario Cg^5,

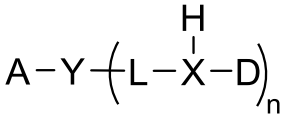
donde Cg^3 reacciona con Cg^4 para formar Z^2;

(v) Poner en contacto el producto de iv) con un quinto compuesto que comprende

– una fracción reactiva A para conjugación con una fracción de unión a diana y

– un sexto grupo complementario Cg^6

donde la reacción de Cg^5 y Cg^6 forma Z^1, para formar el compuesto enlazador modular de Fórmula Ia:



Fórmula (Ia)

En modalidades del método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia) del tercer aspecto (incluyendo en las modalidades posteriormente descritas de este método del tercer aspecto), (incluyendo en las modalidades posteriormente descritas de este método del tercer aspecto),

Cg^3 puede ser un grupo alquino y Cg^4 puede ser un grupo azida;

Cg^3 puede ser un grupo azida y Cg^4 puede ser un grupo alquino;

Cg^3 puede ser un grupo amina primaria o secundaria y Cg^4 puede ser un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster N-hidroxisuccinimida, éster tetrafluorofenílico, éster pentafluorofenílico o éster N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo, amida, carbamato, haluro de carbamoilo o grupo urea; o

Cg^3 puede ser un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster de N-hidroxisuccinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo o éster de N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, halogenuro de acilo, amida, carbamato, halogenuro de carbamoilo o grupo urea y Cg^4 puede ser un grupo amina primaria o secundaria.

En otras modalidades del método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia) del tercer aspecto (incluyendo en las modalidades descritas posteriormente de este método del segundo aspecto),

Cg^5 puede ser un grupo amina primaria o secundaria y Cg^6 puede ser un ácido carboxílico, un éster carboxílico, preferiblemente un éster N-hidroxisuccinimida, un éster tetrafluorofenílico, un éster pentafluorofenílico o un éster N-hidroxiftalimida, un anhídrido carboxílico, un haluro de acilo o un grupo amida; o

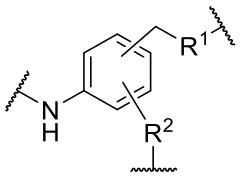
Cg^5 puede ser un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster N-hidroxisuccinimida, éster tetrafluorofenílico, éster pentafluorofenílico o éster N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo o grupo amida y Cg^6 puede ser un grupo amina primaria o secundaria.

En algunas modalidades del método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia) del tercer aspecto (incluyendo en las modalidades descritas posteriormente de este método del tercer aspecto), el grupo amino protector Pg^1 puede ser un carbobenciloxi (Cbz), terc-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetilo (Ac), benzoilo (Bz), bencilo (Bn), p-betoxibencilo (PMB), p-toluenosulfonilo (Ts) o un grupo

carbamato.

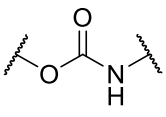
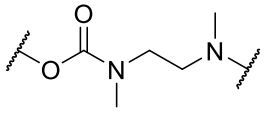
Como se describirá con más detalle en los Ejemplos siguientes, en algunas modalidades, se emplea la conocida reacción de química de clic de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (reacción CuAAC) para conectar de manera altamente eficiente varios bloques de construcción del compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia) durante los pasos del método para sintetizar el compuesto enlazador modular del segundo aspecto.

En este método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia),

X es un espaciador autoinmolante, 

donde:

R^1 une covalentemente X a D en para, meta u orto al grupo amino de X,

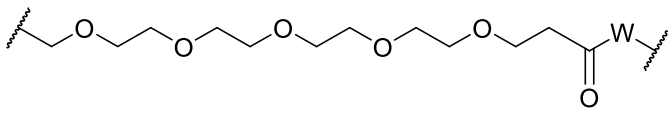
es un enlace o,  ,  o  ; y

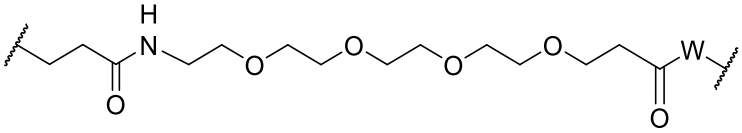
R^2 es H.

W es una secuencia peptídica escindible y no escindible que conecta Z3 y X y se selecciona del grupo formado por:

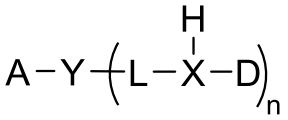
Val-Ala, Val-Cit, Met-Thr, Thr-Thr, Phe-Lys, Glu-Val-Ala, Glu-Val-Cit, Gly-Gly-Phe-Gly, Gly-Gly-Tyr-Gly, cBu-Ala, cBu-Cit, Glu-cBu-Ala, Glu-cBu-Cit, Asp-cBu-Ala, Asp-cBu-Cit, Asp-Pro-Val, Asn-Pro-Val, iGlu-cBu-Ala, iGlu-cBu-Cit, Val-Lys, Val-Arg, Val-Gln, Val-Met, Val-Thr, AcLys-Val-Cit, AcLys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, iGlu-Val-Ala, Asp-Val-Cit, iGlu-Val-Cit, Tyr-Arg, Tyr-Met, Phe-Cit, Phe-Ala, Phe-Arg, Phe-Met, Phe-Gln, Phe-Arg-Arg-Gly, Phe-Arg-Arg-Leu, Phe-Arg-Arg-Leu-Gly, Phe-Leu-Arg-Arg-Gly, Ala-Lys, Leu-Cit, Leu-Gln, Ile-Cit, Ala-Ala-Asn, Ala-Asn, Ala-Ala, Asn-Asn, Asn, beta-Ala, y Lys o sus combinaciones; y en donde Z^3 es un enlace o un espaciador que comprende una cadena de alquilo C_{1-20} o un polietilenglicol de 1 a 10 $(PEG)_{1-10}$ o un C_2-amida-PEG_{1-10};

en donde L es preferiblemente

 o .

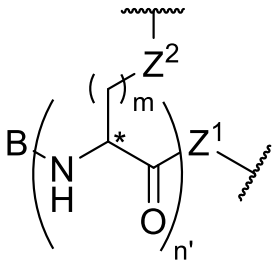
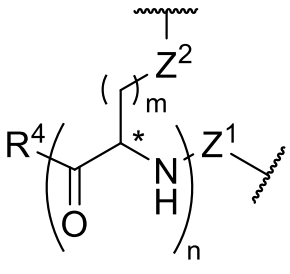


Como se ha descrito anteriormente, la unidad de ramificación Y del compuesto enlazador modular de Fórmula (I)

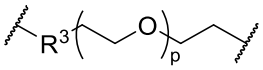
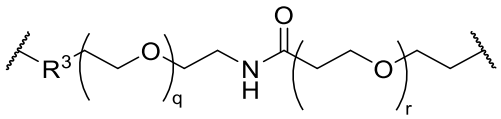


Fórmula (Ia)

que se sintetiza en el método del tercer aspecto es:


o;

;

m es un número entero comprendido entre 1 y 6;

Z^1 conecta Y a A y es  o  , donde

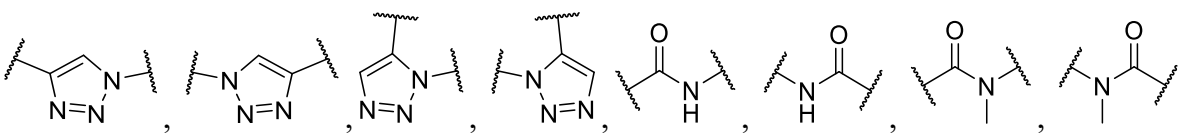
R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH_3)C(=O)-, y

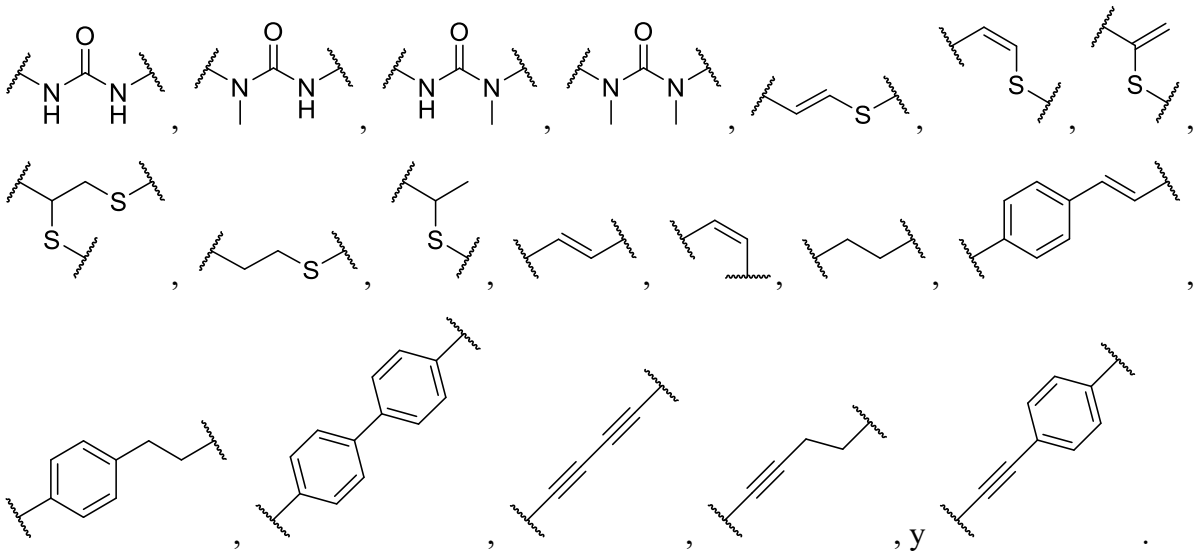
p es un número entero entre 1 y 24, preferiblemente de 4 a 24, más preferiblemente de 8 a 24, como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24;

q es un número entero entre 1 y 8, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

r es un número entero entre 1 y 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, de 4 a 16, de 6 a 14, de 8 a 12, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

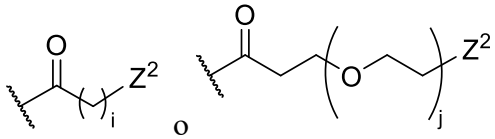
Z^2 conecta Y a L y es un 1,2,3-triazol, una amida o un derivado de urea, seleccionado del grupo que consiste en:





B es:

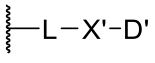
una caperuza, preferiblemente un grupo acilo, y n' es n; o

 , donde

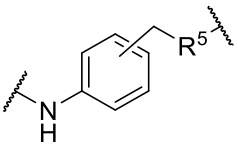
i es un número entero entre 1 y 20,

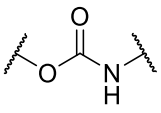
j es un número entero comprendido entre 1 y 10, y

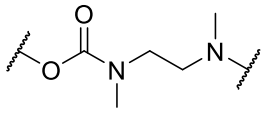
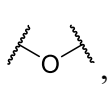
n' es n menos 1; o

 donde

D' es una sustancia farmacéuticamente activa diferente de D; y

X' es el espaciador autoinmolante  , donde:

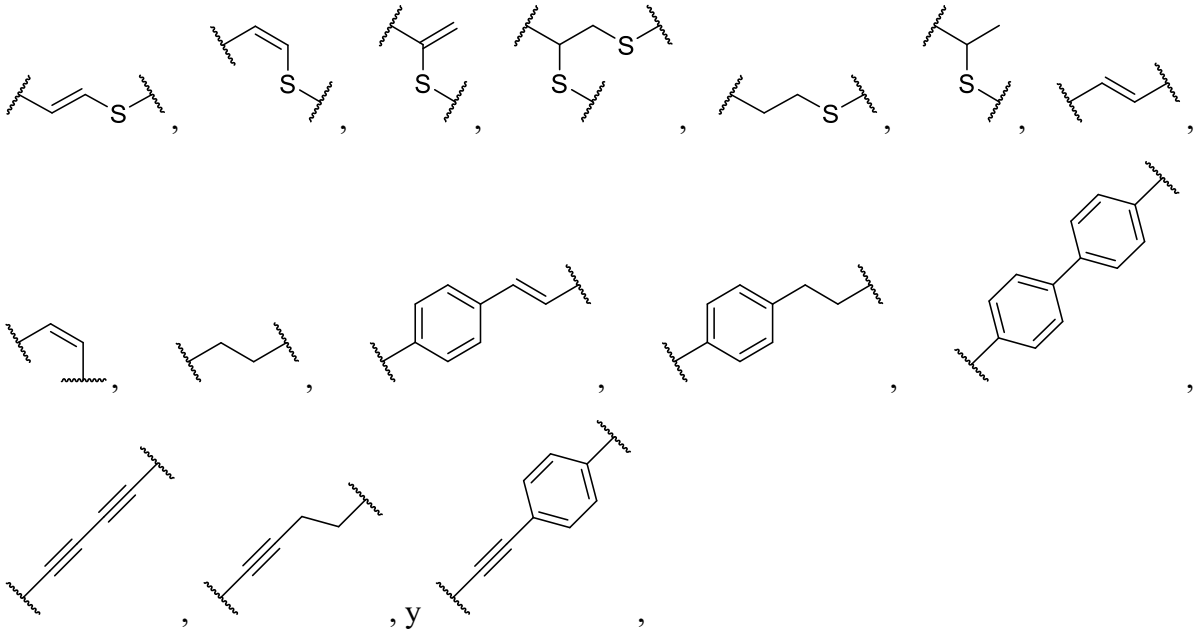
R^5 une covalentemente X' a D' en para u orto al grupo amino de X' y es un enlace, 

,  o  ,

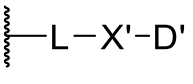
y n' es n;

R^4 es OH o NH_2

Si Z^4 se selecciona del grupo formado por

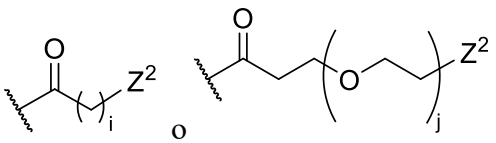


puede unirse o utilizarse en reacciones tiol-ino/eno, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado como, por ejemplo, acoplamiento de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y Glaser.

En modalidades en las que B es  Z^3 en L puede comprender además una fracción carbonílica terminal, como un ácido dicarboxílico, para la unión de L al grupo amino de Y.

Independientemente de si B es

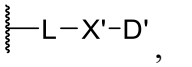
una caperuza, preferiblemente un grupo acilo, donde n' es n; o

 , donde

i es un número entero entre 1 y 20,

j es un número entero comprendido entre 1 y 10, y

n' es n menos 1; o

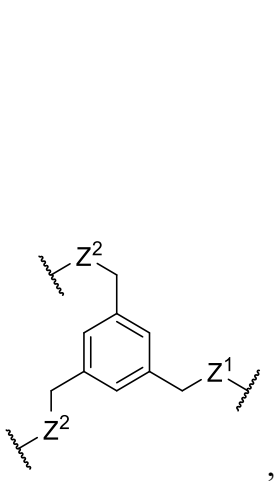
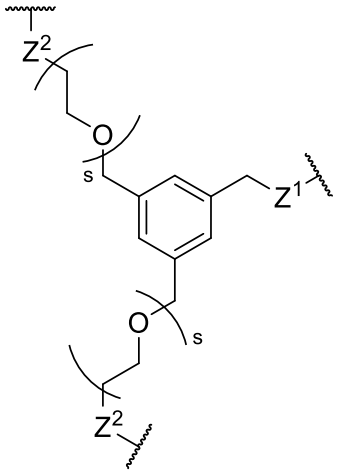
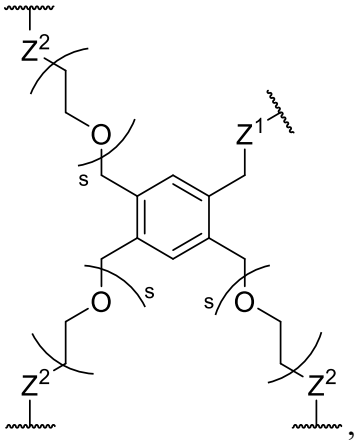
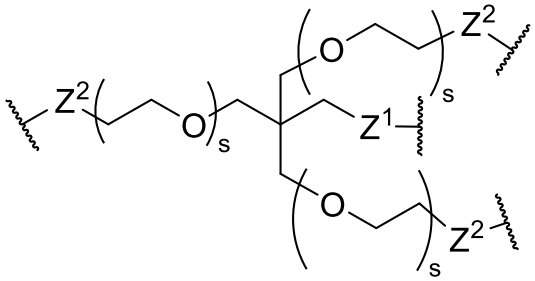
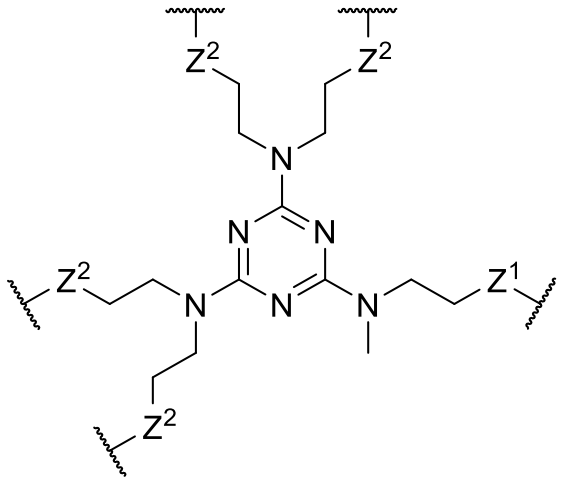
una unidad  ,

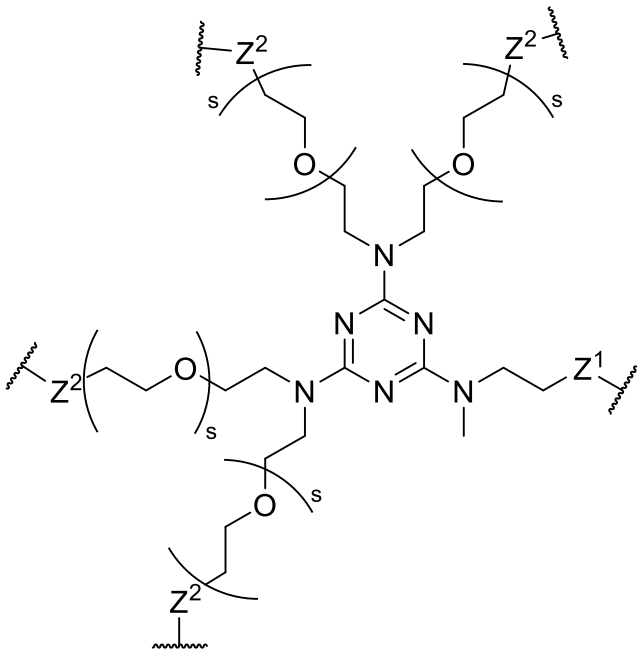
B constituye la terminación de la unidad de ramificación final Y en el núcleo multimérico del compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia) sintetizado en estas modalidades del segundo

aspecto.

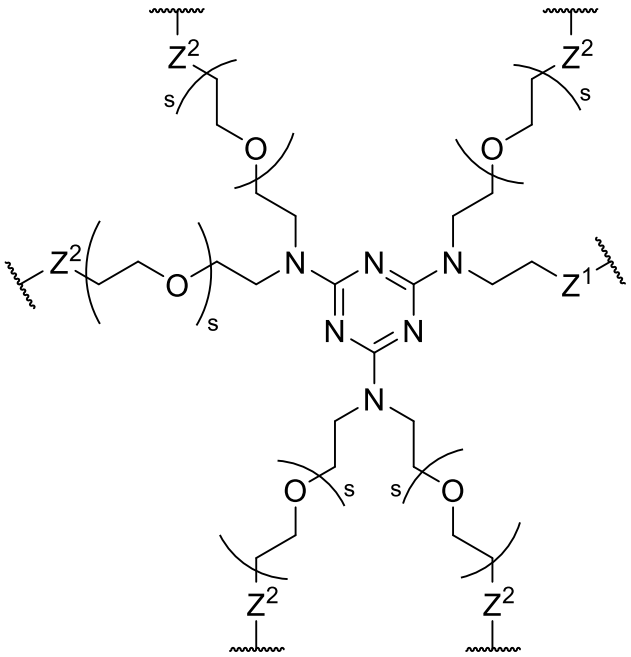
Como se ha descrito anteriormente, el núcleo multimérico en un compuesto de enlazador modular de Fórmula (Ia) sintetizado por el método del tercer aspecto puede comprender n=2 a 5, preferiblemente 2, 3, 4 o 5, unidades de ramificación Y, donde la unidad de ramificación proximal a A está conectada a A a través de Z^1 y la unidad de ramificación final (es decir, la unidad de ramificación distal a A comprende B. Cada unidad de ramificación Y en esta modalidad está indirectamente unida a una molécula de una sustancia farmacéutica D a través del espaciador Z^2, el espaciador L y el espaciador inmolante X.

En modalidades alternativas, la unidad de ramificación Y del compuesto enlazador modular de la Fórmula (Ia) que se sintetiza en este método del tercer aspecto es:

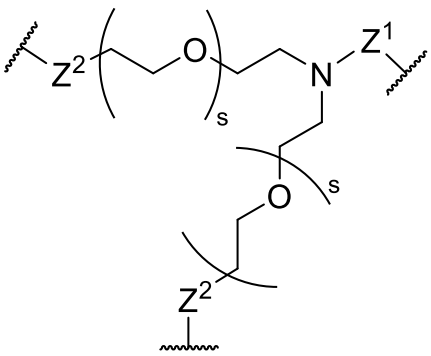

,


,

,

,



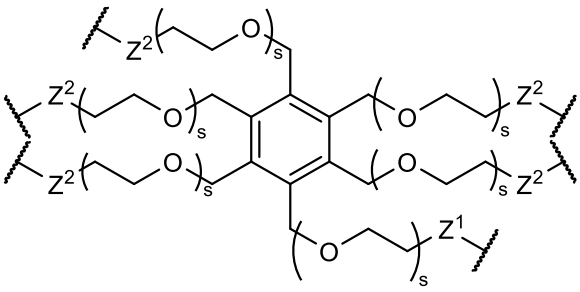
,



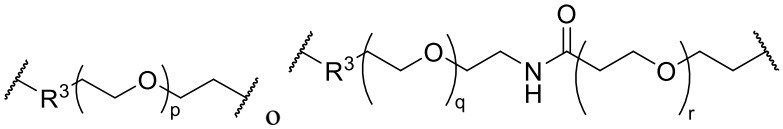
,



o


;

Z^1 conecta Y con A y es


, donde

R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH_3)C(=O)-,

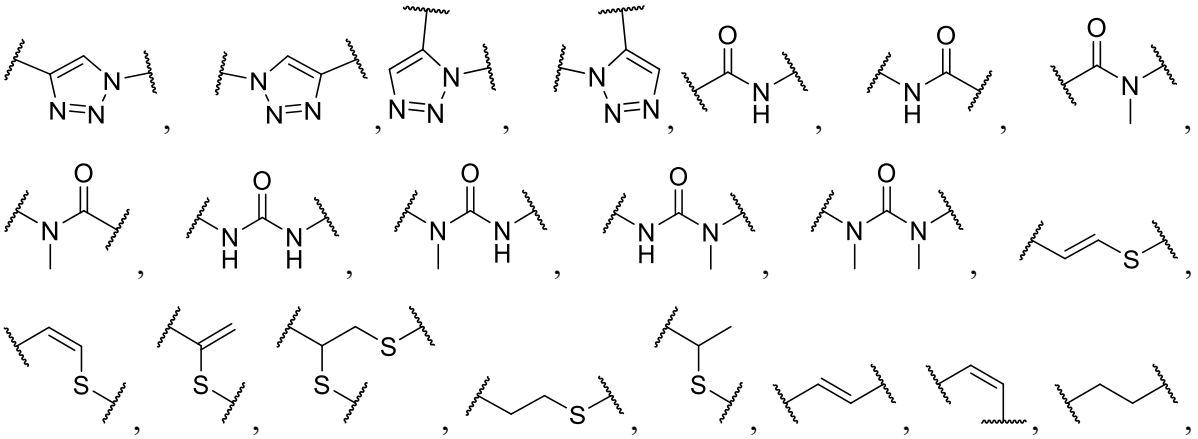
p es un número entero entre 1 y 24, preferiblemente de 4 a 24, más preferiblemente de 8 a 24, como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24;

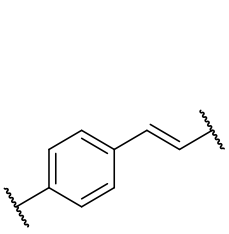
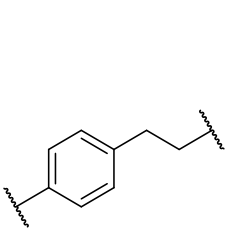
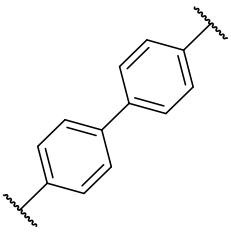
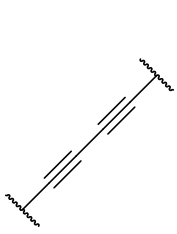
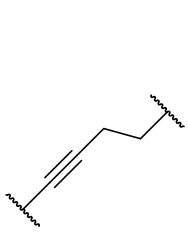
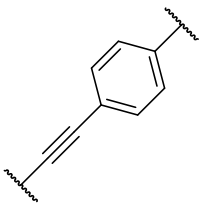
q es un número entero entre 1 y 8, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

r es un número entero entre 1 y 24, por ejemplo de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 16, de 2 a 14, de 2 a 12, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, de 4 a 16, de 6 a 14, de 8 a 12, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;

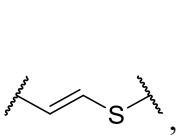
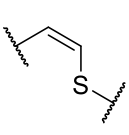
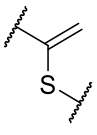
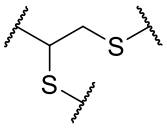
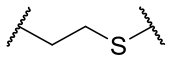
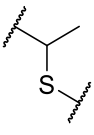
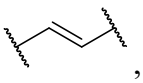
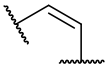
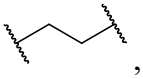
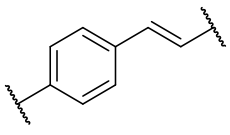
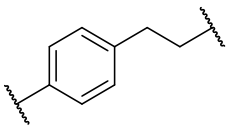
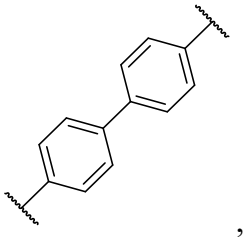
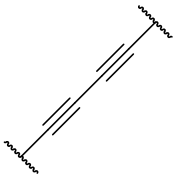
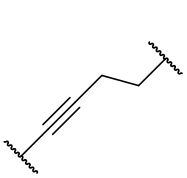
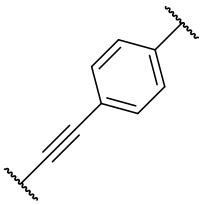
s es un número entero entre 0 y 4, como 0, 1, 2, 3 o 4;

Z^2 conecta Y a L y es un 1,2,3-triazol, una amida o un derivado de urea, seleccionado del grupo que consiste en:



 ,  ,  ,  ,  , y  .

Si Z^4 se selecciona del grupo formado por

 ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , y  ,

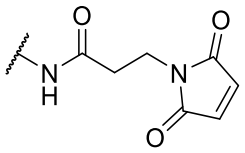
puede unirse o utilizarse en reacciones tiol-ino/eno, metátesis cruzada y reacciones de acoplamiento cruzado como, por ejemplo, acoplamiento de Heck-, Kumada-, Negishi-, Hiyama-, Stille-, Suzuki-, Sonogashira- y Glaser.

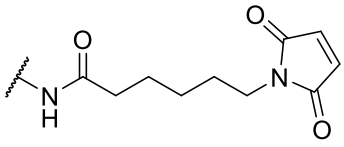
Dependiendo de cuál de las unidades de ramificación alternativas Y mostradas anteriormente se emplee, el DOL del compuesto enlazador modular de Fórmula (I) puede ser 2, 3, 4 o 5.

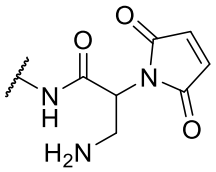
Como se ha descrito anteriormente, el grupo reactivo terminal A de un compuesto enlazador modular de Fórmula (Ia), es decir, de un compuesto enlazador modular que se sintetiza en el método del tercer aspecto, garantiza la conjugación específica y controlada del compuesto enlazador con la fracción de unión a la diana, de manera que se puede generar un TBDC

estable.

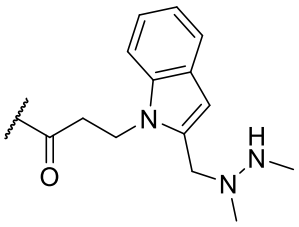
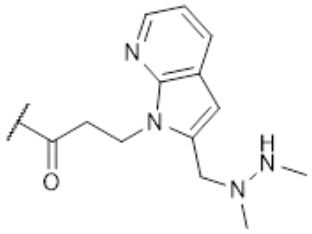
A este respecto, varios grupos A reactivos han demostrado ser útiles. Por ejemplo, en algunas modalidades, el grupo A reactivo es un grupo reactivo tiol tal como

un grupo 3-maleimidopropanamida  ,

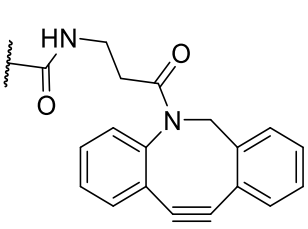
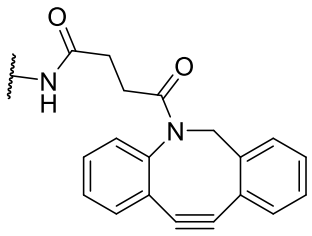
un grupo 6-maleimidohexanamida  o

un grupo 3-amino-2-maleimidopropanamida  .

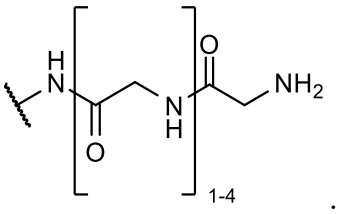
En otras modalidades, el grupo A reactivo puede ser una 3-(2-((1,2-dimetilhidrazinil)metil)-1H-indol-1-il)propanamida o un derivado de 7-aza para la conjugación con la fracción de formilglicina en una fracción de unión diana mediante la ligadura Hidrazino-Pictet-Spengler (HIPS).

 o  .

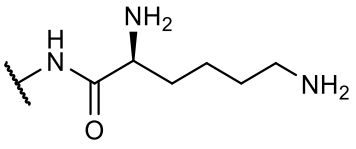
En modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser un compuesto de triazina que permite una conjugación basada en triazina del compuesto enlazador con grupos amina (principalmente en residuos de lisina) en la molécula de unión a la diana. En particular, el grupo A reactivo puede ser

 o  .

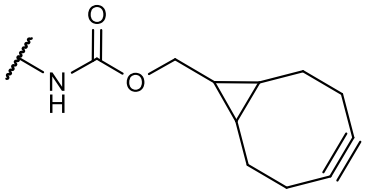
En otras modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser un derivado de glicina, que es, por ejemplo, particularmente útil para reacciones de acoplamiento enzimático utilizando Sortasa A. Los derivados de glicina ejemplares pueden ser una poliglicina que comprende entre 2-5 residuos de glicina:



.

En otras modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser una amina primaria, por ejemplo, el grupo lisina 

o cualquier grupo que comprenda una amina primaria (por ejemplo, PEG amino-modificado). Tales conjugaciones pueden realizarse, por ejemplo, utilizando transglutaminasas como se describe en, por ejemplo, WO2015/162563 A1.

En otras modalidades alternativas, el grupo A reactivo puede ser un grupo biciclo[6,1,0]non-4-in-9-ilcarbonilo, BCN, 

.

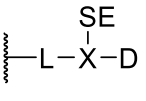
El BCN puede reaccionar con moléculas que contengan enlaces alqueno o alquino tensos, como las tetrazinas u otros cicloalquinos, mediante una reacción bioortogonal conocida como reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones (IEDDA). Esta reacción permite la conjugación selectiva y eficiente del compuesto enlazador modular con la molécula de unión a la diana, proporcionando un medio para crear TBDC con especificidad mejorada y efectos reducidos fuera de diana. El BCN y sus derivados han ganado popularidad en el desarrollo de ADC debido a su naturaleza bioortogonal y a su capacidad para facilitar la conjugación precisa del fármaco con los anticuerpos.

Las formas de modalidad específicamente preferidas de los compuestos de enlazador modular de la invención obtenibles por el método del tercer aspecto son los compuestos IV.1 a IV.22 mostrados anteriormente, así como los productos finales directos de las formas de modalidad

preferidas del método del tercer aspecto en los Ejemplos más adelante.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de fármaco de unión a diana (TBDC) que comprende al menos un producto de reacción del compuesto enlazador modular según el primer aspecto y un grupo reactivo correspondiente de una fracción de unión a diana, donde el al menos un producto de reacción es el producto de una reacción entre A del compuesto enlazador modular y el grupo reactivo correspondiente de la fracción de unión a diana, que une covalentemente el compuesto enlazador modular a la fracción de unión a diana, preferiblemente el grupo reactivo correspondiente de la fracción de unión a diana es un grupo tiol.

Preferiblemente, el TBDC del cuarto aspecto comprende más de uno de dichos productos de reacción, de tal manera que más de un compuesto enlazador modular, preferiblemente entre 2 y 10, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, se acopla a dicha fracción de unión a diana.

Como se ha descrito anteriormente, cada uno de los compuestos de enlazador modular del cuarto aspecto comprende al menos dos unidades 

y, de este modo, cada compuesto de enlazador modular tiene al menos un DOL de dos (2). En las modalidades del cuarto aspecto, cuando el TBDC comprende más de uno de los productos de reacción anteriores, el DOL del compuesto enlazador modular se multiplica por el número de productos de reacción. Por ejemplo, si un TBDC comprende cuatro (4) de dichos productos de reacción del grupo A reactivo del compuesto enlazador modular según el cuarto aspecto con una DOL de dos (2) y cuatro (4) grupos reactivos correspondientes de la fracción de unión a la diana, el TBDC comprenderá cuatro (4) de dichos compuestos enlazadores modulares y tendrá, por tanto, una DAR de 8.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un compuesto enlazador modular, preferiblemente, del primer aspecto, cuando se sintetiza por el método del segundo aspecto.

En otro aspecto más, la presente invención también se refiere al uso de un compuesto enlazador modular según el primer aspecto en la fabricación de un conjugado de fármaco de unión a diana según el cuarto aspecto.

Como se apreciará en general, dependiendo del mecanismo de acción y la potencia de la sustancia farmacológicamente activa D del compuesto enlazador modular incluido en el

TBDC y el resultado terapéutico específico buscado, el compuesto enlazador modular de la presente divulgación permite la preparación de TBDC con puntuaciones DAR variables de una manera relativamente sencilla, es decir, combinatoria. Esto también se muestra específicamente en los Ejemplos más adelante.

La fracción de unión a la diana es una fracción que reconoce y se une específicamente a una secuencia diana o epítopo de un antígeno. Como se ha definido anteriormente, la fracción de unión a la diana se basa en el concepto de inmunoglobulina (Ig; es decir, anticuerpo) de reconocimiento de diana/epítopo conocido de las moléculas del formato Ig convencional (es decir, IgG, IgD, IgE, IgA y/o IgM) para el reconocimiento específico y la unión de la secuencia diana o epítopo diana de un antígeno.

En consecuencia, la fracción de unión a la diana puede ser:

– un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal;

– un fragmento funcional de anticuerpo o un derivado de anticuerpo, tal como un fragmento variable de cadena única (scFv), un fragmento de unión a antígeno como un fragmento Fab, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab')2 o un constructo de anticuerpo bi- o tri-específico;

– un diacuerpo;

– un anticuerpo de camélido;

– un anticuerpo de dominio;

– un nanocuerpo;

– un homodímero bivalente con dos cadenas que consisten en scFvs;

– un anticuerpo de tiburón;

– un anticuerpo compuesto por secuencias marco de primates del nuevo mundo más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de primates que no son del nuevo mundo; o

– un constructo dimerizado que comprende un dominio de cadena pesada constante 3 (CH_3), una cadena ligera variable (V_L) y una cadena pesada variable (V_H)

– un TCR.

Preferiblemente, la fracción de unión a diana del TBDC del cuarto aspecto reconoce y se une específicamente a una secuencia o epítopo diana de un antígeno específico de cáncer o asociado a cáncer de Guanilato Ciclasa C (GUCY2C), Clúster de Diferenciación 33 (CD33), Clúster de Diferenciación 30 (CD30), Clúster de Diferenciación (CD5), Clúster de

Diferenciación 20 (CD20), Clúster de Diferenciación 45 (CD45), Clúster de Diferenciación 117 (CD117 / c-Kit), Clúster de Diferenciación 123 (CD123 / IL3RA), Clúster de Diferenciación 137 (CD137 / 4-1BB), Clúster de Diferenciación 269 (CD269 / antígeno de maduración de células B, BCMA), claudina 18,2, CEA (antígeno carcinoembrionario), molécula de adhesión celular epitelial (EpCam), DKK1 (proteína 1 relacionada con Dickkopf), glypican-3, muscina-1 (MUC-1 / CD227), mucina 5AC (MUC5AC), anhidrasa carbónica 9 (CAIX), receptor 1 de quimiocinas con fracción C-X-C (CXCR1, CD181), Receptor de quimiocina con motivo C-X-C 2 (CXCR2/CD182), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), Clúster de Diferenciación 22 (CD22), Clúster de Diferenciación 79b (CD79b), molécula de adhesión celular nectina 4 (nectina 4), transductor de señal de calcio asociado a tumores 2 (Trop-2), Clúster de Diferenciación 19 (CD19), Ligando 3 similar a Delta (DLL3), glucoproteína transmembrana NMB (gpNMB), Antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met, CD 151), Miembro 6 de la familia 39 de transportadores de solutos (LIV-1), Receptor de folato 1 (FOLR1), Clúster de Diferenciación 56 (CD56), Clúster de Diferenciación 138 (CD138), Mesotelina, Anhidrasa carbónica 6 (CA6), Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Clúster de Diferenciación 37 (CD37), Miembro 3 de la familia de la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP3).

Normalmente, la fracción de unión a la diana del TBDC es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal (mAb). Como está bien establecido con respecto a las terapias contra el cáncer mediadas por anticuerpos, la alta especificidad de un mAb para una única secuencia diana o epítopo de un antígeno específico del cáncer o asociado al cáncer reduce en gran medida los efectos no diana. Además, pueden establecerse fácilmente las propiedades farmacocinéticas de los mAbs, como la semivida y los índices de distribución y eliminación, de modo que pueda generarse el TBDC adecuado (en este caso, un ADC) para garantizar la administración óptima del fármaco activo a las células cancerosas diana. Además, muchos mAbs dirigidos a secuencias diana o epítopos de antígenos específicos del cáncer o asociados al cáncer, están disponibles comercialmente y han sido sometidos a una amplia validación clínica.

En modalidades preferidas, la fracción de unión a la diana según la invención es un anticuerpo monoclonal, seleccionado entre un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano,

más preferiblemente la fracción de unión a la diana es un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano IgG1 o IgG4.

Por consiguiente, en modalidades preferidas de este cuarto aspecto de la presente invención, la fracción de unión a diana del TBDC es una cualquiera de Adecatumumab (anti-EpCam), Amatuximab, (anti-mesotelina), Amivantamab (anti-EGFR), Besilesomab (anti-CEA), blinatumomab (anti-CD19), brentuximab (anti-CD30), Cantuzumab, Cibisatamab (anti-CEACAM5), Cirmtuzumab (anti-ROR1), cetuximab (anti-EGFR), Clivatuzumab (anti-MUC1), Gatipotuzumab (anti-MUC1), Coltuximab (anti-CD19), Daratumumab (anti-CD38), Duligotuzumab (anti-ERBB3), Edrecolomab (anti-EpCam), Enfortumab (anti-Nectina-4), Enoblituzumab (anti-CD276), Ensituximab (anti-MUC5AC), Epratuzumab (anti-CD22), Farletuzumab (anti-FOLR1), Igovomab (anti-CA-125), Inebilizumab (anti-CD19), Iratumumab (anti-CD30), Labetuzumab (anti-CEA), Margetuximab (anti-HER2/neu), Matuzumab (anti-EGFR), Modotuximab (anti-EGFR dominio extracelular III), Naptumomab (anti-5T4), Naratuximab (anti-CD37), Necitumumab (anti-EGFR), Nimotuzumab (anti-EGFR), Obinutuzumab (anti-CD20), Ocaratuzumab (anti-CD20), Ocrelizumab (anti-CD20), Ofatumumab (anti-CD20), Otlertuzumab (anti-CD37), Ontuxizumab (anti-TEM1), Pertuzumab (anti-HER2/neu), Polatuzumab (anti-CD79b), Rituximab (anti-CD20), Rovalpituzumab (anti-DLL3), Sacituzumab (anti-TROP-2), Seribantumab (anti-ERBB3/HER3), Tafasitamab (anti-CD19), Tetulomab (anti-CD37), Timigutuzumab (anti-HER2), Trastuzumab (anti-HER2), Ublituximab (anti-CD20) o Zolbetuximab (anti-Claudina 18,2).

Además, en modalidades específicas del TBDC del cuarto aspecto, los mAbs disponibles comercialmente pueden haber sido modificados por ingeniería genética, por ejemplo como se describe en, por ejemplo, Junutula Nat Biotechnol. 2008 Aug;26(8):925-32. Las modificaciones particulares incluyen la incorporación de un residuo de cisteína en cada una de las cadenas pesadas del mAb, introduciendo de este modo restos sulfhidrilos adicionales en la fracción de unión a diana para la conjugación de los compuestos enlazadores modulares del primer aspecto cuando el grupo A reactivo del compuesto enlazador es un grupo reactivo tiol. Dicha incorporación puede lograrse fácilmente mediante sustituciones de aminoácidos A118C, S239C y/o D265C (según el sistema de numeración de la UE) en cada una de las cadenas pesadas de un mAb.

Preferiblemente, el mAb de esta modalidad específica del TBDC del cuarto aspecto comprende la sustitución D265C en cada una de sus cadenas pesadas y se conjuga con al menos un compuesto enlazador modular del primer aspecto a través de los residuos de cisteína modificados de dicha fracción de unión a diana. Más preferiblemente, un compuesto enlazador modular del primer aspecto se conjuga con cada uno de los dos residuos de cisteína modificados en la posición 265 en cada una de las cadenas pesadas del mAb. Como se ha descrito anteriormente, si el enlazador modular conjugado del primer aspecto tiene una DOL de dos (2), el TBDC tiene una DAR de cuatro (4). Con la variabilidad de los compuestos de enlazador modular de la presente invención, los ADC que comprenden mAbs con dos residuos de cisteína de ingeniería en la posición respectiva 265 en cada una de las cadenas pesadas para tener un DAR entre cuatro (4) y dieciséis (16). En algunos casos, puede ser preferible que el TBDC del cuarto aspecto, opcionalmente, comprenda también las mutaciones L234A, L235A (numeración según la numeración UE) para reducir la interacción con el receptor Fcγ y, por tanto, la captación del TBDC en una célula inmunitaria (por ejemplo, macrófagos) (véase, por ejemplo, Liu *et al.* Antibodies (2020), 9, 64.). Por consiguiente, en algunas modalidades, el TBDC de la invención comprende un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo IgG1 o IgG4 humano o humanizado) que comprende en cada una de sus regiones Fc de cadena pesada las mutaciones L234A, L235A y D265C.

Por supuesto, en un quinto aspecto, el TBDC del cuarto aspecto está diseñado específicamente para su uso como medicamento, preferiblemente para su uso en el tratamiento del cáncer. En consecuencia, este cuarto aspecto de la presente invención también abarca métodos de tratamiento del cáncer, en los que el método comprende administrar el conjugado de fármaco de unión a diana del tercer aspecto a un sujeto que lo necesite y/o utilizar el conjugado de fármaco de unión a diana del tercer aspecto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En algunas modalidades, el cáncer se caracteriza típicamente por la expresión de al menos uno de los antígenos específicos del cáncer o asociados al cáncer descritos anteriormente. En consecuencia, un TBDC que comprende una fracción de unión a la diana dirigida específicamente a reconocer y unir la secuencia diana o epítopo respectivo de dicho antígeno puede utilizarse para dirigirse específicamente a las células de dicho cáncer y, en última instancia, puede utilizarse en el tratamiento del cáncer respectivo.

Preferiblemente, la secuencia diana o epítopo está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales o células asociadas al tumor en una concentración mayor y/o en una configuración estérica diferente en comparación con la superficie de células no tumorales. Preferiblemente, el antígeno o epítopo está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales o del estroma tumoral, pero no en la superficie de células no tumorales.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el TBDC según el tercer o cuarto aspecto.

En modalidades particulares, la composición farmacéutica se utiliza en forma de medicamento de administración sistémica. Esto incluye parenterales, que comprenden entre otros inyectables e infusiones. Los inyectables se formulan en forma de ampollas o como inyectables listos para su uso, por ejemplo, jeringas listas para su uso o jeringas de un solo uso y, aparte de esto, en frascos punzables para extracción múltiple. La administración de inyectables puede realizarse en forma de aplicación subcutánea (s.c), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intracutánea (i.e.). En particular, es posible producir las formulaciones inyectables respectivamente adecuadas como una suspensión de cristales, una solución, un sistema nanoparticular o un coloide disperso como, por ejemplo, hidrosoles.

Las formulaciones inyectables pueden producirse además como concentrados, que pueden disolverse o dispersarse con diluyentes acuosos isotónicos. La infusión también puede prepararse en forma de soluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones liposomales y microemulsiones. De forma similar a los inyectables, las formulaciones para infusión también pueden prepararse en forma de concentrados para dilución. Las formulaciones inyectables también pueden aplicarse en forma de infusiones permanentes tanto en terapia hospitalaria como ambulatoria, por ejemplo, mediante minibombas.

Es posible añadir a las formulaciones de fármacos parenterales, por ejemplo, albúmina, plasma, expansores, sustancias tensioactivas, diluyentes orgánicos, sustancias que influyen en el pH, sustancias complejantes o sustancias poliméricas, en particular como sustancias para influir en la adsorción de los TBDC de la invención a proteínas o polímeros o también pueden añadirse con el fin de reducir la adsorción de los TBDC de la invención a materiales como instrumentos de inyección o materiales de envasado, por ejemplo, plástico o vidrio.

Los adyuvantes y portadores añadidos durante la producción de las composiciones

farmacéuticas de la presente invención formuladas como parenterales son preferiblemente aqua sterilisata (agua esterilizada), sustancias que influyen en el valor pH como, por ejemplo ácidos o bases orgánicos o inorgánicos, así como sus sales, sustancias amortiguadoras para ajustar los valores de pH, sustancias para la isotonización como, por ejemplo, cloruro sódico, hidrogenocarbonato sódico, glucosa y fructosa, tensioactivos y agentes tensioactivos, respectivamente, y emulgentes como, por ejemplo, ésteres parciales de ácidos grasos de sorbitanos polioxietilenados (por ejemplo, Tween®) o, por ejemplo ésteres de ácidos grasos de polioxietilenos (por ejemplo, Cremophor®), aceites grasos como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite de ricino, ésteres sintéticos de ácidos grasos como, por ejemplo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y aceite neutro (por ejemplo, Miglyol®), así como adyuvantes poliméricos como, por ejemplo, gelatina, dextrano, polivinilpirrolidona, aditivos que aumentan la solubilidad de disolventes orgánicos como, por ejemplo, propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o sustancias formadoras de complejos como, por ejemplo, citrato y urea, conservantes como, por ejemplo, éster hidroxipropílico y éster metílico del ácido benzoico, alcohol bencílico, antioxidantes como, por ejemplo, sulfito sódico y estabilizadores como, por ejemplo, EDTA.

Cuando se formulan las composiciones farmacéuticas de la presente invención como suspensiones en una modalidad preferida se añaden agentes espesantes para evitar el fraguado de los TBDC de la invención o, tensioactivos y polielectrolitos para asegurar la resuspendibilidad de los sedimentos y/o agentes formadores de complejos como, por ejemplo, EDTA. También es posible conseguir complejos del principio activo con diversos polímeros. Ejemplos de tales polímeros son el polietilenglicol, el poliestireno, la carboximetilcelulosa, Pluronics® o el éster de ácido graso sorbit de polietilenglicol. Los TBDC de la invención también pueden incorporarse en formulaciones líquidas en forma de compuestos de inclusión, por ejemplo con ciclodextrinas. En determinadas modalidades, pueden añadirse agentes dispersantes como adyuvantes adicionales. Para la producción de liofilizados pueden utilizarse agentes de andamiaje como manita, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, PVP o variedades de gelatina.

EJEMPLOS

La invención se describe además mediante los siguientes Ejemplos no limitativos.

Información general

Aunque la invención se ha ilustrado y descrito detalladamente en los dibujos y en la descripción precedente, tales ilustraciones y descripciones deben considerarse ilustrativas o ejemplares y no restrictivas; la invención no se limita a las modalidades divulgadas.

Todas las secuencias de aminoácidos aquí descritas se muestran de N-terminal a C-terminal; todas las secuencias de ácidos nucleicos aquí descritas se muestran 5'->3'.

Los productos químicos y los disolventes se obtuvieron de proveedores comerciales como ABCR, Fisher Scientific, Merck Chemicals, Carl Roth, Sigma-Aldrich, VWR International, Biozol Diagnostika, TCI Deutschland, IRIS Biotech, AnalytiChem, Hycultec, Hölzel Diagnostika, Bachem, Thermo Fisher, Activate Scientific, AxisPharm, Biosynth o BLD Pharmatech y se utilizaron sin purificación adicional. El agua utilizada para las reacciones, preparaciones y purificaciones se purificó mediante un sistema de agua pura ELGA Purelab flex 2. La TLC se realizó con láminas de poliéster recubiertas de gel de sílice 60 (Macherey-Nagel) y las manchas se visualizaron mediante irradiación (λ= 254 nm) o soluciones de tinción de ninhidrina, molibdato o $KMNO_4$.

Métodos experimentales generales

HPLC analítica

La RP-HPLC analítica se llevó a cabo en un sistema VWR-Hitachi Chromaster equipado con un detector de matriz de diodos 5430, un automuestreador 5260, una bomba cuaternaria 5160, un horno de columna 6310 y una columna Luna® C18 (2) 5 µm 100 Å 250 x 4,6 mm, Kinetex® EVO-C18 5 µm 100 Å 250 x 4,6 mm y ACE C18-PFP 5 µm 100 Å 250 x 4,6 mm a 25 °C con un caudal entre 1 - 1,4 mL/min utilizando elución en gradiente lineal de acetonitrilo en agua. A continuación se indican los parámetros especificados.

UHPLC analítica

La RP-UHPLC analítica se llevó a cabo en un sistema VWR-Hitachi Chromaster Ultra Rs equipado con un detector de matriz de diodos 6430, un automuestreador 6270, una bomba binaria 6170, un horno de columna 6310 y una columna Kinetex® EVO-C18 1,7 µm 100 Å 100 x 2,1 mm con un caudal de 0,65 mL/min utilizando elución en gradiente lineal de acetonitrilo en agua. A continuación se indican los parámetros especificados.

Método A

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm

Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	15,0	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método B

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	0,5	70	30
	15,5	50	50
	16,0	0	100
	19,0	0	100
	19,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método C

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	15,0	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	246, 210 nm		
Caudal	1,4 mL/min		

Temperatura de la columna	25 °C
Tiempo de ejecución	22 minutos

Método D

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	15,0	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método E

Columna	Avantor ACE C18-PFP, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	2,0	70	30
	26,0	40	60
	26,5	0	100
	28,0	0	100
	28,5	95	5

	30,0	95	5
Longitudes de onda	210, 380 nm		
Caudal	1 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	30 min		

Método F

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	2,0	70	30
	26,0	40	60
	26,5	0	100
	28,0	0	100
	28,5	95	5
	30,0	95	5
Longitudes de onda	210, 380 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	30 min		

Método G

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: Agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	14,8	50	50
	15,0	0	100

	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	190, 210 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método H

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	14,8	50	50
	15,0	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,00	95	5
Longitudes de onda	210, 246 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método I

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]

	0,0	95	5
	15,0	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 305 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método J

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	26,0	15	85
	26,5	0	100
	28,0	0	100
	28,5	95	5
	30	95	5
Longitudes de onda	210, 380 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	30 min		

Método K

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua

	B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	14,8	70	30
	15,0	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 230 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método L

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	25,0	40	60
	25,2	0	100
	27,8	0	100
	28,0	95	5
	30,0	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	30 min		

Método M

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	15,0	80	20
	15,2	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	205, 220 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método N

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	0,5	80	20
	15,5	60	40
	16,0	0	100
	19,0	0	100
	19,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	1,4 mL/min		

Temperatura de la columna	25 °C
Tiempo de ejecución	22 minutos

Método O

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	0,5	80	20
	15,5	60	40
	16,0	0	100
	19,0	0	100
	19,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método P

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm o 10 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	30	70
	15,0	0	100
	18,0	0	100
	18,5	30	70
	22,0	30	70

Longitudes de onda	210, 220 nm
Caudal	1,4 mL/min
Temperatura de la columna	25 °C
Tiempo de ejecución	22 minutos

Método Q

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm		
Fase móvil	A: 20mM de formiato de amonio (pH= 4) en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	3,2	0	100
	3,95	0	100
	4,15	95	5
	5	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	0,65 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	5 minutos		

Método R

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm		
Fase móvil	A: 20mM de formiato de amonio (pH= 4) en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	6,0	0	100
	6,95	0	100
	7,15	95	5

	8	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	0,65 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	8 minutos		

Método S

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm		
Fase móvil	A: 20mM de formiato de amonio (pH= 4) en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	6,0	15	85
	6,2	0	100
	6,95	95	100
	7,15	95	5
	8,0	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	0,65 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	8 minutos		

Método T

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm		
Fase móvil	A: 20mM de formiato de amonio (pH= 4) en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	0,09	80	20

	4,6	60	40
	5	0	100
	6	0	100
	6,5	95	5
	8	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	0,65 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	8 minutos		

Método U

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm		
Fase móvil	A: 0,05% TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	0,2	70	30
	6,0	40	60
	6,2	0	100
	6,95	0	100
	7,15	95	5
	8	95	5
Longitudes de onda	210, 260 nm		
Caudal	0,65 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	8 minutos		

Método V

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm

Fase móvil	A: 0,05% TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	1,7	0	100
	2,15	0	100
	2,35	95	5
	3,0	95	5
Longitudes de onda	210, 380 nm		
Caudal	0,65 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	3 minutos		

Método W

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	3,2	15	85
	3,4	0	100
	3,95	95	100
	4,15	95	5
	5,0	95	5
Longitudes de onda	210, 380 nm		
Caudal	0,65 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	5 minutos		

Método X

Columna	Interchim Uptisphere Strategy, 100 Å, 150 x 4,6 mm, 3 µm

Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	9,1	0	100
	12,6	0	100
	13,0	95	5
	15,4	95	5
Longitudes de onda	210, 264 nm		
Caudal	1 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	15,4 min		

Método Y

Columna	Interchim Uptisphere Strategy, 100 Å, 150 x 4,6 mm, 3 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	10,5	60	40
	10,6	0	100
	12,6	0	100
	13,0	95	5
	15,4	95	5
Longitudes de onda	210, 264 nm		
Caudal	1 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	15,4 min		

Método Z

Columna	Interchim Uptisphere Strategy, 100 Å, 150 x 4,6 mm, 3 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	4,0	75	25
	9,5	43	57
	10,0	0	100
	13,0	0	100
	13,4	95	5
	15,0	95	5
Longitudes de onda	210, 264 nm		
Caudal	1 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	15 minutos		

Método AA

Columna	Interchim Uptisphere Strategy, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	14,0	18,8	81,2
	14,5	0	100
	17,0	0	100
	17,5	95	5
	20,0	95	5
Longitudes de onda	210, 264 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		

Tiempo de ejecución	20 minutos		

Método AB

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	15,0	40	60
	15,2	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 240 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	22 minutos		

Método AC

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	15,0	50	50
	15,2	0	100
	18,0	0	100
	18,5	95	5
	22,0	95	5
Longitudes de onda	210, 240 nm		

Caudal	1,4 mL/min
Temperatura de la columna	25 °C
Tiempo de ejecución	22 minutos

Método AD

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	5,0	80	20
	26,0	60	40
	26,5	0	100
	28,0	0	100
	28,5	95	5
	30,0	95	5
Longitudes de onda	210, 380 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	30 min		

Método AE

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	0,5	80	20
	20,5	53,3	47,7

	21,0	0	100
	24,0	0	100
	24,5	95	5
	27,0	95	5
Longitudes de onda	210, 250 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	27 min		

Método AF

Columna	Phenomenex Luna C18(2), 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 o 10 µm		
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo		
Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	25,0	40	60
	25,5	0	100
	27,5	0	100
	28,0	95	5
	30,0	95	5
Longitudes de onda	210, 290, 305 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	30 min		

Método AG

Columna	Phenomenex Kinetex EVO-18, 100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Fase móvil	A: 0,05 % TFA en agua B: Acetonitrilo

Gradiente	Tiempo [min]	A [%]	B [%]
	0,0	95	5
	0,5	80	20
	26	53,3	40
	26,5	0	100
	28	0	100
	28,5	95	5
	30,0	95	5
Longitudes de onda	210, 264. 380 nm		
Caudal	1,4 mL/min		
Temperatura de la columna	25 °C		
Tiempo de ejecución	30 min		

Espectroscopia de RMN

^{1}H y el espectro se registraron a 500 MHz a temperatura ambiente y se referenciaron frente a trimetilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) de campo bajo a campo alto. Las constantes de acoplamiento (*J)* se expresan en hercios (Hz) y las abreviaturas que indican la multiplicidad son las siguientes: s= singlete, d= doblete, t= triplete, dd= doblete de dobletes, m= multiplete.

Espectrometría de masas (EM)

Las mediciones de EM se llevaron a cabo en un CMS Advion expression®. Las muestras se enviaron por inyección directa con una jeringa. Para la ionización se utilizó una fuente de ionización por electrospray (ESI) o una fuente de ionización a presión atmosférica (APCI). Los análisis se realizaron en modo de iones positivos. En el caso de la ESI. la temperatura del capilar se fijó en 250 °C. Las temperaturas del gas de origen se fijaron en 250 y 300 °C, respectivamente, con un flujo de 4 y 5 L/min, respectivamente. El flujo de gas de nebulización se fijó en 0,5 L/min. El voltaje del electrospray se fijó en 3,5 kV. Para la APCI. la temperatura del capilar se fijó en 250 °C, la temperatura del gas de origen en 350 °C y se utilizó la descarga de corona APCI a 5 μA.

Purificación RP-HPLC preparativa

La purificación RP-HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema Agilent 1260 Infinity II equipado con bomba binaria, multimuestreador, VWD, colector de fracciones y organizador de columnas. Como columnas, Phenomenx Luna® C18 (2) 10 µm 100 Å 250 x 21,2 mm, Kinetex® EVO-C18 5 µm 100 Å 250 x 21,2 mm y ACE C18-PFP 5 µm 100 Å 250 x 21,2 mm con caudales entre 24 - 30 mL/min utilizando elución en gradiente lineal de acetonitrilo en agua (+0,05 % TFA). En caso de que se utilizara ácido (p. ej., TFA) como aditivo del disolvente durante la purificación, los compuestos que comprenden grupos básicos como las aminas se obtuvieron como las sales correspondientes (p. ej., sal de TFA).

Cromatografía flash

La purificación mediante cromatografía flash sobre sílice se realizó utilizando un Teledyne ISCO CombiFlash NextGen 300+ equipado con detección UV y ELSD y columnas de sílice de fase normal de un solo uso RediSep® con malla entre 230 y 400.

Procedimiento general 1 (GP1): Reacción de clic CuAAC para la unión del potenciador de solubilidad

A una solución agitada de azida (0,9-1,5 equiv.) y alquino (1 equiv.) en DMF se añadió DMF:agua (5:1 o 10:1) que contenía tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina) (TBTA, 0,125-0,625 equiv.) o tris[(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 0,125-2 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado,125-0,625 equiv.) o tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 0,125-2 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,1-1 equiv.) y ascorbato de sodio (0,25-3,0 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente hasta su finalización. Una vez completada, la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento mediante HPLC preparativa para obtener el producto tras liofilización.

Procedimiento general 2 (GP2): Reacción de clic CuAAC sobre andamiaje de poliazida

A una solución agitada de poliazida (1 equiv.) y alquino (1,05-1,25 equiv. por fracción de azida) en DMF se añadió agua con Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 0,63-1,35 equiv. por fracción de azida) y sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,525-0,65 equiv. por fracción de azida),63-1,35 equiv. por fracción de azida), sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,525-0,65 equiv. por fracción de azida) y ascorbato de Na (1-2,15 equiv. por fracción de azida). La proporción resultante de DMF/agua fue de 5:1 o 10:1. La mezcla de reacción

resultante se dejó agitar a temperatura ambiente hasta su finalización. Una vez completada, la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento mediante HPLC preparativa para obtener el enlazador-carga multimérico después de la liofilización.

Procedimiento general 3 (GP3): Fijación de intermedios 3,1 o 3,2

La carga de enlace protegida con Fmoc se trató con dietilamina (Et_2 N, 20-24 equiv.) en DMF a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se siguió por RP-HPLC. El disolvente se eliminó *al vacío* y el residuo se coevaporó una vez con DMF. A continuación, el residuo se disolvió en DMF bajo argón y se añadió una solución **del intermediario 3.1 o 3,2** (1,1-1,5 equiv.) en DMF seguida de N-etildiisopropilamina (DIPEA, 1,4-3 equiv.). La solución se agitó a temperatura ambiente y el progreso se siguió por RP-HPLC. Una vez completada, se evaporó el disolvente y El producto crudo se purificó por RP-HPLC.

Procedimiento general 4 (GP4): Fijación de maleimida

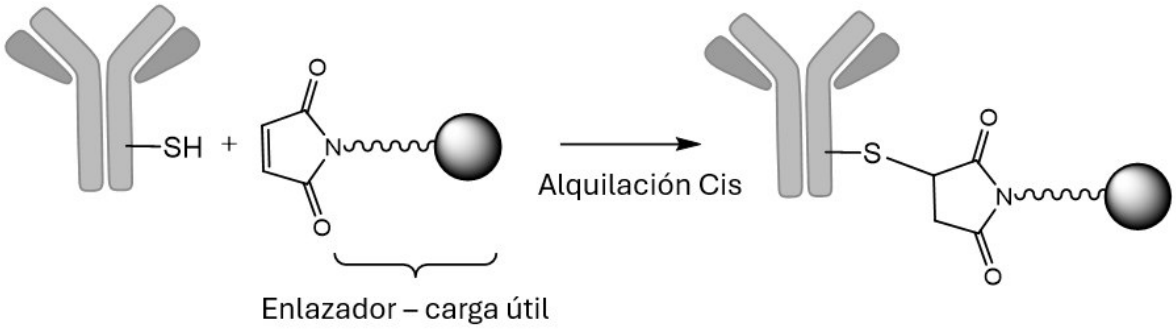
A una solución agitada de la carga de enlace multimérica en DMF seca se añadió éster Mal-PEG(4)-NHS (1-4 equiv.) y DIPEA (1-4 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez completada, la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento mediante HPLC preparativa para obtener el compuesto final tras liofilización.

Procedimiento general 5 (GP5): Unión de PEG-azida a Mono-6-amino-6-deoxi-ciclodextrina

El éster azido-PEG-NHS (1 equiv.) se disolvió en agua o DMF y se añadió una solución de mono-6-amino-6-deoxi-ciclodextrina (1 equiv.) en agua o DMF. Si se utilizaba DMF como disolvente, se añadía DIPEA (1,5-2 equiv.) si era necesario. La mezcla de reacción resultante se dejó agitar a temperatura ambiente hasta su finalización y se controló por RP-HPLC. En caso necesario, se añadió otra porción de mono-6-amino-6-deoxi-ciclodextrina (0,2 equiv.). Una vez completada, la mezcla de reacción se liofilizó y se utilizó como crudo sin purificación adicional en caso de que se utilizara agua como disolvente. Si se utilizó DMF como disolvente, el producto se aisló por precipitación en MTBE. En caso de utilizar mono-6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina, se empleó mono-6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina disponible comercialmente. En caso de utilizar mono-6-amino-6-deoxi-gamma-ciclodextrina, el material se sintetizó a partir de gamma-ciclodextrina según Tang, W., Ng, S.-C. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 691-697.

Generación de ADC - conjugación de cargas útiles enlazadoras con anticuerpos

Los anticuerpos se conjugaron con los enlaces portadores de fármacos mediante la denominada tecnología Thiomab. En este enfoque, la conjugación tiene lugar mediante el acoplamiento de una fracción reactiva tiol terminal, como un residuo de maleimida del enlazador portador del fármaco, al grupo SH libre de un residuo de cisteína genéticamente modificado en la región Fc del anticuerpo, como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



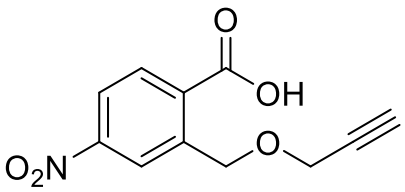
Los principios de este método de conjugación se divulgan en Junutula *et al*. Nat Biotechnol. 2008 Aug;26(8):925-32, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia.

Los anticuerpos anti-GUCY2C utilizados en los presentes experimentos comprenden una sustitución D265C en ambos dominios Fc, con el fin de proporcionar un residuo de cisteína que tiene un grupo SH libre. La tecnología respectiva se divulga en el documento WO2016/142049 A1, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia.

EJEMPLO 1 - Síntesis de compuestos enlazadores modulares

Ejemplo 1.1 Síntesis de intermediarios de enlace

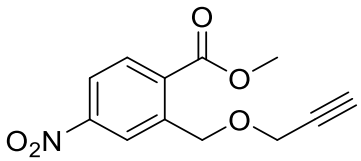
Paso 1: Síntesis del ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico



A una solución de metil-2-(bromometil)-4-nitrobenzoato (CAS-Nr. 133446-99-8, 2 g, 7,30 mmol, 1 equiv.) en 10 mL de acetonitrilo se añadieron prop-2-in-ol (2,16 mL, 36,5 mmol, 5 equiv.) y Cs_2CO_3 (5,96 g, 18,3 mmol, 2,5 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 80 °C durante 3 h y el progreso se monitorizó por RP-HPLC. La mezcla de reacción se filtró.

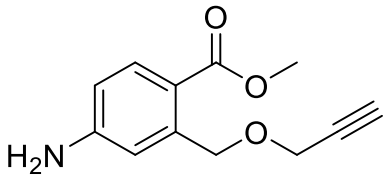
El filtrado se diluyó con acetato de etilo (20 mL) y se lavó con agua (10 mL) y se extrajo con $NaHCO_3$ (2x 10 mL). Para la precipitación, las capas acuosas combinadas se acidificaron a pH 2 utilizando HCl 2 M (50 mL). Después de la filtración, el sólido obtenido se recogió en 1,4-dioxano y se liofilizó durante la noche para producir ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico como un sólido rojo pálido (1,44 g, 83 %). RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO) δ 8,36 (d, *J*= 2,4 Hz, 1H), 8,22 (dd, *J*= 8,6, 2,5 Hz, 1H), 8,09 (d, *J*= 8,5 Hz, 1H), 4,94 (s, 2H), 4,36 (d, *J*= 2,4 Hz, 2H), 3,53 (t, *J*= 2,4 Hz, 1H). HPLC (método **A**): t_R = 11,3 min.

Paso 2: Síntesis de 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo



A una solución de ácido 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoico (1,44 g, 6,12 mmol, 1 equiv.) en 30 mL de metanol seco se añadió $SOCl_2$ (3,56 mL, 49 mmol, 8 equiv.) a 0 °C. La mezcla se agitó a 70 °C durante 3,5 h y el progreso se monitorizó por RP-HPLC. Una vez completado, el disolvente y los volátiles se eliminaron a presión reducida. El residuo obtenido se recogió en 1,4-dioxano y se liofilizó durante la noche para producir metil- 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato (1,52 g, 99%) como un sólido marrón pálido. RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO) δ 8,37 (dd, *J*= 2,3, 1,1 Hz, 1H), 8,28 - 8,22 (m, 1H), 8,08 (d, *J*= 8,5 Hz, 1H), 4,92 (d, *J*= 0,8 Hz, 2H), 4,34 (d, *J*= 2,4 Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,49 (t, *J*= 2,4 Hz, 1H). HPLC (método **A**): t_R = 13,1 min.

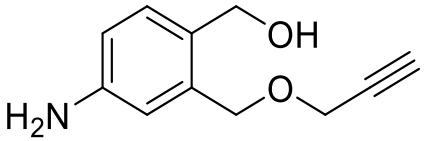
Paso 3: Síntesis de 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo



A una suspensión agitada de 4-nitro-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato de metilo (1,52 g, 6,1 mmol, 1 equiv.) en una mezcla de EtOH (15 mL) y agua (7,5 mL) se añadió polvo de hierro (2,73 g, 48,8 mmol, 8 equiv.) y NH_4Cl (2,61 g, 48,8 mmol, 8 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se dejó agitar a 80 °C durante 4 h y el progreso se monitorizó por RP-HPLC. Tras el consumo total del material de partida, la reacción se enfrió hasta rt, se filtró a través de celite y se lavó con acetato de etilo (15 mL). El filtrado se lavó con solución de

bicarbonato sódico sat., agua y salmuera (15 mL cada una). Las capas acuosas se extrajeron con acetato de etilo (15 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre $MgSO_4$. Después de la filtración, el disolvente se eliminó a presión reducida para obtener 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato como un sólido rojo (1,29 g, 96 %) después de secar *al vacío*. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,87 (d, *J*= 8,5 Hz, 1H), 6,99 (dt, *J*= 2,2, 1,0 Hz, 1H), 6,59 (dd, *J*= 8,5, 2,5 Hz, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,31 (d, *J*= 2,4 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 2,48 (t, *J*= 2,4 Hz, 1H). HPLC (método **A**): t_R = 10,5 min.

Paso 4: Síntesis de (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol



A una disolución enfriada (0 °C) de THF seco (13 mL) se añadió lentamente $LiAlH_4$ (1 M en THF, 12,01 mmol, 12,01 mL, 2,5 equiv.). Se añadió gota a gota a 0 °C una solución de 4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzoato (1,06 g, 4,8 mmol, 1 equiv.) en THF seco (10 mL). Tras la adición completa, la mezcla resultante se dejó agitar toda la noche a rt. El progreso de la reacción se monitorizó por RP-HPLC. La mezcla de reacción se vertió en una solución de tartrato sódico potásico 1 M (120 mL) enérgicamente agitada y se agitó durante otros 30 min a rt. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (3x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera (30 mL cada una). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener El producto crudo. La purificación mediante cromatografía flash ISCO SiO_2 (0-100 % de acetato de etilo en hexano) produjo (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol (0,65 g, 71 %). RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO) δ 6,99 (d, *J*= 8,1 Hz, 1H), 6,58 (d, *J*= 2,4 Hz, 1H), 6,45 (dd, *J*= 8,0, 2,4 Hz, 1H), 4,93 (s, 2H), 4,62 - 4,53 (m, 1H), 4,47 (s, 2H), 4,35 (d, *J*= 5,4 Hz, 2H), 4,15 (d, *J*= 2,4 Hz, 2H), 3,42 (t, *J*= 2,4 Hz, 1H). HPLC (método **A**): t_R = 4,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 174,2 $[M\text{-}H_2O+H]^+$, m/z calculado= 174,1

Paso 5a: Síntesis Fmoc-Val-Ala-OH

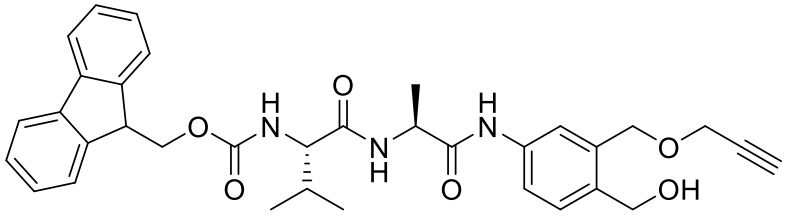
La síntesis de Fmoc-Val-Ala-OH se realizó como se describe en el documento WO 2017/149077.

Paso 5b: Síntesis Boc-Val-Ala-OH

El compuesto del título está disponible comercialmente. CAS:70396-18-8

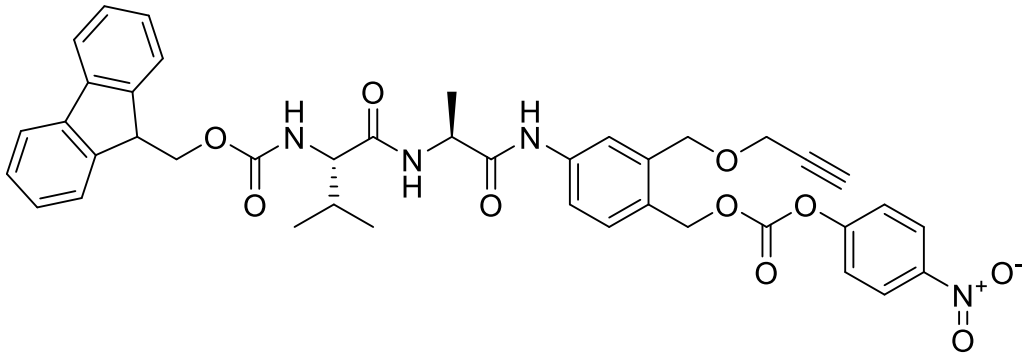
<u>Ejemplo 1.2 - Síntesis de intermediarios enlazador-carga útil</u>

Etapa 6a: Síntesis **del intermediario 1.1**



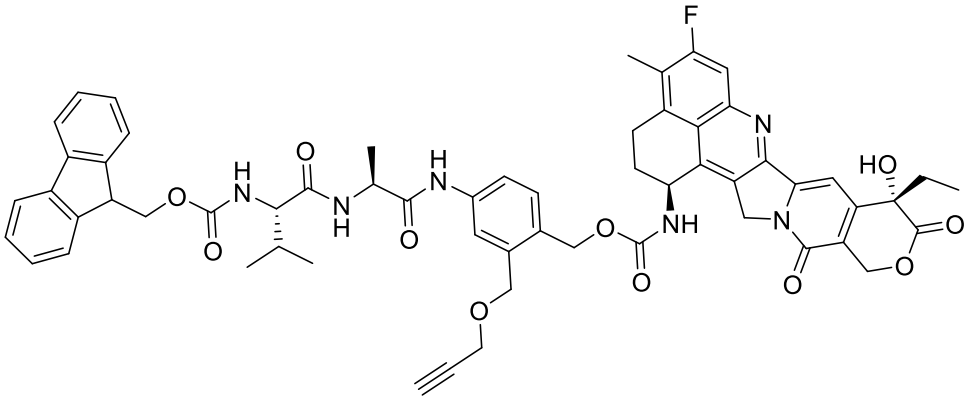
A una solución agitada de Fmoc-Val-Ala-OH (1,43 g, 3,41 mmol, 1 equiv.) y (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol (0,65 g, 3,41 mmol, 1 equ,41 mmol, 1 equiv.) en THF seco (20 mL) se añadió N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ, 1,05 g, 4,1 mmol, 1,2 equiv.). a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 5 d. El disolvente se eliminó a presión reducida. El intermediario crudo resultante se purificó mediante cromatografía flash sobre sílice (gradiente de 0-5 % de MeOH en DCM) para producir **el intermediario 1.1** como un sólido incoloro (1,25 g, 63 %). HPLC (método **A**): t_R = 12,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 601,2 $[M+NH]_4^+$, m/z calculado= 601,3

Etapa 7: Síntesis **del intermediario 1.2**



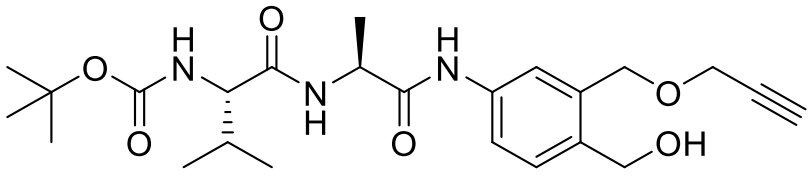
A una disolución agitada **del intermediario 1.1** (0,72 g, 1,24 mmol) en DMF seca (15 mL) se añadieron bis-4-nitrofenil-carbonato (0,75 g, 2,48 mmol, 2 equiv.) y N-etildiisopropilamina (DIPEA, 3,1 mmol, 0,53 mL, 2,5 equiv.) bajo atmósfera de argón. La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 h. Una vez completada, el disolvente se eliminó a presión reducida. El intermediario bruto se purificó por cromatografía flash sobre sílice (gradiente de 0-100 % de etilacetato en n-hexano) para obtener **el intermediario 1.2** (0,75 g, 81 %) como un sólido amarillo pálido tras liofilización a partir de 1,4-dioxano:agua (4:1). HPLC (método **C**): t_R = 13,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 771,2 $[M+Na]^+$, m/z calculado= 771,3

Paso 8a: Síntesis **del intermediario 1.3**



A una suspensión agitada de mesilato de exatecano (0,58 g, 1,1 mmol, 1 equiv.) en DMF seca (20 mL) se añadió una solución recién preparada **del intermediario 1.2** (0,82 g; 1,1 mmol, 1 equiv.) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, 0,042 g, 0,275 mmol, 0,25 equiv.) en DMF seca (20 mL). A la mezcla resultante se añadió DIPEA (0,28 g, 2,16 mmol, 0,37 mL, 2 equiv.) y 2,6-lutidina (141 mmol, 16,3 mL, 129 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y el progreso se monitorizó por RP-HPLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. La purificación por cromatografía flash sobre sílice (gradiente de 0-5 % de MeOH en DCM) y liofilización de 1,4-dioxano:agua (4:1) dio el intermediario 1.**3** (1,08 g, 95 %) como un sólido gris. HPLC (método **D**): t_R = 13,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1045,3 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1045,4

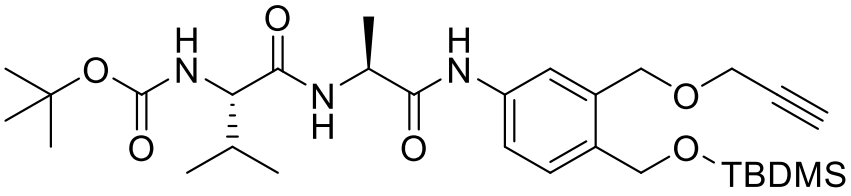
Paso 6b: Síntesis **del intermediario 1.4**



A una solución agitada de Boc-Val-Ala-OH (0,57 g, 1,98 mmol, 1 equiv.) y (4-amino-2-((prop-2-in-1-iloxi)metil)fenil)metanol (0,36 g, 1,89 mmol, 1,05 equiv,05 equiv.) en THF seco (9 mL) se añadió N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ, 0,56 g, 2,27 mmol, 1,2 equiv.). a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 5 h. El disolvente se eliminó a presión reducida. El intermediario crudo resultante se purificó mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-50 % hexano/acetato de etilo) para producir **el intermediario 1.4** como un sólido incoloro (0,81 g, 93 %). RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO) δ 9,89 (s, 1H), 7,98 (q, *J*= 7,1 Hz, 1H), 7,54 (d, *J*= 7,5 Hz, 2H), 7,32 (d, *J*= 8,5

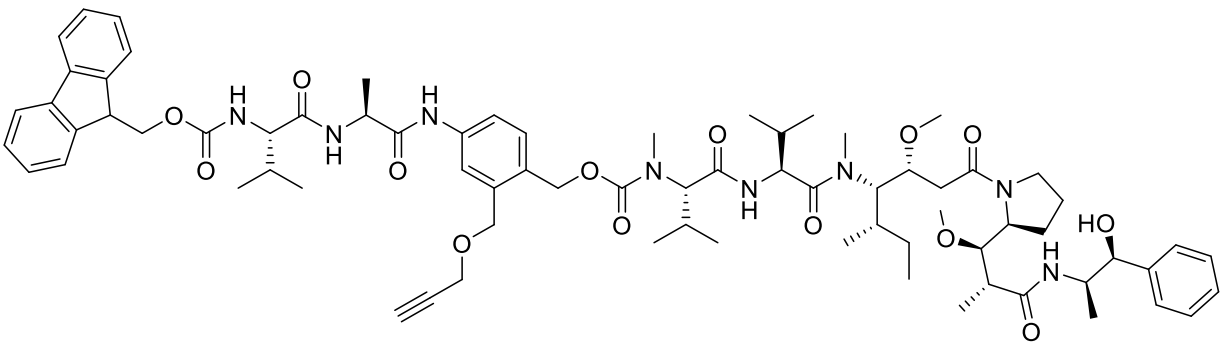
Hz, 1H), 4,95 (t, *J*= 5,4 Hz, 1H), 4,55 (s, 2H), 4,48 (d, *J*= 5,2 Hz, 2H), 4,43 (t, *J*= 7,0 Hz, 1H), 4,19 (d, *J*= 2,4 Hz, 2H), 3,83 (s, 1H), 3,44 (t, *J*= 2,4 Hz, 1H), 1,97 (s, 1H), 1,39 (s, 9H), 1,30 (d, *J*= 7,0 Hz, 3H), 0,85 (dd, *J*= 23,2, 6,8 Hz, 6H). HPLC (método **A**): $t_{R=}$ 10,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 461,9 $[M+H]^+$, m/z calculado= 462,26

Paso 7b: Síntesis **del intermediario 1.5**



A una disolución agitada **del intermediario 1.4** (0,3 g, 0,65 mmol, 1 equiv.) e imidazol (0,07 g, 0,96 mmol, 1,5 equiv.) en DMF seca (2 mL) se añadió gota a gota una disolución de cloruro de terc-butildimetilsililo (0,12 g, 0,81 mmol, 1,25 equiv.) en DMF seca (1 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente y se controló por TLC y RP-HPLC. Después de 2 h, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se recogió en 100 mL de acetato de etilo y se lavó con ácido cítrico 0,2 N, bicarbonato sódico sat. y salmuera (cada 100 mL). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$. Tras la filtración, el disolvente se eliminó a presión reducida. El intermediario crudo resultante se purificó por cromatografía ISCO SiO_2 (0-50 % hexano/acetato de etilo) para obtener **el intermediario 1.5** como un sólido incoloro (0,22 g, 58 %). HPLC (método **P**): t_R = 16,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 576,0 $[M+H]^+$, m/z calculado= 576,35

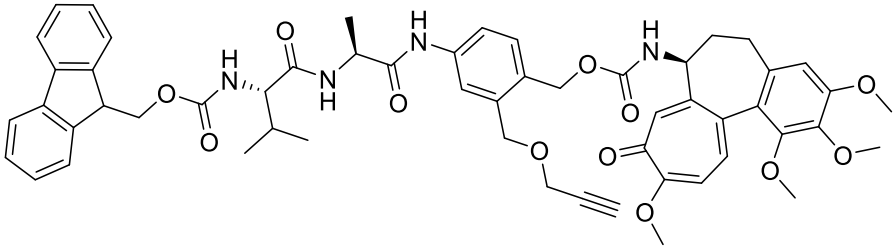
Etapa 8b: Síntesis **del intermediario 1.6**



El intermediario 1.6 se sintetizó como se describió para **el intermediario 1.3** pero usando MMAE y la mezcla de reacción se agitó durante 45 h. **El intermediario 1.6**(175,37 mg, 56 %) se obtuvo como un sólido incoloro. UHPLC (método **R** con TFA como aditivo a 290 nm):

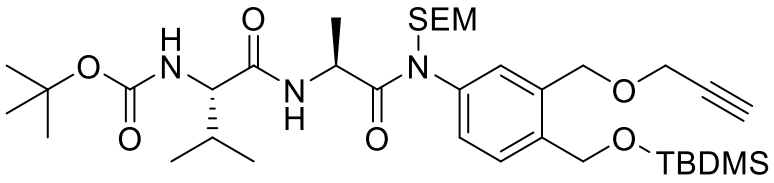
t_R= 4,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1327,8 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1327,75

Etapa 8c: Síntesis **del intermediario 1.7**



El intermediario 1.7 se sintetizó como se ha descrito para **el intermediario 1.3**. Sin embargo, el análisis RP-HPLC de la mezcla de reacción indicó que la reacción se completó tras 3,5 h de agitación. **El intermediario 1.7** (182,24 mg, 67 %) **se** obtuvo como un sólido amarillento. UHPLC (método **R** con TFA como aditivo a 290 nm): t_R= 4,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 967,2 $[M+H]^+$, m/z calculado= 967,41

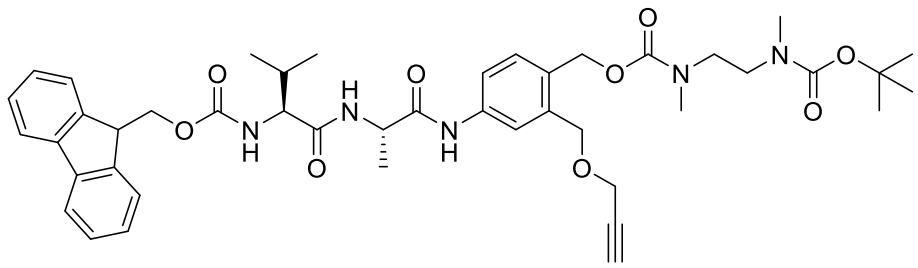
Paso 8d: Síntesis **del intermediario 1.8**



A una disolución enfriada (0 °C) **del intermediario 1.5** (0,21 g, 0,38 mmol, 1 equiv.) en THF seco (7,6 mL) se añadió gota a gota una disolución de 1,1,*1-trimetil-N*-(trimetilsilil)silanaminida de litio (LiHMDS, 1 M en THF, 0,57 mL, 0,57 mmol, 1,5 equiv.). Tras la adición completa, la mezcla resultante se dejó agitar durante 10 min. Después se añadió cloruro de 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEM-Cl, 0,13 mL, 0,76 mmol, 2 equiv.) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante otros 15 min a 0 °C. Se retiró el baño de hielo y la mezcla resultante se dejó enfriar. Se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó durante otros 30 min desde 0 °C hasta temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, se añadió solución saturada de citrato sódico (2,5 mL, pH= 6,4). Para la separación de fases, la mezcla resultante se diluyó con 20 mL de acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con tampón citrato sódico (pH= 4,76), bicarbonato sódico sat. y salmuera (cada 2,5 mL). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$. Tras la filtración, el disolvente se eliminó a presión reducida. El intermediario crudo resultante se purificó mediante cromatografía ISCO SiO_2 (0-50 % *hexano/terc-butil* metil éter) para obtener **el intermediario 1.8** como un sólido incoloro (0,25

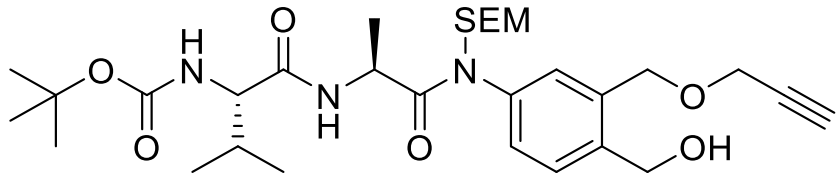
g, 94 %). HPLC (método **P**): t_R = 16,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 706,1 $[M+H]^+$, m/z calculado= 706,43

Etapa 8c: Síntesis **del intermediario 1.9**



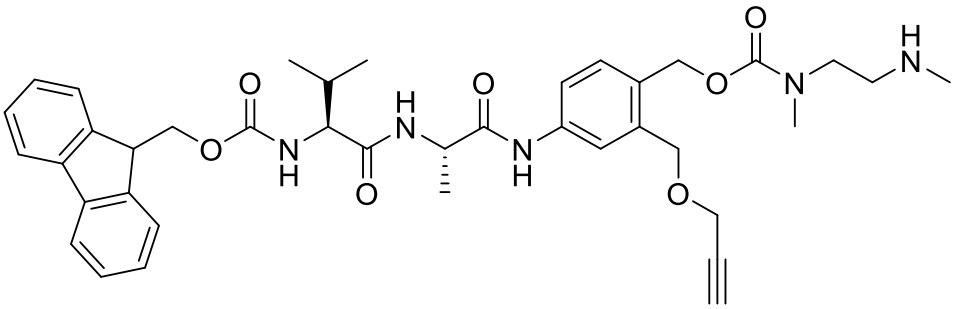
A una disolución agitada **del intermediario 1.2** (1 g, 1,34 mmol, 1 equiv.) en DMF seca (35 mL) se añadió metil(2-(metilamino)etil)carbamato de *terc-butilo* (0,3 g, 1,6 mmol, 1,2 equiv.). a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Después, se diluyó con 75 mL de acetato de etilo/THF 5:1 y se lavó con ácido cítrico al 10 %, bicarbonato sódico al 5 % y salmuera (50 mL cada uno). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$. Tras la filtración, el disolvente se eliminó a presión reducida. El intermediario crudo resultante se purificó por cromatografía ISCO SiO_2 (0-100% hexano/acetato de etilo). Tras la evaporación de los volátiles, el residuo se recogió en 1,4-dioxano y se liofilizó para obtener **el intermediario 1.9** como un sólido incoloro (0,95 g, 89 %). HPLC (método **A**): t_R = 15,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 798,2 $[M+H]^+$, m/z calculado= 798,41

Paso 9a: Síntesis **del intermediario 1.10**



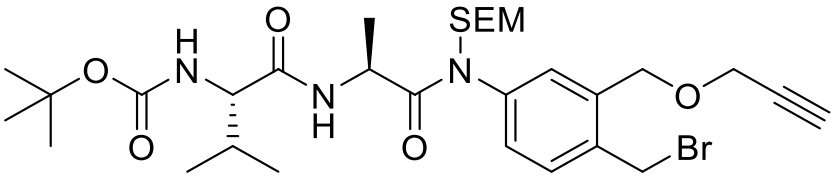
A una disolución agitada **del intermediario 1.8** (0,25 g, 0,36 mmol, 1 equiv.) en THF seco (3,6 mL) se añadió una disolución de fluoruro de *N*,*N*,*N*-tributilbutan-1-aminio *(*TBAF, 1 M en THF, 0,43 mL, 0,43 mmol, 1,2 equiv.). Una vez completada (~15 min), la mezcla de reacción se sometió a cromatografía ISCO SiO_2 (0-100 % *hexano/terc*-butil metil éter) para obtener **el intermediario 1.10** como un sólido incoloro (0,23 g, cuant.). HPLC (método **A**): t_R = 14,6 min. MS (ESI): m/z encontrado= 591,9 $[M+H]^+$, m/z calculado= 592,34

Etapa 9b: Síntesis **del intermediario 1.11**



A una disolución agitada **del intermediario 1.9** (0,27 g, 0,33 mmol, 1 equiv.) en cloruro de metileno seco (3 mL) se añadió TFA (0,43 mL, 6,61 mmol, 19,75 equiv.). a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Una vez completada (~2 h), la mezcla de reacción se añadió a 13 mL de MTBE helado. El precipitado resultante se aisló por centrifugación, se resuspendió en 10 mL de MTBE frío y se centrifugó de nuevo. El producto crudo (0,24 g) se recogió en 5 mL de DMF y se purificó por prep. RP-HPLC para obtener 190,4 mg (70 %) **del intermediario 1.11** (TFA-Sal) como un sólido incoloro. HPLC (método **A**): t_R = 15,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 798,2 $[M+H]^+$, m/z calculado= 798,41

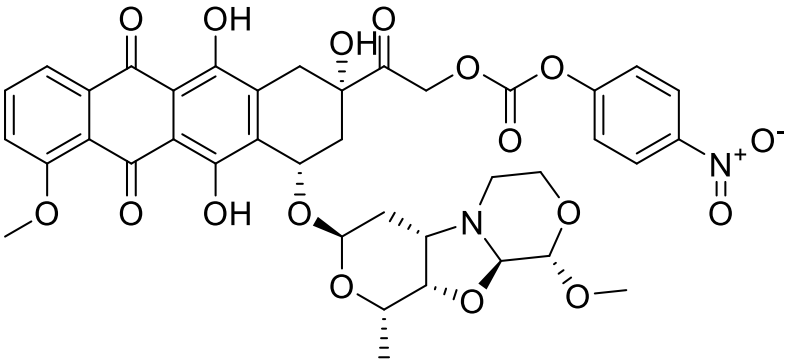
Paso 10a: Síntesis **del intermediario 1.12**



A una disolución enfriada (5 °C) **del intermediario 1.10** (0,13 g, 0,22 mmol, 1 equiv.) en cloruro de metileno seco (1,3 mL) en atmósfera inerte se añadió anhídrido metanosulfónico (disuelto en 0,7 mL de DCM seco, 0,046 g, 0,26 mmol, 1,2 equiv.) y DIPEA (0,09 mL, 0,53 mmol, 2,4 equiv.). La reacción se monitorizó por TLC y RP-HPLC. Después de 3 h se completó la sulfonación (si es necesario, puede añadirse anhídrido metanosulfónico adicional). Se añadió una disolución de LiBr (0,095 g, 1,11 mmol, 5 equiv.) en 1,7 mL de THF seco, y la mezcla de reacción se dejó agitar otros 10 min a 5 °C. Se retiró el baño de enfriamiento y la reacción se completó. Se retiró el baño de enfriamiento y la reacción se agitó hasta su finalización a temperatura ambiente. Una vez completada (~2 h), se añadió solución de citrato sódico 0,2 M (5 mL, pH= 6,4). Para la separación de fases, la mezcla resultante se diluyó con 50 mL de MTBE. La capa orgánica se lavó con tampón citrato sódico 0,2 M (5 mL, pH= 4,76), bicarbonato sódico sat. y salmuera (cada 50 mL). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$. Tras

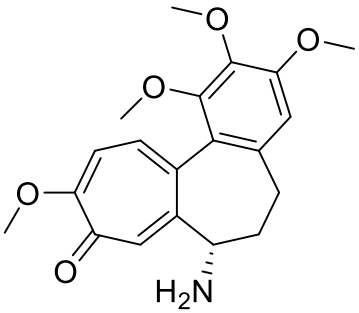
la filtración, el disolvente se eliminó a presión reducida. El intermediario crudo resultante se purificó por cromatografía flash (SiO_2, 0-100 % *hexano/terc-butil* metil éter). Se eliminó el disolvente y el residuo se recogió en 1,4-dioxano y se liofilizó para producir **el intermediario 1.12** como un liofilizado incoloro (0,052 g, 36 %). HPLC (método **P**): t_R = 9,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 653,8 $[M+H]^+$, m/z calculado= 654,26

Paso 10b: Síntesis **del intermediario 1.13**



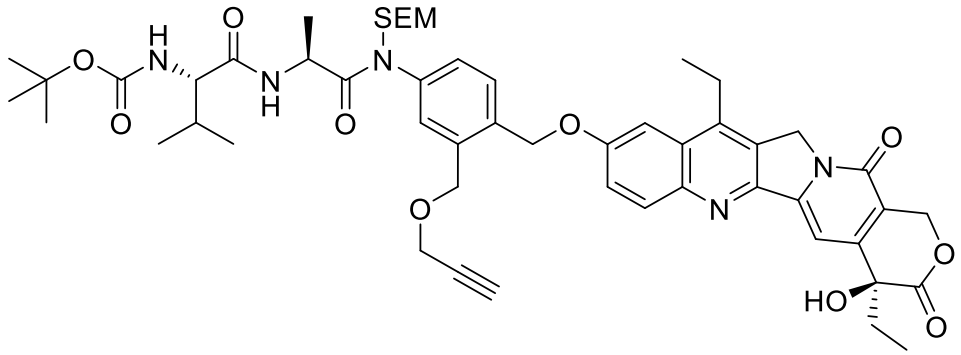
El intermediario se preparó como se describe en Holte*, et al.,* Bioorg. & Med. Chem., Vol. 30, 24, 2020, 127640. El producto diana se obtuvo en un 17 % de rendimiento como un sólido rojo. MS (ESI): m/z encontrado= 806,8 $[M+H]^+$, m/z calculado= 807,22 $[M+H]^+$.

Etapa 10c: Síntesis **del intermediario 1.14 (Deacetilcolchicina)**



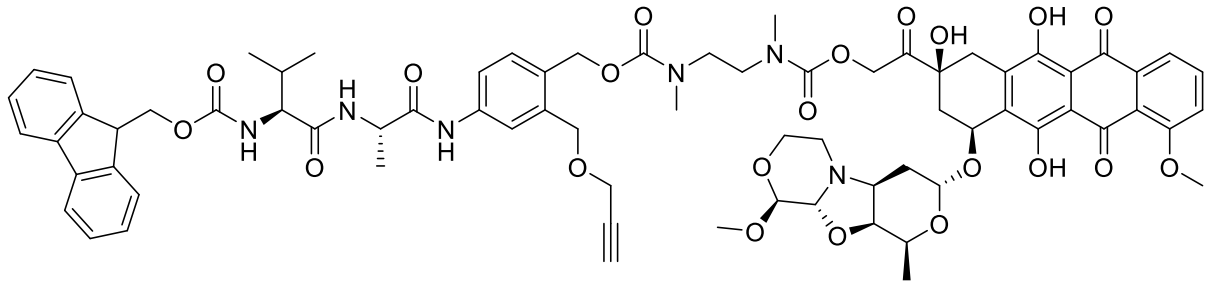
El intermediario se preparó como se describe en el documento WO 2016/019340. El producto diana se obtuvo en un 99 % de rendimiento (en 3 pasos) como un sólido amarillento. UHPLC (método V): t_R= 1,0 min. RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO) 8,46 (s, 3H), 7,20 - 7,13 (m, 2H), 7,10 (d, *J*= 11,2 Hz, 1H), 6,81 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,83 - 3,74 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 2,66 (d, *J*= 6,8 Hz, 1H), 2,34 - 2,26 (m, 2H), 1,93 (dd, *J*= 11,8, 5,4 Hz, 1H). MS (APCI): m/z encontrado= 357,8 $[M+H]^+$, m/z calculado= 358,16

Paso 11a: Síntesis **del intermediario 1.15**



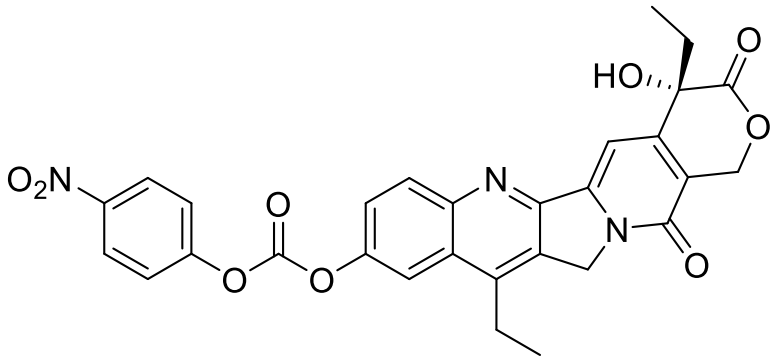
SN-38 (0,036 g, 0,092 mmol, 1 equiv.) se suspendió en 1,6 mL de DMF seca. A 0,8 mL de DMF seca se añadió terc-butóxido potásico (KOtBu, 1 M en THF, 0,14 mL, 0,14 mmol, 1,5 equiv.). La solución de KOtBu resultante se añadió gota a gota a temperatura ambiente al matraz de reacción en atmósfera de argón. Después de 5 min, **el intermediario 1.12** (0,06 g, 0,092 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 0,6 mL de DMF seca y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción. El disolvente se eliminó a presión reducida. El intermediario crudo resultante se purificó por cromatografía flash (SiO_2, 0-50 % hexano/acetato de etilo) para obtener **el intermediario 1.9** como un sólido incoloro (0,04 g, 52 %). HPLC (método **A** (380 m)): t_R = 15,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 966,2 $[M+H]^+$, m/z calculado= 966,47

Paso 11b: Síntesis **del intermediario 1.16**



A la solución agitada **del intermediario 1.13** (31,62 mg, 0,039 mmol, 1 equiv.) en 0,54 mL de DMF seca se añadieron 0,54 mL de DMF seca que contenía **el intermediario 1.11** (47,55 mg, 0,059 mmol, 1,5 equiv.) y DIPEA (13,62 µL, 0,078 mmol, 2 equiv.) bajo atmósfera de argón. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. Una vez completada, la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento por HPLC prep. para producir 26,9 mg (50 %) **del intermediario 1.16** como un sólido rojo. HPLC (método **A** sin aditivo): t_R = 15,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1365,4 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1365,55

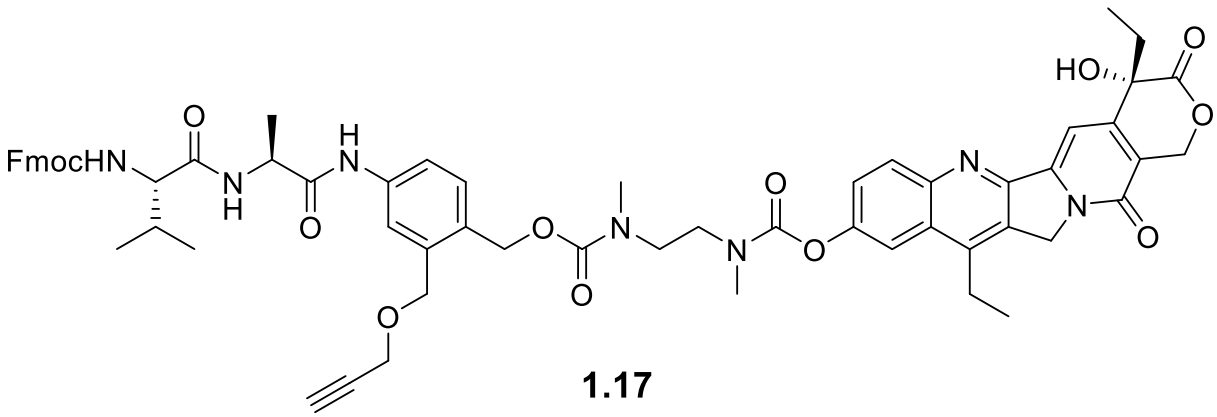
Síntesis de **SN-38-PNP**



SN38-PNP

A una suspensión de SN-38 (200 mg, 0,51 mmol, 1 equiv.) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (123,3 mg, 0,61 mmol, 1,2 equiv.) en THF (12 mL) se añadió DIPEA (129,6 µL, 0,74 mmol, 1,5 equiv.) a 0 °C bajo argón. La solución resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 h adicionales. La solución se concentró al vacío y el residuo resultante se purificó por HPLC preparativa obteniéndose SN-38-PNP (169,4 mg, 60 %) como un sólido amarillento. $C_{29}H_{23}N_3O_9$. HPLC (método A): t_R= 10,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 558,0, m/z calculado= 558,1 $[M+H]^+$

Síntesis **del intermediario 1.17**

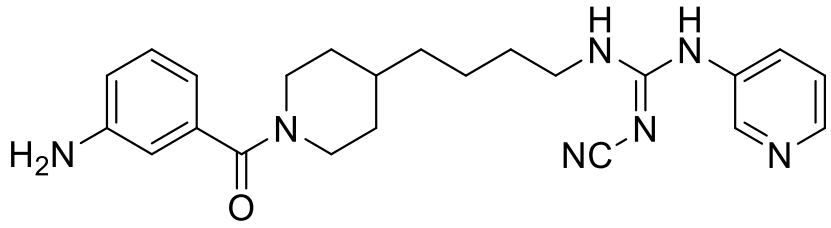


1.17

A una disolución del intermediario 1.**11** (69,6 mg, 85,7 µmol, 1 equiv.) y SN-38-PNP (47,8 mg, 85,7 µmol, 1 equiv.) en DMF (2 mL) se añadió DIPEA (29,9 µL, 171,4 µmol, 2 equiv.) bajo argón. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2,25 h y se purificó por HPLC preparativa obteniéndose el intermediario 1.17 (78 mg, 82 %) como un sólido amarillento. $C_{62}H_{65}N_7O_{13}$ HPLC (método A): t_R= 14,0 min. MS (ESI): m/z encontrado=

1168,8, m/z calculado= 1116,5 $[M+H]^+$

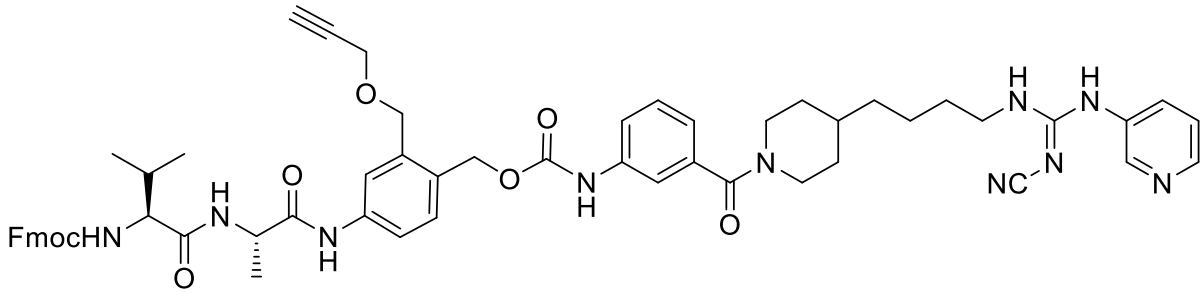
NAMPTi



NAMPTi 1

NAMPTi 1 se sintetizó como se describe en el documento WO2018201087.

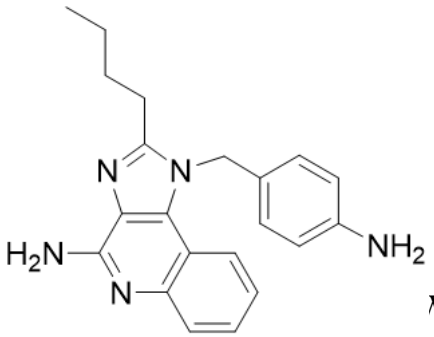
Síntesis del intermediario 1.**18**



El intermediario 1.**18** se sintetizó como se describe para el intermediario 1.3 pero usando **NAMPTi 1** (150 mg, 0,36 mmol, 1 equiv.), el intermediario 1.2 (402 mg; 0,54 mmol, 1,5 equiv.), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt, 600 µl de una solución 0,6 M en DMF, 0,36 mmol, 1 equiv.) y 2,6-lutidina (5,5 mL, 45 mmol, 125 equiv.) en DMF seca (9,52 mL). El pH de la mezcla de reacción se ajustó regularmente con DIPEA manteniendo un pH de 8. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 d y la purificación por HPLC preparativa proporcionó el intermediario 1.**18** (120,6 mg, 32 %) como un sólido incoloro $C_{58}H_{64}N_{10}O_8$. HPLC (método AA): t_R= 12,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1029,7 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1029,5.

Agonistas TLR7

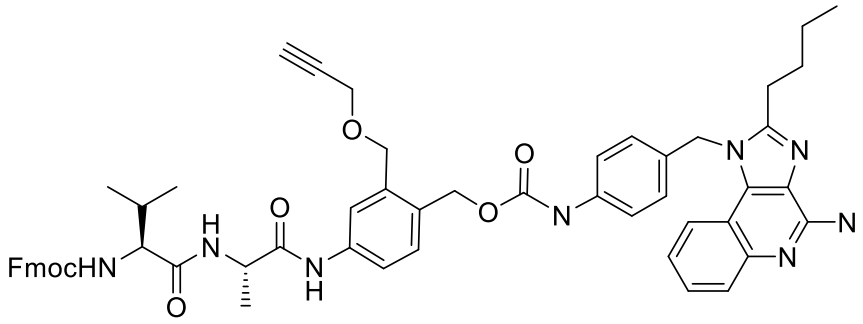
El agonista 1 se sintetizó c



*W*O2022187809.

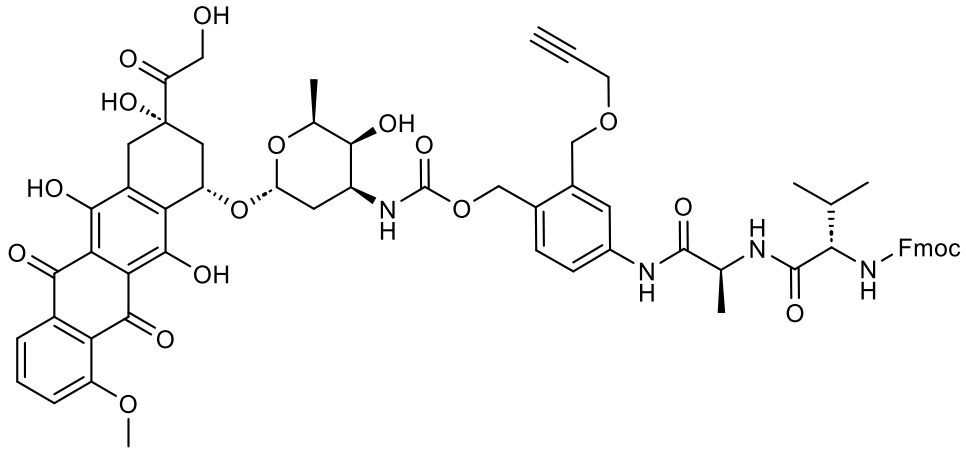
Agonista 1

Síntesis del intermediario 1.**19**



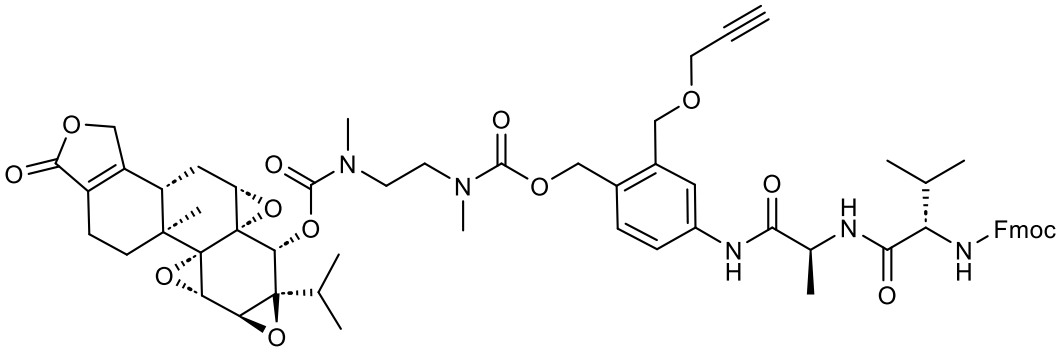
El intermediario 1.**19** se sintetizó como se ha descrito para el intermediario 1.3 pero utilizando **el agonista 1** y se agitó durante 5 d. El intermediario 1.**19** (184,1 mg, 33 %) se obtuvo como un sólido amarillento $C_{56}H_{58}N_8O_7$. HPLC (método A): t_R= 12,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 955,5 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 955,4 [M+4H],4^+

Síntesis de **1.20**



El intermediario 1.**20** se sintetizó como se ha descrito para el intermediario 1.3 a partir del intermediario 1.2 (258 mg, 0,344 mmol, 1 equiv.) y clorhidrato de doxorrubicina (200 mg. 1,0 equiv.). El intermediario 1.**20** (395 mg, 97 %) se obtuvo como un sólido rojo. Método A de HPLC (480 nm): t_R= 14,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1173,3 $[M+Na]^+$, m/z calculado= 1175,41

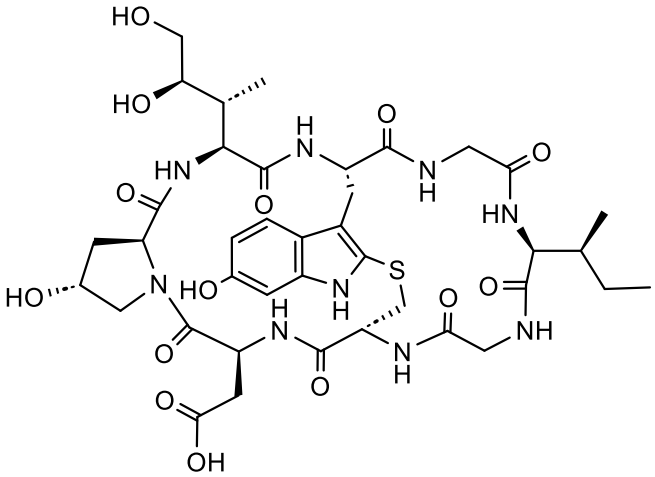
Síntesis de **1.21**



Al derivado 4-nitrofenil-carbonato de tripolida, descrito en WO2022040487 (44,60 mg, 84,87 µmol, 1 equiv.) y **el intermediario 1.11** (103,35 mg, 127,30 µmol, 1,5 equiv.) en 1 mL de DMF seca se añadió DIPEA (28,9 µL, 169,74 µmol, 2 equiv.) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente. Después de la conversión completa (1h 45min), la solución se acidificó con TFA (13 µL. 2 equiv.), se filtró (Nylon 0,2 µm) y se purificó por HPLC prep. para obtener **el intermediario 1.21** (72,95 mg, 79 %) como un sólido incoloro. Método A de HPLC (260 nm): t_R= 13,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1084,8 $[M+Na]^+$, m/z calculado= 1084,5

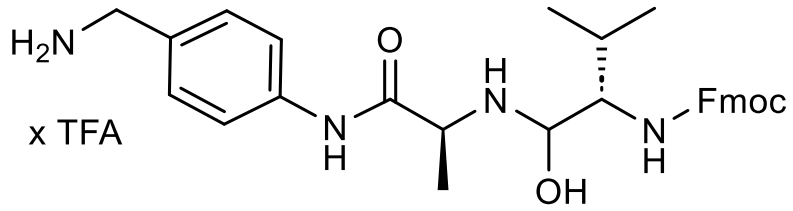
Intermediario 1.**22**

Primer paso



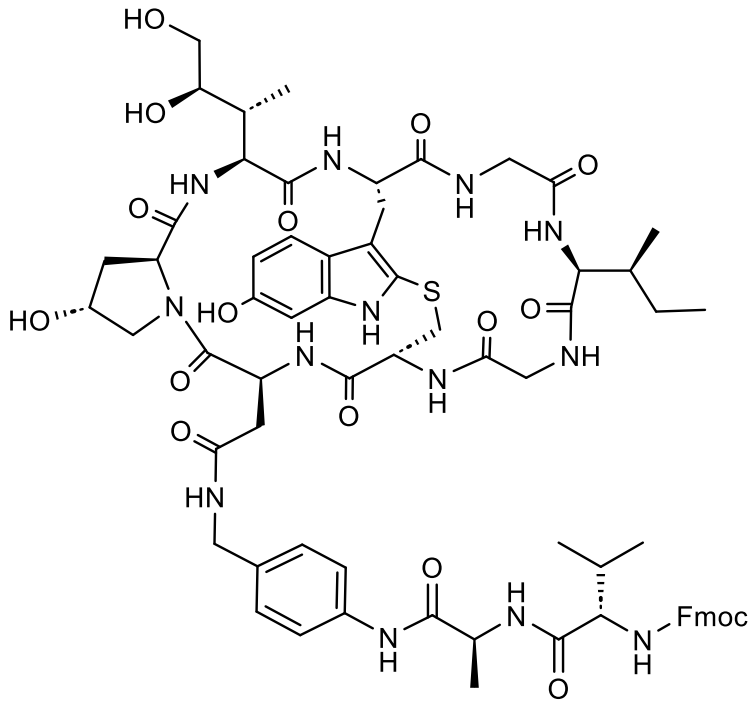
La S-deoxi-b-amanitina [CAS: 2417149-39-2] se sintetizó según Lutz et al. Angewandte Chemie, International Edition (2020), 59(28), 11390-11393.

Paso 2



El enlazador Fmoc-Val-Ala-(4-amionometil)-anilida [CAS: 2803767-21-5] se sintetizó según WO 2022/155347

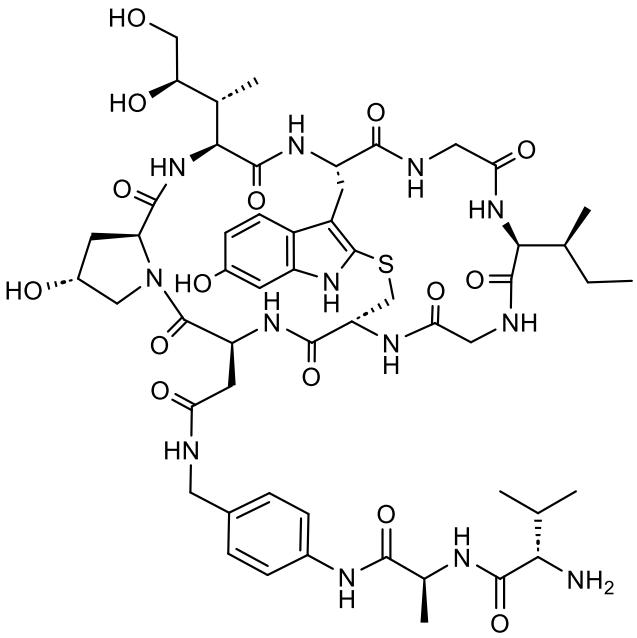
Paso 3



Al producto de la etapa 1, S-deoxi-b-amanitina (94 mg, 104 µmol) disuelto en 3 mL de DMF seca, se añadió hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (159 mg, 1040 µmol, 10 equiv.) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (162 µL, 1040 µmol, 10 equiv.) y la mezcla se agitó durante 1 h, a lo que siguió la adición del producto de la etapa 2 (98 g, 156 µmol, 1,5 equiv.) y DIPEA (53 µL, 312 µmol, 3 equiv.) y la agitación continuó durante toda la noche. La mezcla de reacción se añadió posteriormente gota a gota a 40 mL de MTBE enfriado con hielo y el precipitado resultante se aisló por centrifugación, se lavó con 40 mL de MTBE enfriado con hielo y se secó al vacío.

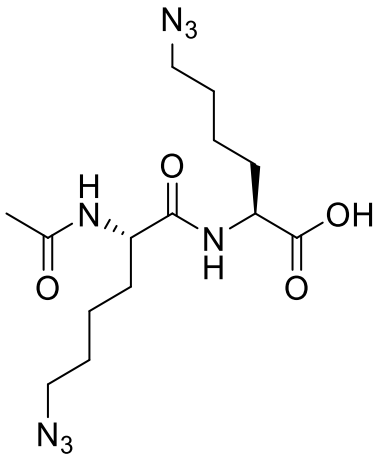
El producto crudo se purificó adicionalmente por HPLC prep. para obtener 115 mg (79 %) de producto del paso 3.

Paso 4:



El producto del paso 3 (67,02 mg, 47,85 µmol) se disolvió en 3 mL de DMF y se añadieron 100 µL (960 µmol) de dietilamina y la reacción se agitó durante 1h a temperatura ambiente. Los volátiles se evaporaron al vacío y el resto se coevaporó con 3 mL de DMF. El producto crudo se disolvió en 1 mL de metanol y se añadió gota a gota a 40 mL de MTBE enfriado con hielo y el precipitado resultante se aisló por centrifugación, se lavó con 40 mL de MTBE enfriado con hielo y se secó al vacío. El intermediario 1.**22** (69,5 mg) se utilizó sin purificación adicional.

<u>Ejemplo 1.3 - Síntesis de los intermediarios 2.1 y 2.2</u>

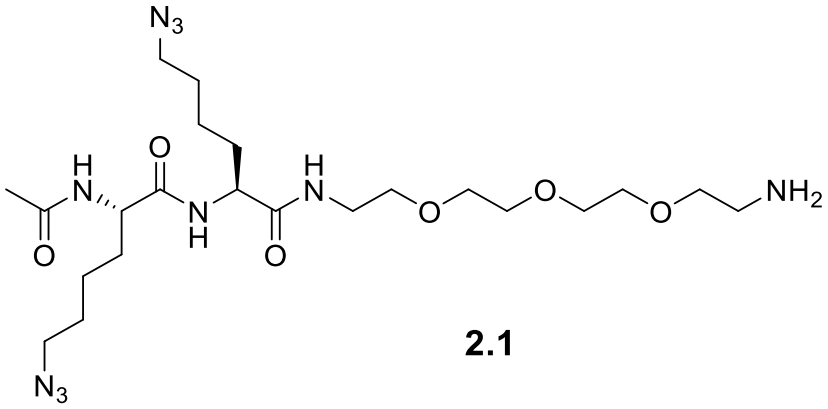


Ac-Lys(N_3)-Lys(N_3)-OH

La resina de 2-clorotritilo (4 g) se hinchó durante 10 min en abs. DCM (20 mL). La suspensión se filtró, se añadió una solución de Fmoc-Lys(N_3)-OH (1,578 g, 4 mmol, 1 equiv.), DIPEA (3,48 mL, 20 mmol, 5 equiv.) en abs. DCM (20 mL) y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró, la resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y se añadió la solución de recubrimiento (20 mL, MeOH/DIPEA/DCM 1/1/8) y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Se filtró la suspensión y se repitió una vez el procedimiento de tapado. La resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y se secó *al vacío*. La carga de la resina se determinó como se describe en *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 757-762.

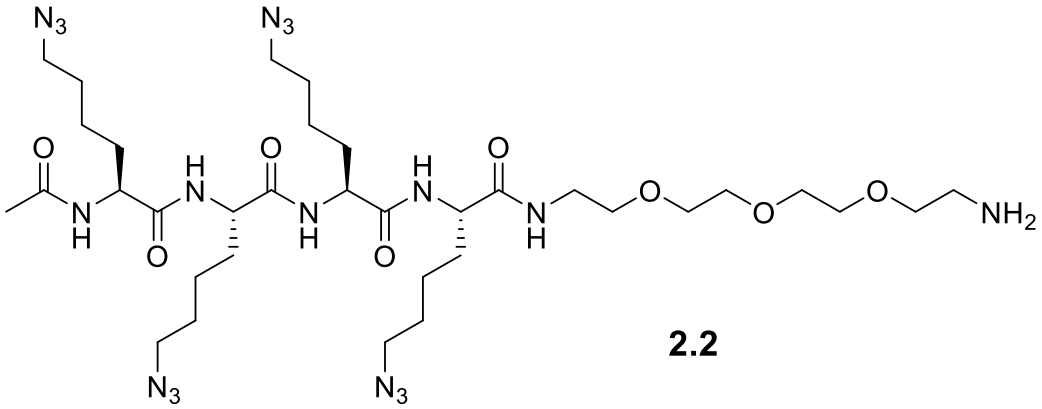
Para el siguiente paso, la resina se hinchó en DMF durante 10 min. La suspensión se filtró y se añadió a la resina una solución de desprotección Fmoc de piperidina al 20 % en DMF. La suspensión se incubó durante 20 min, se filtró y se repitió una vez el procedimiento de desprotección. A continuación, la resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min). La resina se hinchó en DMF durante 10 min, se filtró y se añadió una solución de Fmoc-Lys(N_3)-OH (3 equiv.), TBTU (3 equiv.) y DIPEA (6 equiv.) en DMF. La suspensión se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y el grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % como se ha descrito anteriormente. Para la acetilación, la resina se hinchó en DMF durante 10 min, se filtró la suspensión y se añadió una solución de anhídrido acético (3 equiv.) y piridina (3 equiv.) en DMF. La suspensión se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, se filtró, la resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y se secó *al vacío*.

Para la escisión, la resina se trató con una solución de hexafluoroisopropanol en DCM (1:4, 20 mL) durante 15 min. Se recoge la solución y la resina se trata de nuevo con hexafluoroisopropanol en DCM (1:4, 20 mL). La resina se lava con hexafluoroisopropanol en DCM (1:4) y los filtrados combinados se concentran *al vacío*. El péptido crudo resultante se purificó por RP-HPLC y se obtuvo **Ac-Lys(N_3)-Lys(N_3)-OH** (731 mg, 50 %) como un liofilizado incoloro.



2.1

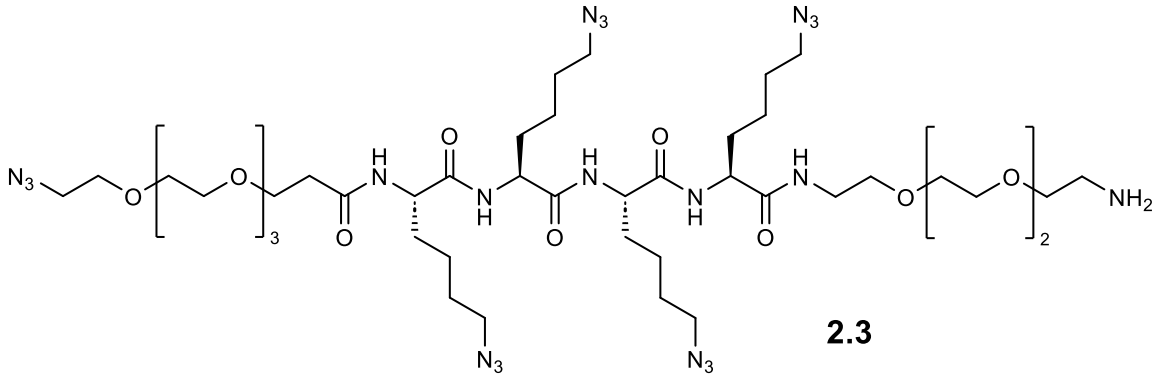
Ac-Lys(N_3)-Lys(N_3)-OH (731 mg, 1,98 mmol, 1 equiv.) y HOBt (910 mg, 5,94 mmol, 3 equiv.) se disolvieron en DMF (8 mL). Se añadió DIC (920 µl, 5,9 mmol, 3 equiv.), se agitó la solución durante 5 min a temperatura ambiente y después se añadió una solución de Boc-Amino-PEG(3)-Amina (CAS-Nr. 101187-40-0, 868 mg, 2,97 mmol, 1,5 equiv.) en DMF (4 mL) seguida de DIPEA (1,04 mL, 5,98 mmol, 3 equiv.). La reacción se agitó a temperatura ambiente y se siguió por RP-HPLC. Después de 20 h, la solución se concentró y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con ácido cítrico 0,2 M (1 x 50 mL), solución de bicarbonato sódico (3 x 50 mL) y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró *al vacío* dando 1,428 g de producto bruto. La purificación por RP-HPLC seguida de liofilización en presencia de HCl (1 equiv.) durante dos veces dio **el intermediario 2.1** (705 mg, 66 %) como HCl-sal. HPLC (método H): t_R= 11,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 543,3 $[M+H]^+$, m/z calculado= 543,3 $[M+H]^+$



2.2

El intermediario 2.**2** se sintetizó como se describió para el intermediario 2.1 pero con dos ciclos más de acoplamiento de Lys(N_3) obteniéndose un tetrapéptido. La purificación por RP-HPLC seguida de liofilización proporcionó **el intermediario 2.2** (139 mg, 37 %) como un

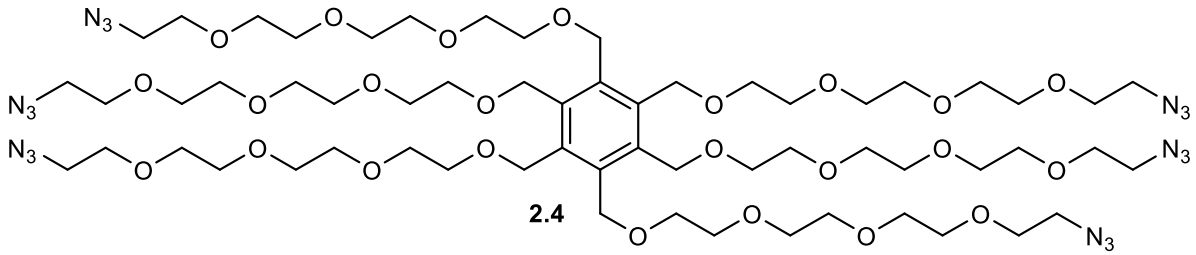
sólido incoloro pegajoso. HPLC (método H): t_R= 9,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 851,6 $[M+H]^+$, m/z calculado= 851,51 $[M+H]^+$



2.3

El intermediario 2.3 se sintetizó como se describió para el intermediario 2.1, pero con dos ciclos más de acoplamiento Lys(N3) para obtener un tetrapéptido y sustituyendo el anhídrido acético por éster azido-dPEG4-NHS [944251-24-5] para el recubrimiento N-terminal. La purificación por RP-HPLC seguida de liofilización proporcionó el intermediario 2.3 como un sólido incoloro pegajoso. HPLC (método A): tR= 10,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1082,67 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1082,63 $[C_{43}H_{80}N_{21}O_{12}]^+$

El intermediario 2.4 se sintetizó en dos pasos:



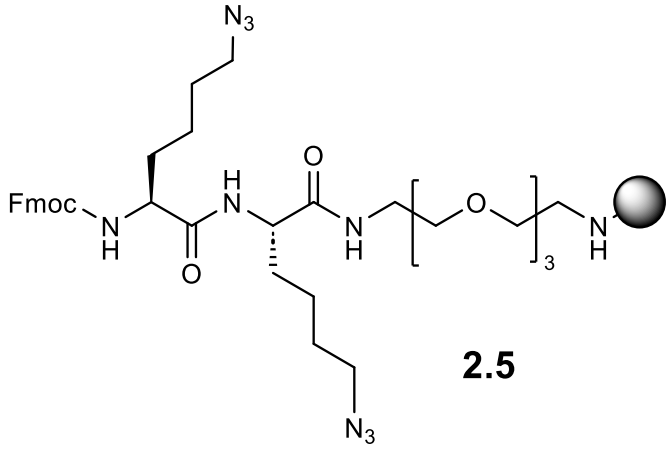
2.4

Paso 1: Bajo atmósfera de argón se lavaron 128 mg (4,06 mmol) de hidruro sódico (suspensión al 60 % en aceite mineral) dos veces con 5 mL de THF seco y se suspendió de nuevo en 5 mL de THF. Se añadió gota a gota una disolución de 653 mg (2901 µmol=8 equiv.) de azido-PEG4-alcohol [CAS 86770-67-4, TCI. A2294] en 5 mL de THF y se agitó a temperatura ambiente hasta que cesó la evolución de gas (15 min). Se añadió hexakis sólido (bromometil) benceno, 231 mg (363 mmol, CAS: 3095-73-6, TCI H0901) en porciones y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se vertió en 20 mL de disolución saturada de cloruro amónico y se diluyó con 20 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se separó y se lavó con 20 mL de salmuera, se secó (MgSO4) y se evaporó a sequedad. El producto crudo se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 0 a 50 % de acetona en hexano dando 392 mg (79 %)

de hexaazida como aceite ligeramente amarillento. MS (ESI): m/z encontrado= 1482,67 $[M+NH\ ]_4^+$, m/z calculado= 1482,81. RMN ^1H (500 MHz, D6-DMSO) δ 4,59 (s, 16H), 3,63 (dd, J= 6,1, 3,7 Hz, 15H), 3,61 - 3,48 (m, 72H), 3,39 - 3,33 (m, 14H). RMN ^{13}C (126 MHz, D6-DMSO) δ 137,25, 69,75, 69,73, 69,70, 69,65, 69,62, 69,45, 69,12, 65,60, 49,93.

Paso 2: El producto del paso 1, 139 mg (95 µmol) se disolvió en 4,5 mL de THF y se añadió trifenilfosfina, 25 mg (95 µmol). Tras la disolución de la fosfina se añadieron 0,5 mL de agua y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche en un recipiente abierto y posteriormente se evaporó a sequedad. El producto crudo se liberó del óxido de trifenilfosfina y de una pequeña cantidad de material de partida sobre gel de sílice con un gradiente de 0 a 10 % de metanol en DCM + 0,1 % de trietilamina. Las fracciones que contenían producto se evaporizaron y purificaron en HPLC prep. para obtener 29,6 mg (20 %) del intermediario 2.4. HPLC (método A) t_R= 11,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1439,75 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1439,80 $[C_{60}H_{111}N_{16}O_{24}]^{2+}$

Intermediario 2.**5**



2.5

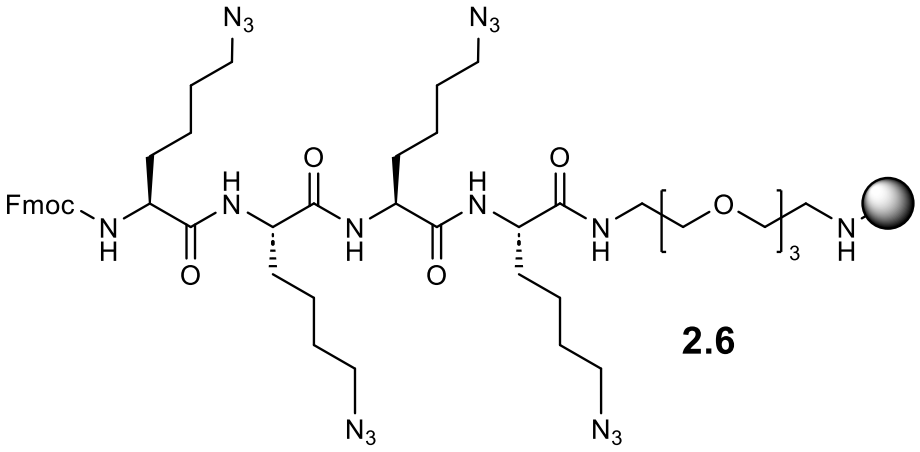
La resina de 2-clorotritilo (1 g) se hinchó durante 10 min en abs. DCM (5 mL). La suspensión se filtró, se añadió una solución de 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano (531 mg, 2,76 mmol, 2 equiv.) en abs. DCM (5 mL) y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró, la resina se lavó con DCM (3 x 1 min) y se añadió la solución de recubrimiento (5 mL, MeOH/DIPEA/DCM 1/1/8) y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Se filtró la suspensión y se repitió una vez el procedimiento de tapado. La resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y se secó *al vacío*.

Para el siguiente paso, la resina se hinchó en DMF durante 10 min. La suspensión se filtró y

se añadió a la resina una solución de desprotección Fmoc de piperidina al 20 % en DMF. La suspensión se incubó durante 20 min, se filtró y se repitió una vez el procedimiento de desprotección. A continuación, la resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min). La resina se hinchó en DMF durante 10 min, se filtró y se añadió una solución de Fmoc-Lys(N_3)-OH (3 equiv.), TBTU (3 equiv.) y DIPEA (6 equiv.) en DMF. La suspensión se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y el grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % como se ha descrito anteriormente. El procedimiento de acoplamiento se repitió con Fmoc-Lys(N_3)-OH adicional (3 equiv.) seguido de lavado con DMF (3 x 1 min) y DCM (3 x 1 min) y secado *al vacío* para dar 1,584 g de intermedio 2,5 cargado en resina. La carga se determinó como se describe en *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 757-762 para dar como resultado un grado de carga de 0,2 mmol/g.

Se realizó una escisión de prueba con 200 mg de resina pisada dos veces con 1 mL de DCM/TFA 95:5 durante 15 min. Las soluciones de escisión se combinaron, evaporaron y purificaron en HPLC prep. para obtener 28 mg de diazida protegida con Fmoc. HPLC (método **AF**): t_R= 17,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 723,4 $[M+H]^+$, m/z calculado= 723,4 $[C_{35}H_{51}N_{10}O_7]^+$

Intermediario 2.**6**



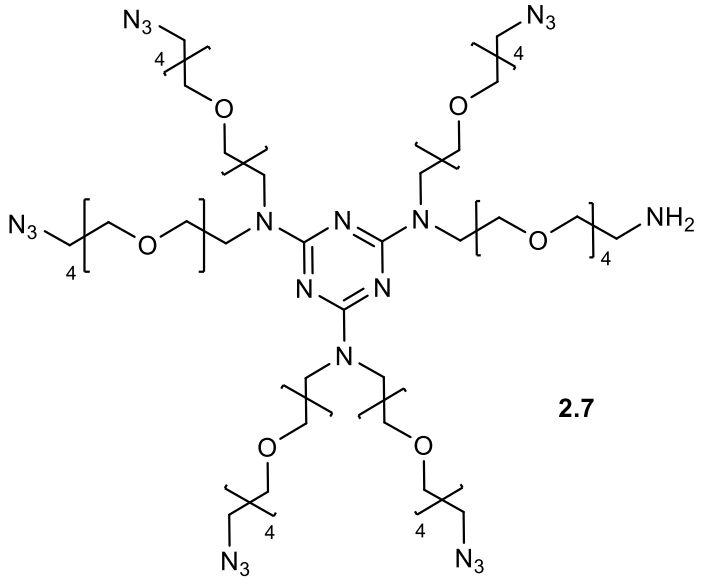
2.6

Repitiendo el procedimiento del intermediario 2.**5** pero con dos pasos de acoplamiento adicionales con Fmoc-Lys(N_3)-OH, se obtuvo resina cargada con el intermediario 2.**6** (1,626 g) con un grado de carga de 0,20 mmol/g.

Se realizó una escisión de prueba con 200 mg de resina que dio como resultado 48,36 mg de tetraazida protegida con Fmoc. HPLC (método **AF**): t_R= 19,9 min. MS (ESI): m/z encontrado=

1031,5 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1031,6 $[C_{47}H_{71}N_{18}O_9]^+$

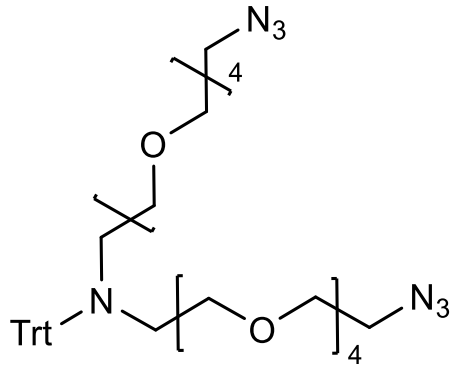
Intermediario **2,7**



2.7

El intermediario 2.**7** se sintetizó en 7 pasos:

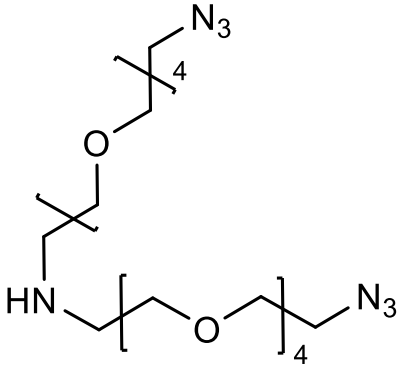
Primer paso:



A una disolución de 2,2'-(trilazanodiil)dietanol (Nº CAS: 23202-47-3, 1,89 g, 5,47 mmol, 1,0 equiv.) en 15 ml de abs. Se añadió hidruro sódico (dispersión al 60% en aceite mineral, 656 mg, 3 equiv.) en porciones y la mezcla se agitó durante 1h hasta que cesó la evolución de gas. Se añadió gota a gota una disolución de azida-PEG4-Tos (Nº CAS: 168640-82-2, 4,50 g, 12,0 mmol, 2,2 equiv.) en 5 ml de DMF y la mezcla se agitó durante una noche seguida de 3 h a 50 °C. A continuación, se apagó la reacción. A continuación, la reacción se apagó con 50 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 6 y la mezcla se extrajo con 75 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó ($MgSO_4$) y se evaporó. El producto crudo se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 0 a 50 % de acetona en hexano para dar como

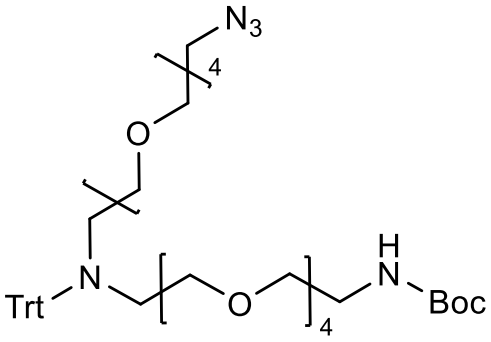
resultado 3,20 g (78 % de rendimiento) del producto del paso 1 como un aceite incoloro. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,55 - 7,45 (m, 5H), 7,26 - 7,20 (m, 5H), 7,17 - 7,10 (m, 3H), 3,67 - 3,58 (m, 28H), 3,55 - 3,50 (m, 4H), 3,37 (dd, *J*= 5,5, 4,6 Hz, 4H), 2,54 (t, *J*= 7,0 Hz, 4H). RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ 143,74, 129,31, 127,52, 125,99, 78,66, 71,20, 70,66, 70,63, 70,60, 70,52, 70,37, 70,00, 52,86, 50,64.

Paso 2:



Al producto del paso 1 (2,16 g, 2,88 mmol) disuelto en 10 ml de DCM/metanol 9:1 se añadieron 500 µl de ácido fórmico y se agitó durante 5 min antes de añadir 10 g de tierra de diatomeas y evaporar todos los volátiles en vacío. El producto se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 0 a 5 % de metanol en DCM con 0,5 % de amoníaco como modificador para obtener 1,325 g (91 %) de producto del paso 2 como aceite incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 508,3 $[M+H]^+$, m/z calculado= 508,3 $[C_{20}H_{42}N_7O_8]^+$ RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO) δ 3,63 - 3,59 (m, 4H), 3,58 - 3,47 (m, 24H), 3,44 (t, *J*= 5,6 Hz, 4H), 3,41 - 3,36 (m, 4H), 3,25 (s, 1H), 2,66 (t, *J*= 5,7 Hz, 4H). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO) δ 70,08, 69,74, 69,71, 69,70, 69,68, 69,62, 69,54, 69,13, 49,94, 48,65.

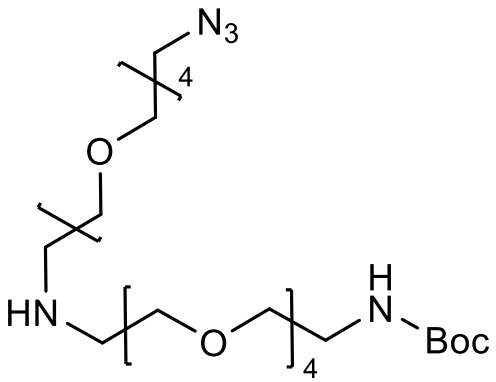
Paso 3:



A una solución del producto de la etapa 1 (1,015 g, 1,355 mmol, 1 equiv.) en 22,5 ml de THF

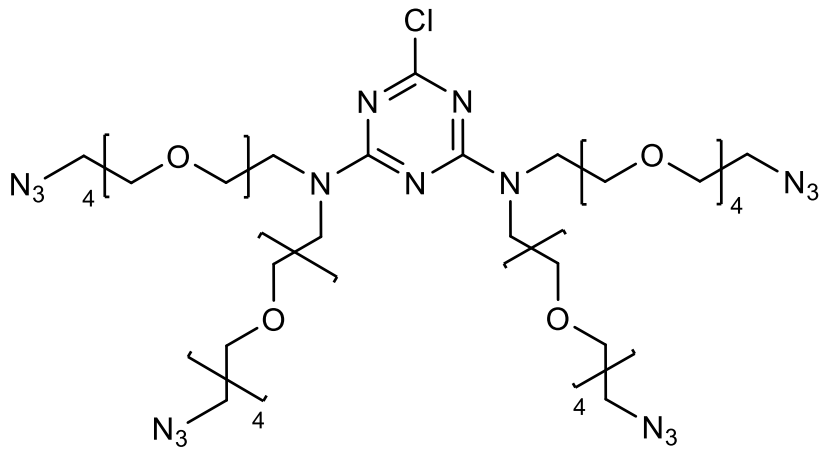
se añadió trifenilfosfina (350 mg, 1 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta la disolución completa de la fosfina. A continuación se añadió agua (2,5 ml), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, tras lo cual se añadieron Diboc (591 mg, 2,71 mmol, 2 equiv.) y DIPEA (461 µl, 2,71 mmol, 2 equiv.) y se agitó durante 1 h, antes de añadir tierra de diatomeas, y se evaporaron los volátiles, y el residuo se secó a fondo en alto vacío. La purificación en gel de sílice con un gradiente de 0 a 37 % de acetona en hexano dio como resultado 502 mg (45 %) del producto del paso 3 como aceite incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 824,0 $[M+H]^+$, m/z calculado= 824,5 $[C_{44}H_{66}N_5O_{10}]^+$ RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,52 - 7,47 (m, 6H), 7,23 (dd, *J*= 8,3, 7,2 Hz, 6H), 7,17 - 7,10 (m, 3H), 5,03 (s, 1H), 3,69 - 3,58 (m, 26H), 3,56 - 3,49 (m, 6H), 3,39 - 3,34 (m, 2H), 3,30 (d, *J*= 5,5 Hz, 2H), 2,54 (t, *J*= 7,0 Hz, 4H), 1,44 (s, 9H). RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ 155,97, 143,73, 129,31, 127,53, 126,00, 79,12, 78,66, 71,20, 70,67, 70,63, 70,60, 70,55, 70,53, 70,49, 70,37, 70,21, 70,19, 70,01, 52,85, 50,64, 40,32, 28,41.

Paso 4:



Aplicando el procedimiento del paso 2, al producto del paso 3, se obtuvieron 342 mg (91 %) del producto del paso 4 como aceite incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 582,4 $[M+H]^+$, m/z calculado= 582,4 $[C_{25}H_{52}N_5O_{10}]^+$ RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5,12 (s, 1H), 3,72 - 3,58 (m, 31H), 3,54 (t, *J*= 5,2 Hz, 2H), 3,42 - 3,37 (m, 2H), 3,32 (q, *J*= 5,4 Hz, 2H), 2,83 (t, *J*= 5,4 Hz, 4H), 1,44 (s, 9H). RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ 156,00, 79,09, 70,67, 70,63, 70,60, 70,54, 70,50, 70,48, 70,32, 70,21, 70,01, 50,64, 49,14, 40,31, 28,40.

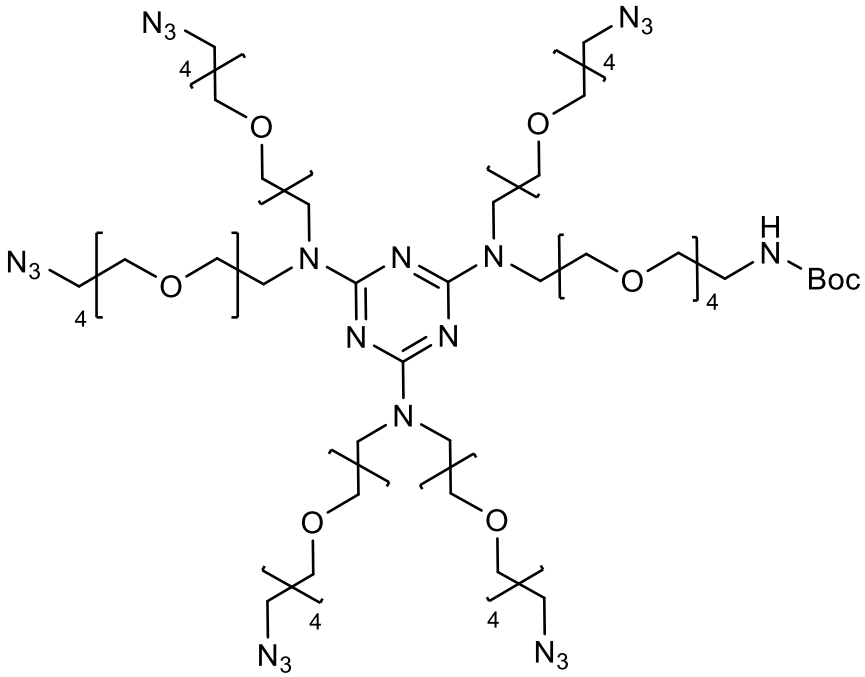
Paso 5:



El ácido cianúrico (86 mg, 0,467 mmol, 1,0 equiv.) y la DIPEA (1,675 ml, 9,85 mmol, 21 equiv.) se disolvieron en 15 ml de acetonitrilo y la mezcla se añadió al producto del paso 2 (500 mg, 0,985 mmol, 2,1 equiv.) y se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 h se añadió acetato de etilo y el acetonitrilo se evaporó al vacío. La fase acuosa restante se extrajo dos veces con acetato de etilo (20 ml cada una) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO4) y se evaporaron a sequedad.

El producto crudo se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 0 a 50 % de acetona en hexano para obtener 403 mg (77 %) del producto del paso 5 como aceite incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 1126,6 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1126,6 $[C_{43}H_{81}ClN_{17}O_{16}]^+$. RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3,78 (t, *J*= 5,7 Hz, 4H), 3,73 (t, *J*= 5,9 Hz, 4H), 3,69 - 3,56 (m, 64H), 3,44 - 3,34 (m, 8H). RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ 168,80, 164,53, 70,64, 70,63, 70,61, 70,58, 70,57, 70,55, 70,54, 70,51, 70,25, 70,00, 69,26, 68,88, 50,62, 48,12, 47,77.

Paso 6:

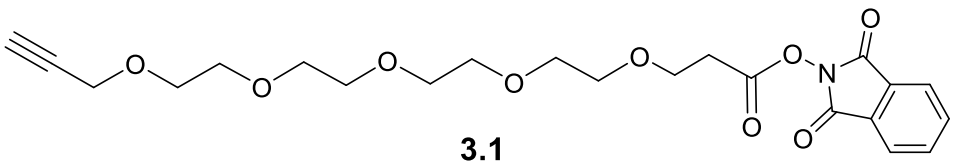


El producto del paso 6 (145 mg, 129 µmol, 1,0 equiv.) y el producto del paso 4 (151 mg, 258 µmol, 2,0 equiv.) se disolvieron en 4,5 ml de acetonitrilo, se añadió DIPEA (217 µl. 1,29 µmol, 10 equiv.) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 d. Después de enfriar, se añadió suficiente tierra de diatomeas para empapar toda la mezcla de reacción, se evaporaron todos los volátiles y el resto se secó a alto vacío. El producto crudo se purificó sobre gel de sílice con un gradiente de 0 a 50 % de acetona en hexano para obtener 161 mg (75 %) del producto del paso 7 como aceite incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 1671,9 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1672,0 $[C_{68}H_{131}N_{22}O_{26}]^+$.

Paso 7:

El producto del paso 6 (57 mg, 34 µM) se disolvió en 250 µl de DCM y se añadieron 57 µl de ácido trifluoroacético. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche antes de la evaporación de los volátiles. El producto crudo se purificó por HPLC prep. para obtener 40 mg (70 %) **del intermediario 2.7** como aceite incoloro. HPLC (método **A**): t_R = 9,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1571,9 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1571,9 $[C_{63}H_{123}N_{22}O_{24}]^+$.

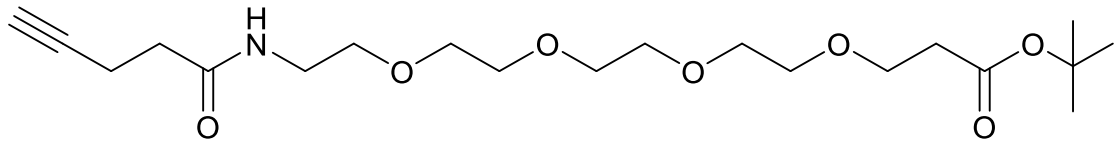
<u>Ejemplo 1.4- Síntesis del intermediario 3.1</u>



3.1

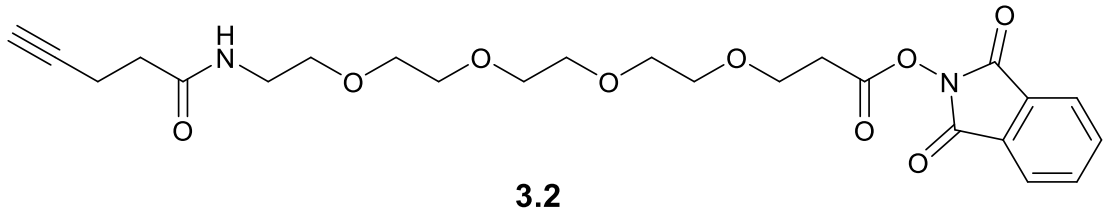
Se añadieron EDC x HCl (485,8 mg, 2,53 mmol, 1,3 equiv.) y DIPEA (1,09 mL, 6,24 mmol, 3,2 equiv.) a una disolución de Propargil-PEG(5)-ácido (CAS-Nr. 1245823-51-1, 593,1 mg, 1,94 mmol, 1 equiv.) en abs. THF (8,9 mL). Una disolución *de* N-hidroxiftalimida (413,4 mg, 2,53 mmol, 1,3 equiv.) en abs. THF (8,9 mL) durante 10 minutos. La reacción se agitó a temperatura ambiente y se controló por TLC y RP-HPLC. Después de 21 h, la solución se diluyó con acetato de etilo (60 mL) y la capa orgánica se lavó con HCl 1N (30 mL), solución de bicarbonato sódico (30 mL) y salmuera (30 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró *al vacío*. El producto crudo resultante (724,7 mg) se purificó por cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de n-hexano a acetato de etilo. **El intermediario 3.1** (457,3 mg, 52 %) se obtuvo como aceite amarillento. $C_{22}H_{27}NO_9$ RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 7,89 (dd, J= 5,5, 3,1 Hz, 2H), 7,80 (dd, J= 5,5, 3,1 Hz, 2H), 4,21 (d, J= 2,3 Hz, 2H), 3,89 (t, J= 6,4 Hz, 2H), 3,73 - 3,63 (m, 17H), 2,97 (t, J= 6,4 Hz, 2H), 2,44 (t, J= 2,4 Hz, 1H). RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 167,65, 161,73, 134,73, 128,82, 123,92, 79,61, 74,48, 70,69, 70,58, 70,54, 70,53, 70,49, 70,46, 70,33, 69,04, 65,76, 58,33, 32,14. HPLC (método **I**): t_R= 11,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 472,2 $[M+Na]^+$, m/z calculado= 472,2 $[M+Na]^+$.

<u>Ejemplo 1.5 - Síntesis del intermediario 3.2</u>



A una solución de ácido pent-4-inoico (2 g, 20,4 mmol, 1,05 equiv.) en DMF (40 mL) se añadieron HATU (11,64 g, 30,6 mmol, 1,6 equiv.) y DIPEA (10,7 mL, 61,2 mmol) a 5 °C y la solución resultante se agitó durante 10 min a 5 °C. A continuación, se añadió gota a gota una solución de 1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato *de terc-butilo* (6,24 g, 19,4 mmol, 1 equiv.) en DMF (10 mL) y se dejó que la solución resultante se calentara hasta temperatura ambiente. Después de 2 h, la solución se concentró *al vacío* y el residuo se recogió en acetato de etilo (300 mL). La capa orgánica se lavó con ácido cítrico 0,2 M (150 mL), solución saturada de bicarbonato sódico (150 mL) y salmuera (150 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró *al vacío*. La purificación por cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de hexano a acetona proporcionó 1-(pent-4-inamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato *de terc-butilo* (8,20 g, cuant.). $C_{20}H_{35}NO_7$. HPLC

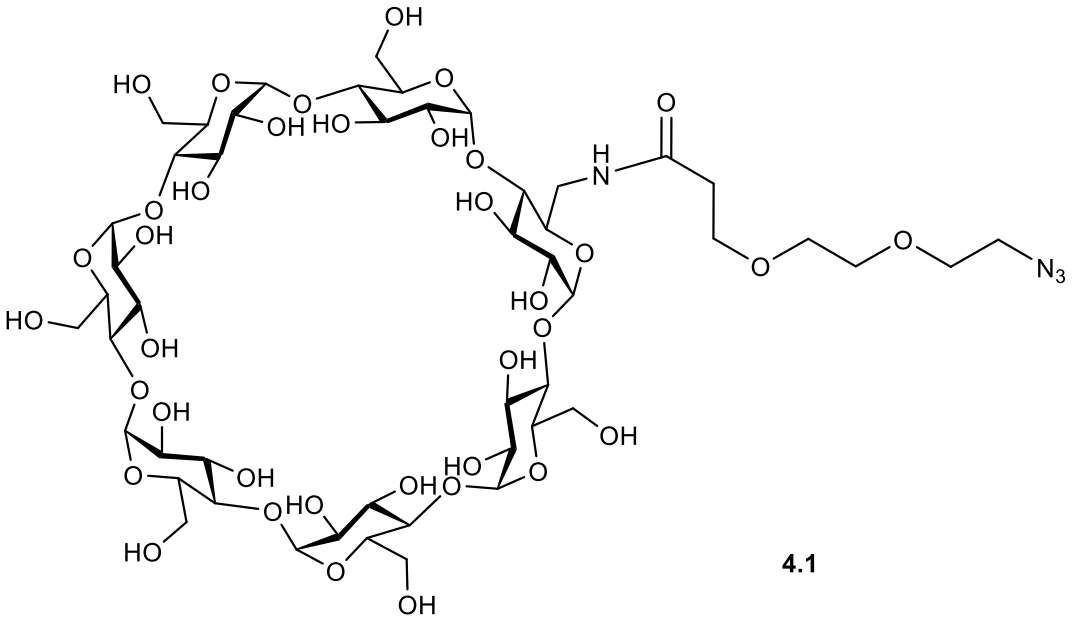
(método **A**): t_R= 10,6 min. MS (ESI): m/z encontrado= 424,4 $[M+Na]^+$, m/z calculado= 424,2 [M+Na]+



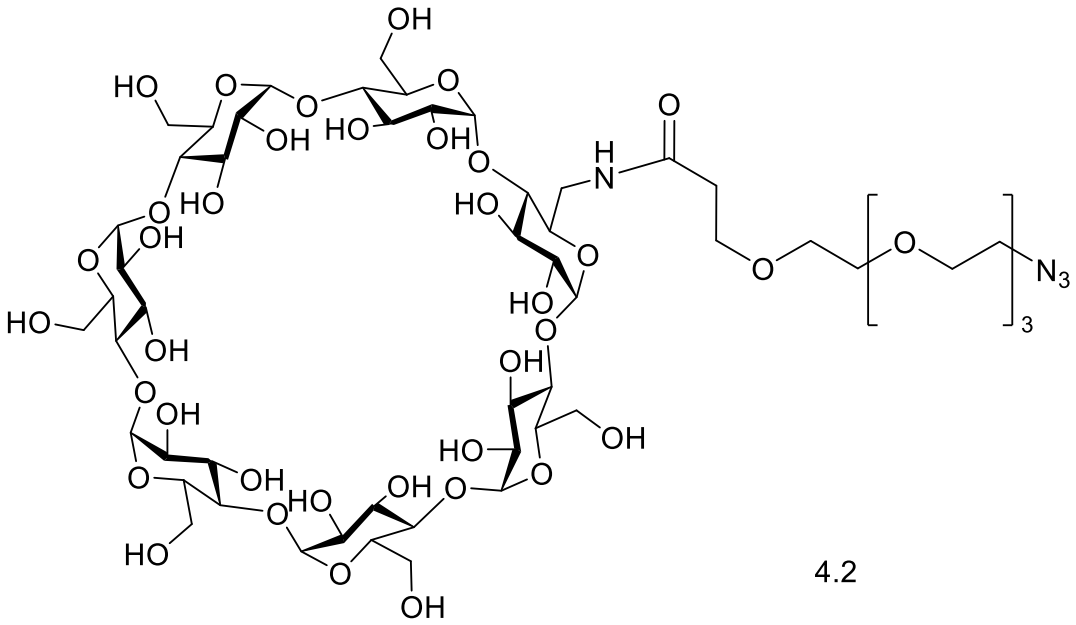
3.2

El 1-(pent-4-inamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato *de terc-butilo* (8,20 g, máx. 19,4 mmol, 1 equiv.) se disolvió en TFA (15,6 mL) y se agitó durante 1 h a 300 mbar. El TFA se eliminó *al vacío* y el residuo se coevaporó dos veces con tolueno. El residuo obtenido se disolvió en THF (abs., 50 mL) y se añadieron clorhidrato de *N-etil-N'-carbodiimida* (4,66 g, 24,3 mmol, 1,25 equiv.) así como DIPEA (11 mL, 63 mmol, 3,25 mmol). A continuación, se añadió gota a gota una solución de N-hidroxiftalimida (3,96 g, 24,3 mmol, 1,25 equiv.) en THF (abs., 50 mL) y la solución rojiza resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo (400 mL) y la capa orgánica se lavó con HCl 2N (100 mL), solución saturada de bicarbonato sódico (100 mL) y salmuera (100 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró *al vacío*. La purificación por cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de diclorometano a acetona proporcionó **el intermediario 3.2** (4,96 g, 52 %) como aceite amarillento. $C_{24}H_{30}N_2O_9$. RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d6): δ (ppm)= 8,01 - 7,89 (m, 4H), 7,87 (s, 1H), 3,77 (t, *J*= 6,0 Hz, 2H), 3,63 - 3,46 (m, 12H), 3,40 (t, *J*= 5,9 Hz, 2H), 3,20 (q, *J*= 5,8 Hz, 2H), 3,01 (t, *J*= 6,0 Hz, 2H), 2,70 (t, *J*= 2,6 Hz, 1H), 2,39 - 2,31 (m, 2H), 2,31 - 2,23 (m, 2H). RMN ^{13} C (126 MHz, DMSO-d6): δ (ppm)= 170,18, 168,21, 161,61, 135,39, 128,10, 123,85, 83,65, 71,00, 69,73, 69,68, 69,62, 69,60, 69,50, 69,01, 65,18, 38,50, 34,02, 31,55, 14,09. HPLC (método **A**): t_R= 10,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 491,4 $[M+H]^+$, m/z calculado= 491,2 [M+H]+

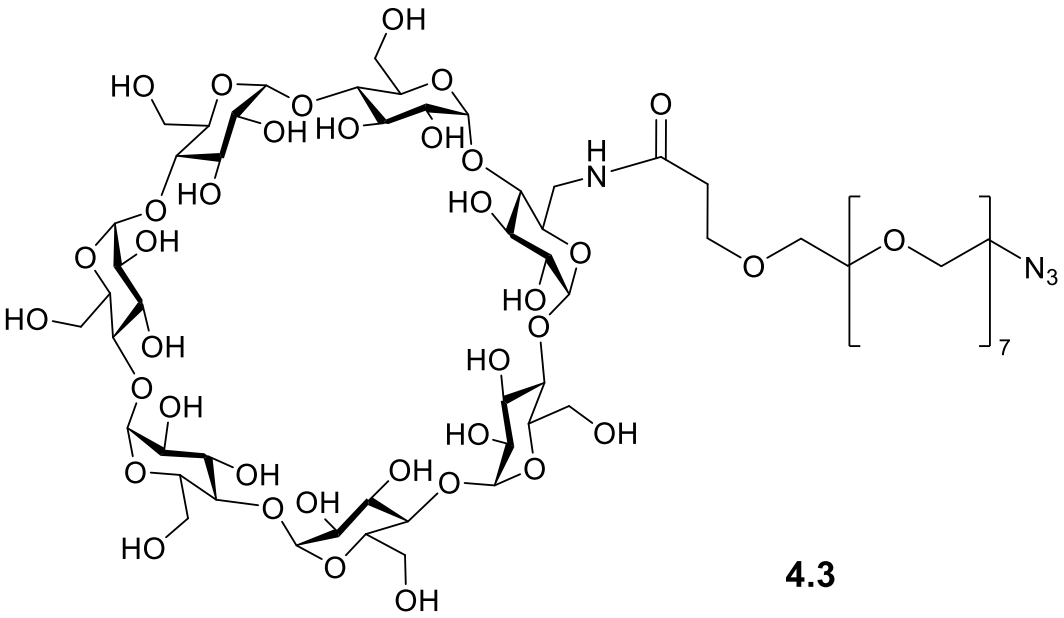
Ejemplo 1.6 - Síntesis de los intermediarios 4.x (N -PEG$_{3n}$ -beta/gamma-CD)



El intermediario 4.1 se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(2)-NHS y 6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina. El producto crudo obtenido se utilizó sin purificación adicional.

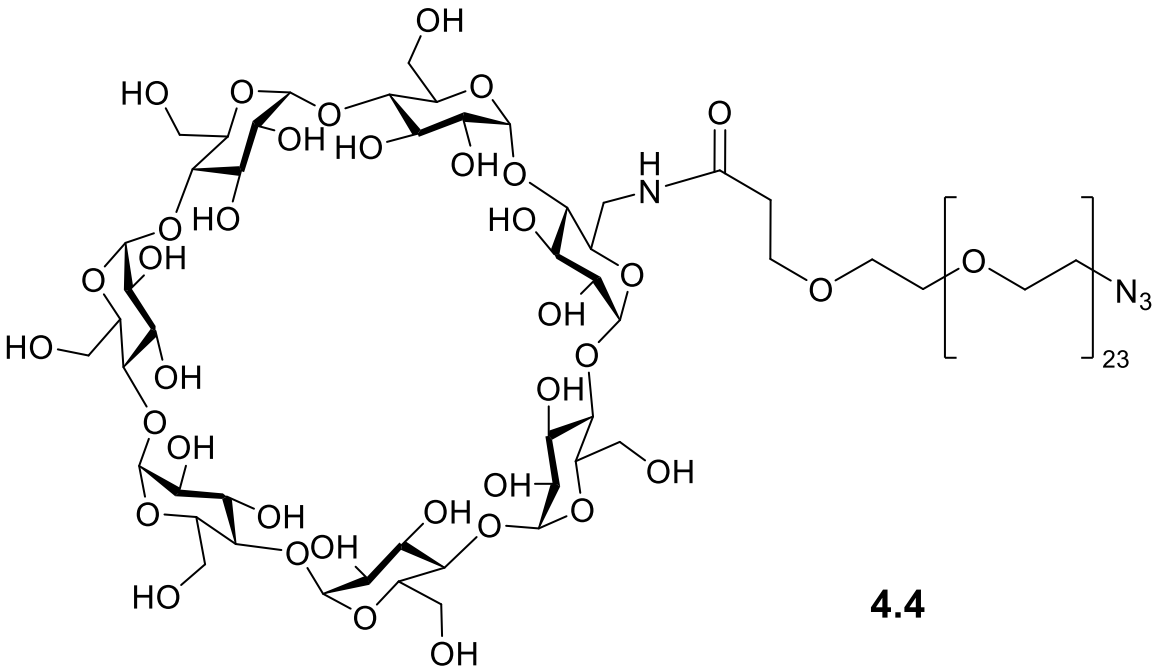


El intermediario 4.2 se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(4)-NHS y 6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina. El producto crudo obtenido se utilizó sin purificación adicional.



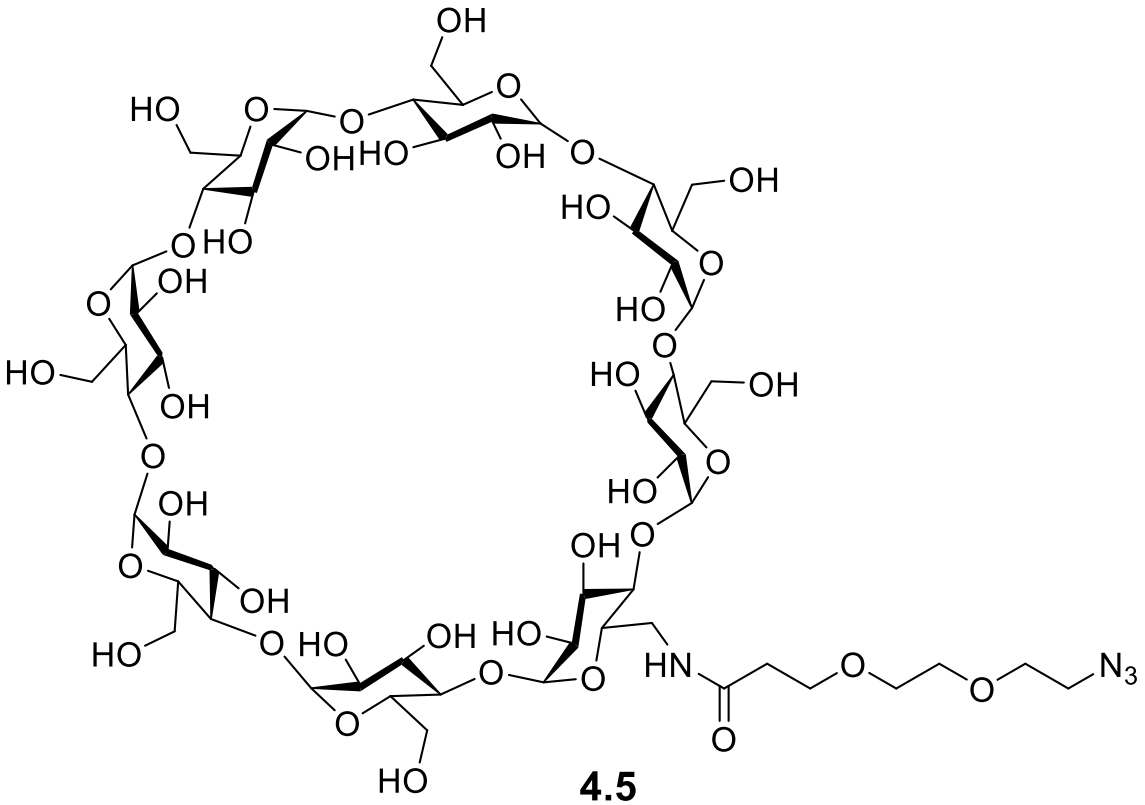
4.3

El intermediario 4.3 se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(8)-NHS y 6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina. El producto crudo obtenido se utilizó sin purificación adicional.

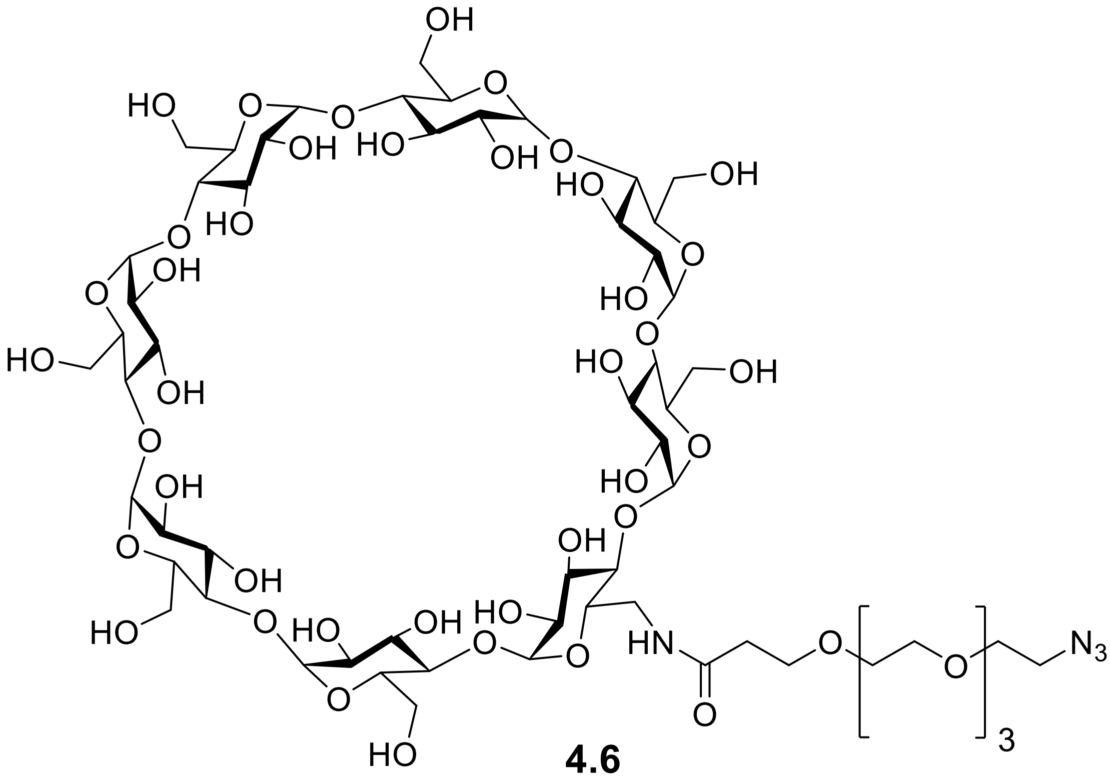


4.4

El intermediario 4.4 se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(24)-NHS y 6-amino-6-deoxi-beta-ciclodextrina. El producto crudo obtenido se utilizó sin purificación adicional.

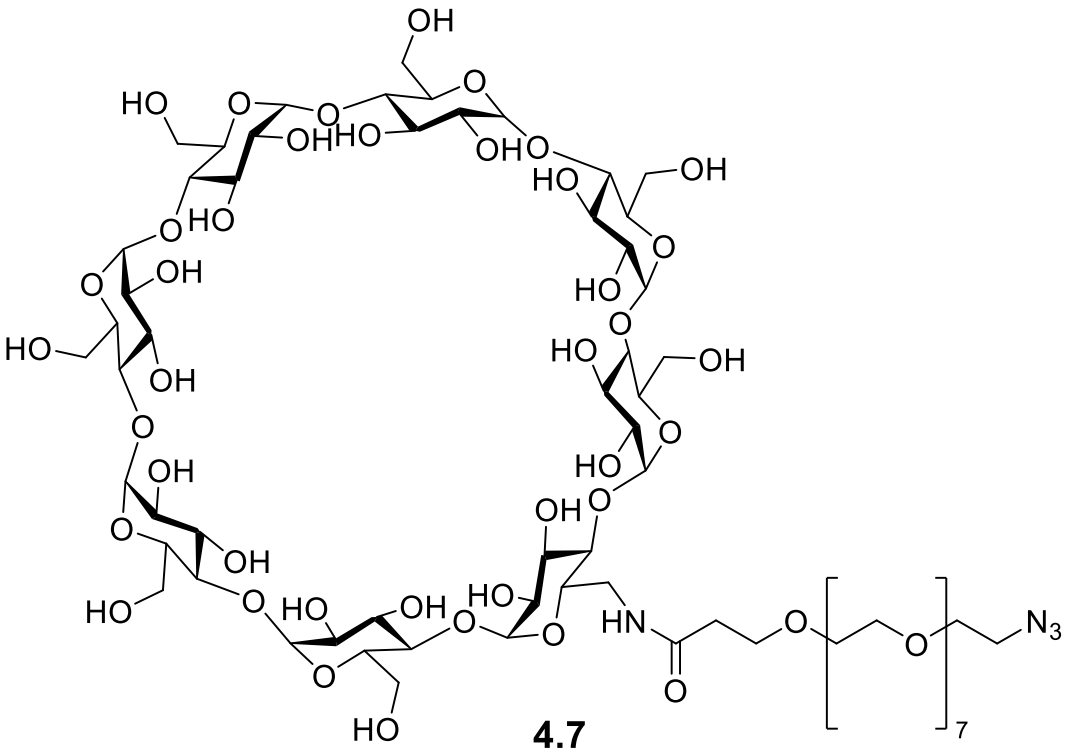


El intermediario 4.5 se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(2)-NHS y 6-amino-6-deoxi-gamma-ciclodextrina. El producto crudo obtenido se utilizó sin purificación adicional.

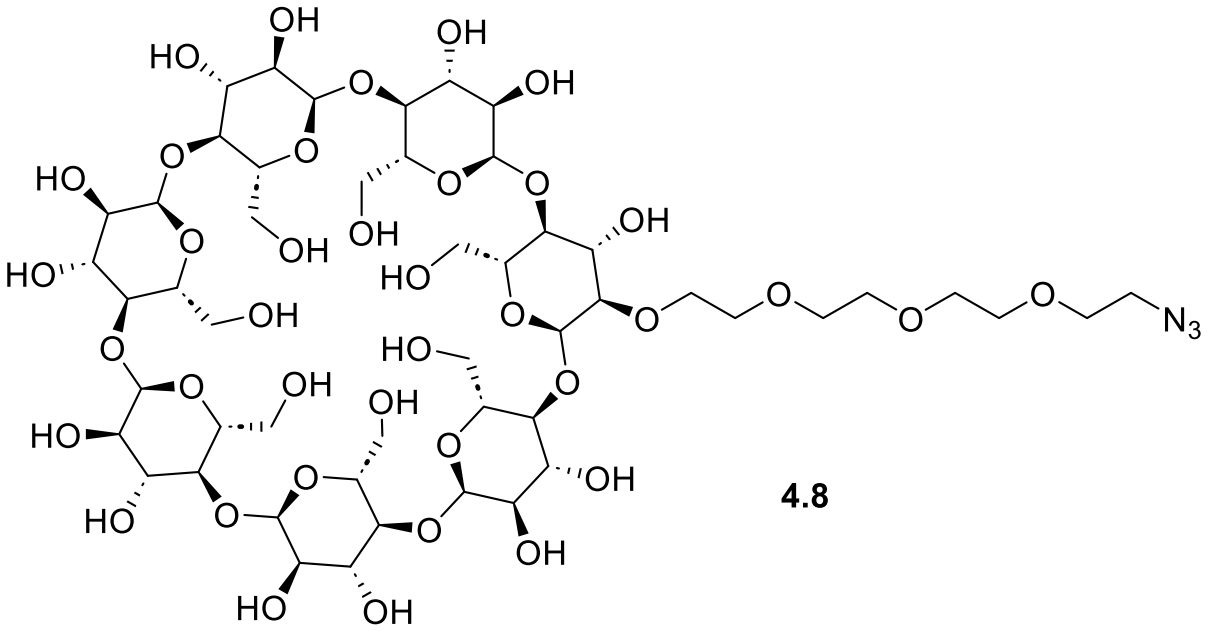


4.6

El intermediario 4.6 se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(4)-NHS y 6-amino-6-deoxi-gamma-ciclodextrina. El producto crudo obtenido se utilizó sin purificación adicional.---

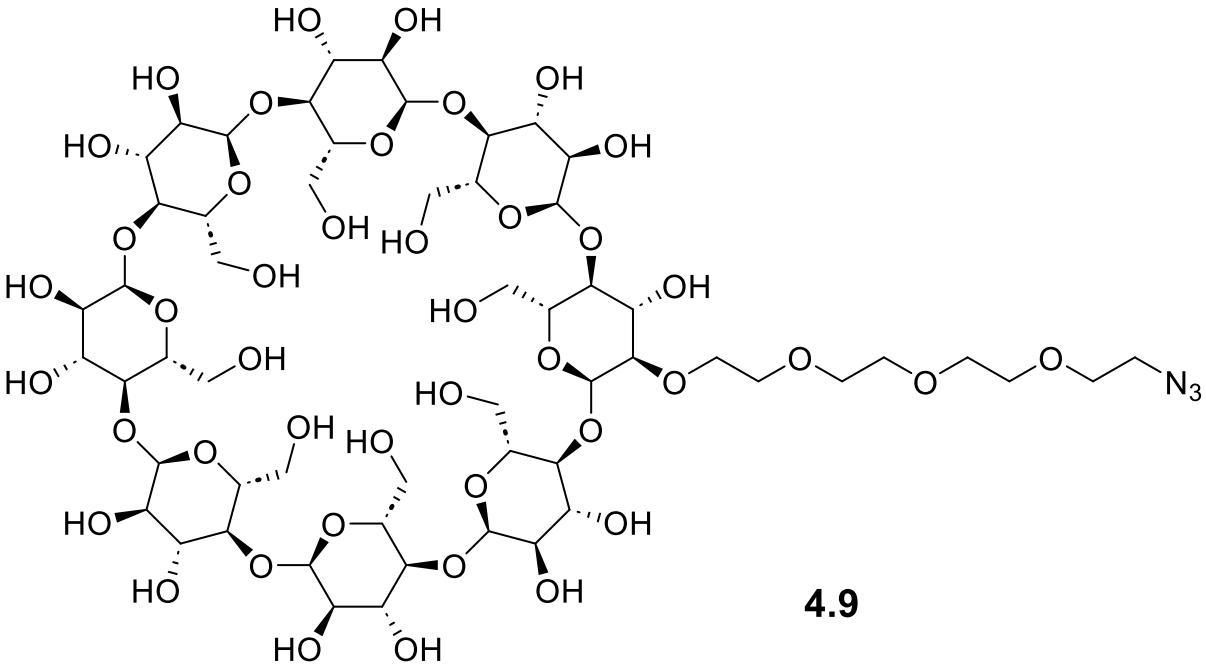


El intermediario 4.7 se sintetizó según el GP5 utilizando éster azido-PEG(8)-NHS y 6-amino-6-deoxi-gamma-ciclodextrina. El producto crudo obtenido se utilizó sin purificación adicional.



La beta-ciclodextrina (2,000 g. 1,762 mmol) se coevaporó dos veces con 30 mL de DMSO seco (abs.) y se volvió a disolver en 30 mL de DMSO. Se añadió hidruro de litio (21 mg, 2,643

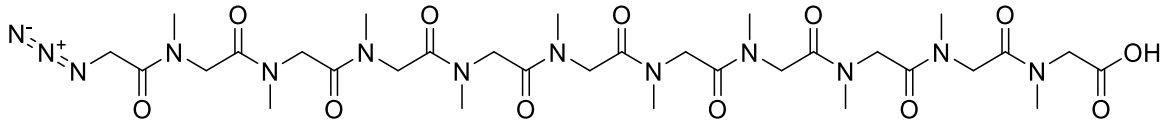
mmol, 1,5 equiv.) y la suspensión se agitó bajo atmósfera de Argón durante 15 h. Posteriormente, se añadió 1-azido-2-{2-[2-(2-bromoetoxi)etoxi]etoxi}etano (497 mg, 1,762 mmol, 1,0 equiv.) disuelto en 2 mL de DMSO (abs.), se añadió yoduro de litio (24 mg, 176 µmol, 0,1 equiv.) y la mezcla se agitó a 55 °C durante 7,5 h y después a temperatura ambiente. Después de que la TLC (acetonitrilo/agua/conc. amoniaco 6:3:1) indicara que no había más conversión, la mezcla se concentró *al vacío* hasta aproximadamente 6 mL y el resto se añadió gota a gota a 160 mL de acetona enfriada con hielo. El precipitado resultante se aisló por centrifugación, se resuspendió en 120 mL de acetona fría por sonificación y se centrifugó de nuevo. Tras secar *al vacío*, el sólido se absorbió en 5 mL de agua, la beta-ciclodextrina insoluble se eliminó por filtración y el filtrado se liofilizó. El producto crudo (2,263 g) se acidificó a pH 2 con ácido trifluoroacético y se purificó por prep. RP-HPLC para obtener 532 mg (23 %) de **intermediario 4.8** puro como un liofilizado incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 1336,8 $[M+H]^+$, m/z calculado= : 1336,5 $[M+H]^+$



4.9

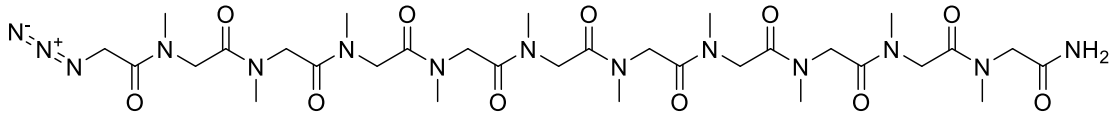
El intermediario 4.9 se sintetizó según **el intermediario 4.8** utilizando gamma-ciclodextrina. El producto objetivo se obtuvo en un 22% de rendimiento como un liofilizado incoloro. MS (ESI): m/z encontrado= 1498,9 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1498,5 [M+H]+

<u>Ejemplo 1.7 - Síntesis de los intermediarios 5.1 y 2</u>



5.1

El intermediario 5.1 se sintetizó según los documentos WO2019081455 y WO2022207699 utilizando resina Wang cargada con Fmoc-Sar, Fmoc-Sar-Sar-OH, Fmoc-Sar-OH y ácido azidoacético para el recubrimiento *N-terminal*. La desprotección con Fmoc se realizó con piperidina al 20 % en DMF durante 15 min (dos veces). El acoplamiento de aminoácidos se realizó con aminoácido (3 equiv.), HATU (2,9 equiv.) y DIPEA (6 equiv.) en DMF. La separación de la resina se realizó con TFA puro (10 mL/g de resina) seguido de precipitación con metil *terc-butil* éter helado y purificación por RP-HPLC. **El intermediario 5.1** (166,7 mg, 41 %) se obtuvo como un sólido incoloro. $C_{32}H_{53}N_{13}O_{12}$. HPLC (método H): t_R= 7,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 834,2 $[M+Na]^+$, m/z calculado= 834,4 [M+Na]+

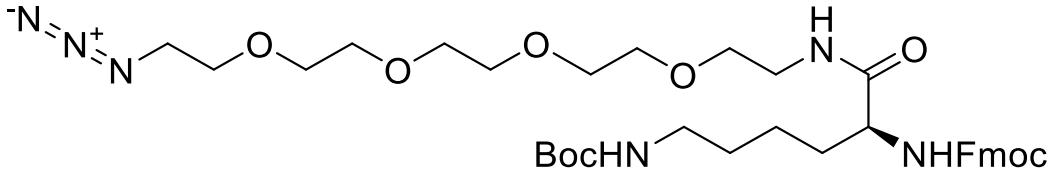


5.2

El intermediario 5.2 se sintetizó según los documentos WO2019081455 y WO2022207699 utilizando resina NovaGel Rink-Amide cargada con Fmoc-Sar, Fmoc-Sar-Sar-OH, Fmoc-Sar-OH y ácido azidoacético para el recubrimiento *N-terminal*. La desprotección con Fmoc se realizó con piperidina al 20 % en DMF durante 15 min (dos veces). El acoplamiento de aminoácidos se realizó con aminoácido (3 equiv.), HATU (2,9 equiv.) y DIPEA (6 equiv.) en DMF. La separación de la resina se realizó con TFA/TIS 95/5 (10 mL/g de resina) seguida de precipitación con *metil-terc-butil* éter helado y purificación por RP-HPLC. **El intermediario 5.2** (83,6 mg, 54 %) se obtuvo como un sólido incoloro. $C_{32}H_{54}N_{14}O_{11}$ HPLC (método K): t_R= 7,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 811,5 $[M+H]^+$, m/z calculado= 811,4 $[M+H]^+$

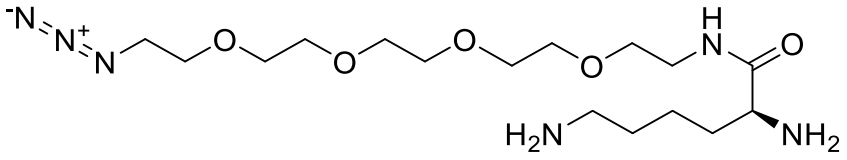
<u>Ejemplo 1.8 - Síntesis de los intermediarios 6.1-4</u>

Síntesis del intermediario 6.1



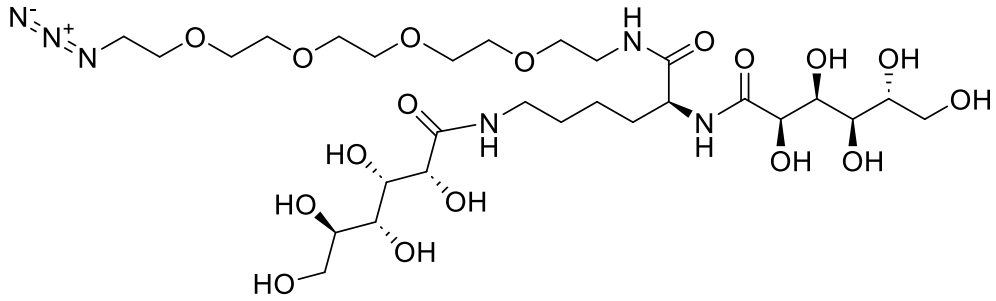
Fmoc-Lys(Boc)-NH-PEG4-N_3

A una disolución de Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,056 g, 6,5 mmol, 1 equiv.) en DMF (30 mL) se añadieron TBTU (2,467 g, 7,8 mmol, 1,2 equiv.) y DIPEA (1,33 mL, 7,8 mmol, 1,2 equiv.) y la disolución resultante se mezcló durante 1 min. A continuación, se añadió la solución de aminoácidos preactivada a una solución de 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amina (1,680 g, 6,5 mmol, 1 equiv.) en DMF (10 mL) y la solución resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió agua (5 mL) y la solución se evaporó *al vacío*. El residuo se disolvió en acetato de etilo (100 mL) y la capa orgánica se lavó con solución acuosa 0,2 M de ácido cítrico (50 mL), solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (50 mL) y salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se evaporó *al vacío*. La purificación mediante cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de MTBE a acetona proporcionó **Fmoc-Lys(Boc)-NH-PEG4-N_3** (3,545 g, 76 %) como un sólido incoloro y pegajoso. $C_{36}H_{52}N_6O_9$ RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d6): δ (ppm)= 7,88 (dt, J= 7,7, 0,9 Hz, 2H), 7,82 (t, J= 5,7 Hz, 1H), 7,76 - 7,68 (m, 2H), 7,42 (td, J= 7,5, 1,0 Hz, 2H), 7,33 (tt, J= 7,4, 1,2 Hz, 3H), 6,68 (s, 1H), 4,30 - 4,18 (m, 3H), 3,93 (td, J= 8,6, 5,2 Hz, 1H), 3,62 - 3,56 (m, 2H), 3,55 - 3,48 (m, 12H), 3,41 (t, J= 6,0 Hz, 2H), 3,37 (dd, J= 5,6, 4,4 Hz, 2H), 3,21 (ddt, J= 19,6, 13,6, 7,6 Hz, 2H), 2,89 (q, J= 10,3, 8,3 Hz, 2H), 1,69 - 1,43 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,24 (s, 4H). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO-d6): δ (ppm)= 171,86, 155,78, 155,45, 143,79, 143,70, 140,60, 127,49, 126,92, 125,17, 119,95, 77,21, 69,71, 69,69, 69,67, 69,63, 69,60, 69,48, 69,11, 68,88, 65,50, 54,56, 49,93, 46,62, 38,47, 31,63, 29,08, 28,16, 22,69. HPLC (método A): t_R= 14,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 735,4 $[M+Na]^+$, m/z calculado= 735,4 $[M+Na]^+$



Lys-NH-PEG4-N_3

A una disolución de Fmoc-Lys(Boc)-NH-PEG4-N_3 (2,00 g, 2,8 mmol, 1 equiv.) en DMF (20 mL) se añadió dietilamina (5,00 mL, 56,1 mmol, 17 equiv.) y la disolución resultante se agitó durante 30 min a 600 mbar a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *al vacío* y la purificación mediante cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de diclorometano a diclorometano/MeOH/conc. amoniaco (9:1:0,1) proporcionó el intermediario desprotegido con Fmoc H-Lys(Boc)-NH-PEG4-N_3 (1,182 g, 86 %) como aceite incoloro. Como paso siguiente, a una disolución de H-Lys(Boc)-NH-PEG4-N_3 (1,163 g, 2,4 mmol, 1 equiv.) en 1,4-dioxano (20 mL) se añadió HCl 1M (11,85 mL, 11,8 mmol, 5 equiv.) y se agitó durante 10 min a 600 mbar a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *al vacío*, el residuo se disolvió en HCl 1M (11,85 mL, 11,8 mmol, 5 equiv.) y se agitó durante 10 min a 600 mbar a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *al vacío* y se coevaporó adicionalmente dos veces con 1,4-dioxano. Se obtuvo **Lys-NH-PEG4-N_3** (1,119 g, cuant.) como aceite incoloro muy viscoso. $C_{16}H_{34}N_6O_5$. RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d6): δ (ppm)= 8,67 (t, J= 5,6 Hz, 1H), 8,32 (s, 3H), 8,11 (s, 3H), 3,78 - 3,72 (m, 1H), 3,61 - 3,58 (m, 2H), 3,59 - 3,47 (m, 12H), 3,45 (t, J= 5,9 Hz, 2H), 3,38 (dd, J= 5,5, 4,4 Hz, 2H), 3,28 (d, J= 5,9 Hz, 1H), 3,23 (dq, J= 13,7, 5,8 Hz, 1H), 2,73 (d, J= 8,7 Hz, 2H), 1,73 (qd, J= 7,3 Hz, 2H), 1,59 (qd, J= 8,5, 7,8, 6,0 Hz, 2H), 1,42 - 1,33 (m, 2H). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO-d6): δ (ppm)= 168,43, 69,74, 69,70, 69,66, 69,62, 69,49, 69,13, 68,63, 51,78, 49,97, 38,66, 38,11, 30,18, 26,08, 20,97. HPLC (método H): t_R= 6,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 391,3 $[M+H]^+$, m/z calculado= 391,3 $[M+H]^+$

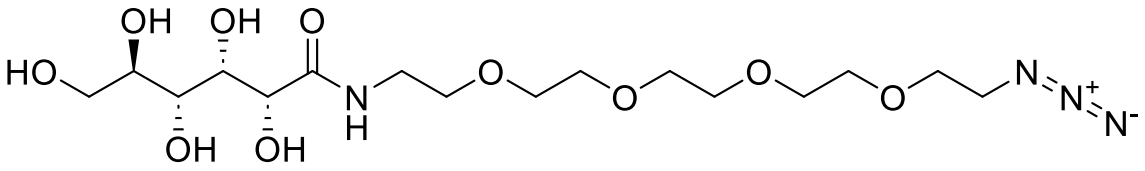


6.1

A una solución de Lys-NH-PEG4-N_3 (500 mg, 1,1 mmol, 1 equiv.) en DMF (10 mL) se añadieron D-Glucono-1,5-lactona (481 mg, 2,7 mmol, 2,5 equiv.) y DIPEA (917 µL, 5,4 mmol, 5,0 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 15 h a temperatura ambiente seguidas de 1 h a 80 °C. Después de 16,5 h de tiempo de reacción en total, D-Glucono-1,5-lactona (481 mg, 2,7 mmol, 2,5 equiv.) y DIPEA (917 µL, 5,4 mmol, 5,0 equiv.). Después de 21 h de

reacción en total, el disolvente se eliminó *al vacío* y el residuo se coevaporó con una mezcla de metanol (10 mL) y DIPEA (917 µL) seguida de coevaporación con metanol (10 mL). El producto crudo se precipitó en MTBE helado. La purificación por HPLC preparativa proporcionó **el intermediario 6.1** (294 mg, 36 %) como un sólido incoloro de aspecto vítreo. $C_{28}H_{54}N_6O_{17}$. RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d6): δ (ppm)= 7,90 (t, J= 5,7 Hz, 1H), 7,61 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,53 (t, J= 5,9 Hz, 1H), 4,41 (s, 10H), 4,22 (td, J= 8,4, 5,0 Hz, 2H), 4,06 (d, J= 3,5 Hz, 1H), 3,97 (d, J= 3,7 Hz, 1H), 3,93 - 3,86 (m, 3H), 3,62 - 3,56 (m, 4H), 3,56 - 3,43 (m, 14H), 3,43 - 3,35 (m, 4H), 3,20 (qd, J= 6,0, 3,5 Hz, 4H), 3,05 (dp, J= 13,9, 6,9 Hz, 2H), 1,73 - 1,64 (m, 1H), 1,56 (tdd, J= 13,5, 9,4, 5,3 Hz, 1H), 1,45 - 1,33 (m, 2H), 1,23 (s, 2H). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO-d6): δ (ppm)= 172,28, 172,17, 171,28, 73,50, 73,32, 72,36, 72,16, 71,46, 70,42, 70,10, 69,72, 69,64, 69,50, 69,14, 68,75, 63,29, 63,24, 51,99, 49,97, 38,52, 38,08, 31,75, 28,77, 22,46. HPLC (método M): t_R= 13,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 747,4 $[M+H]^+$, m/z calculado= 747,4 $[M+H]^+$

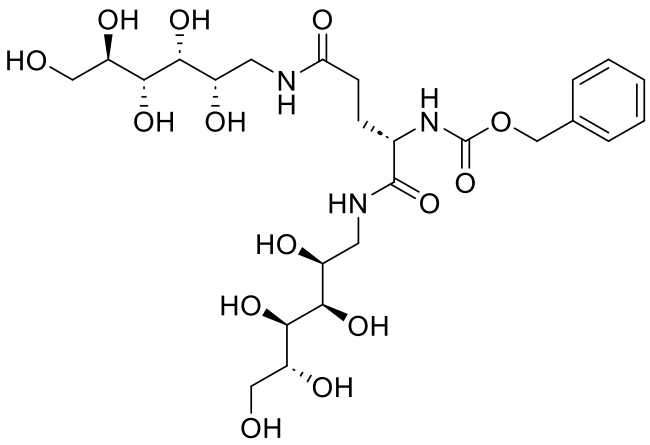
Síntesis del intermediario 6.2



6.2

Se disolvió 14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amina (262 mg, 1,0 mmol, 1 equiv.) en DMF (2 mL). Se añadió D-Glucono-1,5-lactona (214 mg, 1,2 mmol, 1,2 equiv.) como un sólido seguido de la adición de DIPEA (348 µL, 2,0 mmol, 2 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 2 h a 110 °C. Tras enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó *al vacío*. La purificación por cromatografía flash sobre sílice usando un gradiente de diclorometano a diclorometano/metanol/agua (5:1:0,1) proporcionó el intermediario **6.1** (318 mg, 72 %). $C_{16}H_{32}N_4O_{10}$. HPLC (método M): t_R= 13,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 441,3 $[M+H]^+$, m/z calculado= 441,2 $[M+H]^+$

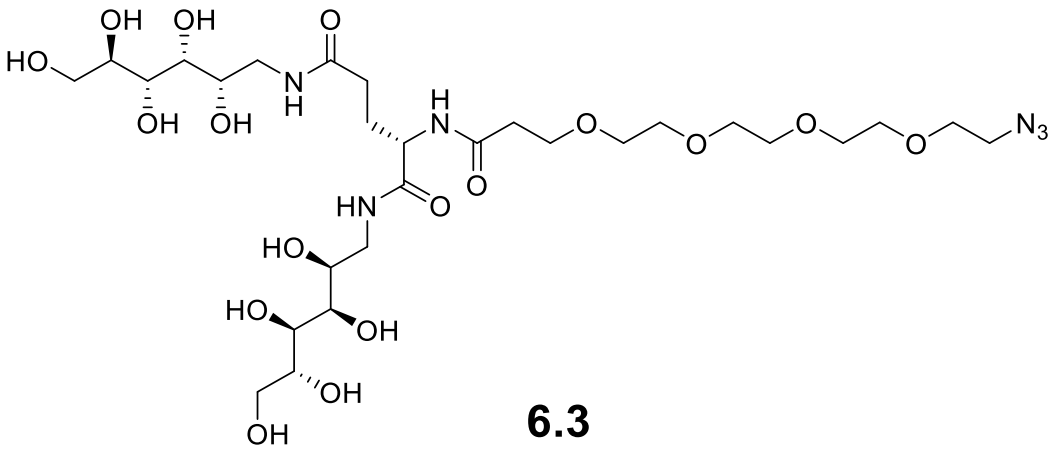
Síntesis del intermediario 6.3



Z-L-Glu(NHDG)-NHDG

A una disolución de Z-L-GLU-OH (2,50 g, 8,9 mmol, 1 equiv.) en THF (abs., 50 mL) se añadió N-hidroxi-succinimida (2,32 g, 20,2 mmol, 2,3 equiv.) y la disolución se enfrió a 0 ºC. A continuación, se añadió *N*,*N*'-diciclohexilcarbodiimida (3,85 g, 18,7 mmol, 2,1 equiv.) y la suspensión resultante se agitó 2 h a 0 °C, seguida de agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. La urea formada se eliminó por filtración y el residuo aceitoso se disolvió en acetato de etilo (75 mL). La capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, salmuera y agua, se secó sobre sulfato magnésico y el disolvente se eliminó *al vacío*. Tras el tratamiento con éter dietílico, se obtuvo Z-L-Glu(OSu)-OSu (3,68 g, 87 %) como intermedio, que se utilizó sin purificación adicional.

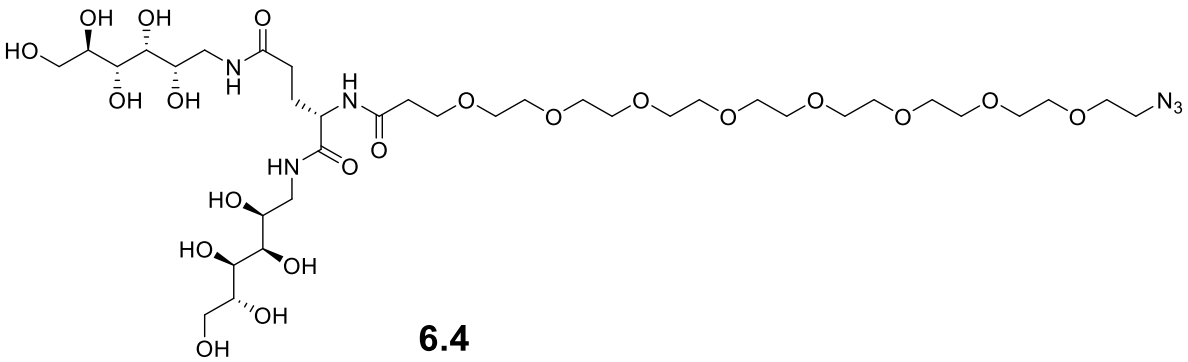
A continuación, a una disolución de Z-L-Glu(OSu)-OSu (1,00 g, 2,1 mmol, 1 equiv.) en DMF (abs., 40 mL) se añadió d-glucamina (762,23 mg, 4,2 mmol, 2 equiv.) y la suspensión resultante se agitó durante 3 h a 65 °C. A medida que avanzaba la reacción, la suspensión inicial se convirtió en una solución. La solución se eliminó *al vacío* y la purificación por RP-HPLC proporcionó **Z-L-Glu(NHDG)-NHDG** (933,9 mg, 73 %). $C_{25}H_{41}N_3O_{14}$. HPLC (método H): t_R= 8,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 630,3 $[M+Na]^+$, m/z calculado= 630,2 $[M+Na]^+$



6.3

A una solución de **Z-L-Glu(NHDG)-NHDG** (924,9 mg, 1,5 mmol) en metanol (180 mL) se añadió Pd/C (10%, 161 mg) bajo argón. La atmósfera se cambió de argón a hidrógeno, y la suspensión resultante se agitó durante 3,5 h a temperatura ambiente. El catalizador se eliminó por filtración a través de Celite y el disolvente del filtrado resultante se eliminó *al vacío* obteniéndose H-l-Glu(NHDG)-NHDG (728,7 mg, 1,5 mmol, cuant.). A continuación, se disolvió H-l-Glu(NHDG)-NHDG (100,0 mg, 211,2 µmol, 1,5 equiv.) en DMF (abs., 2 mL) y se añadió a una solución de éster de azido-PEG4-NHS (CAS-Nr. 944251-24-5, 54,68 mg, 140,8 µmol, 1 equiv.) bajo una atmósfera de argón. Se añadió DIPEA (73,57 µl, 422,4 µmol, 3 equiv.) y la solución resultante se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó *al vacío* y la purificación por RP-HPLC proporcionó **el intermediario 6.3** (82,74 mg, 79 %). $C_{28}H_{54}N_6O_{17}$ HPLC (método A): t_R= 5,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 747,2 $[M+H]^+$, m/z calculado= 747,4 $[M+H]^+$

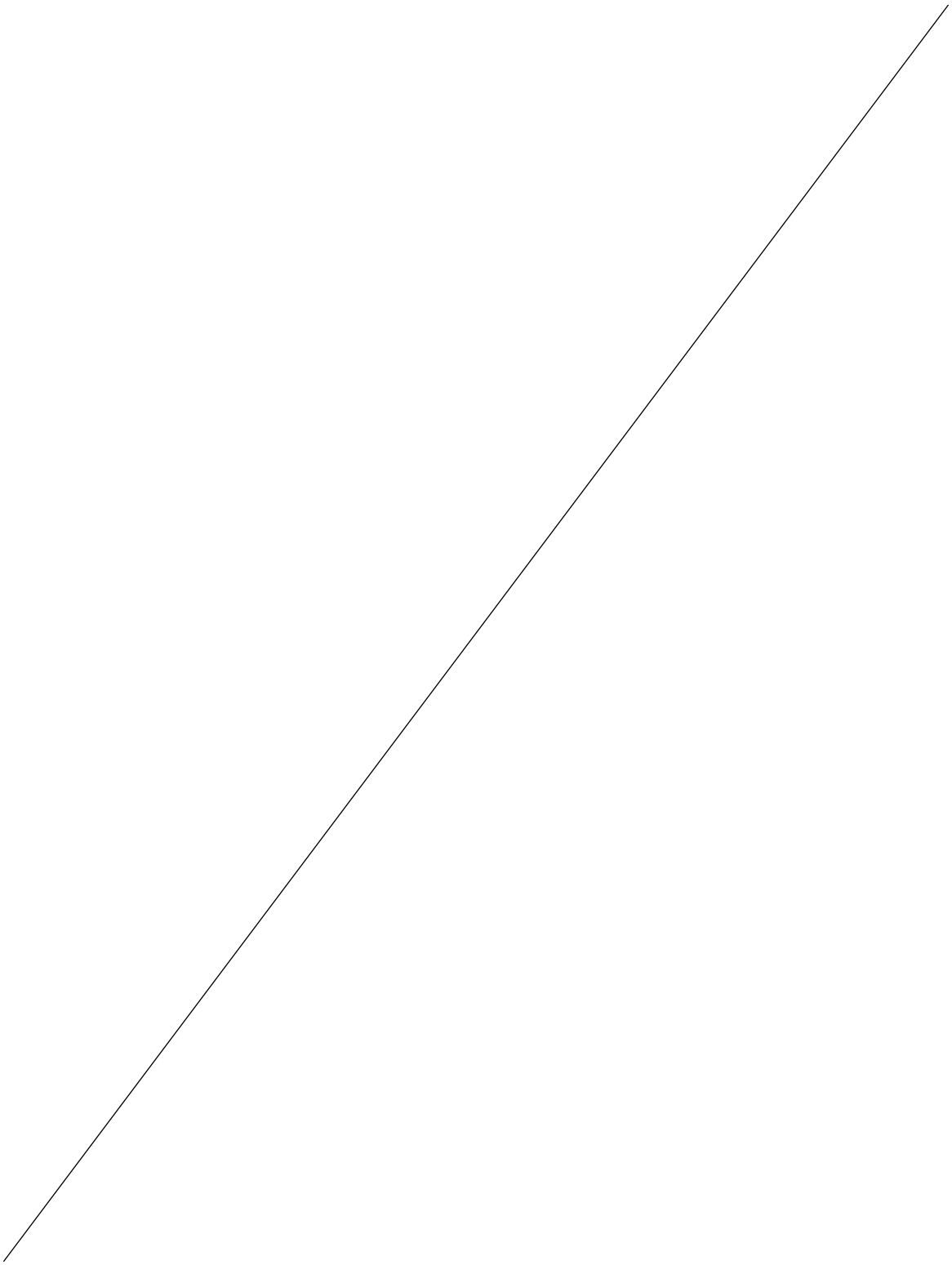
Síntesis del intermediario 6.4



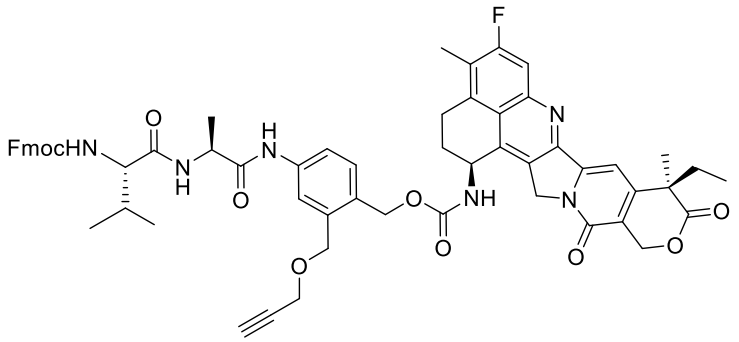
6.4

El intermediario 6.4 (91,9 mg, 71 %) se sintetizó como se ha descrito para el intermediario 6.3 pero utilizando éster de azido-PEG8-NHS (CAS-Nr. 1204834-00-3) en lugar de éster de azido-

PEG4-NHS. $C_{36}H_{70}N_6O_{21}$ HPLC (método A): t_R= 6,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 923,6 $[M+H]^+$, m/z calculado= 923,5 [M+H]+

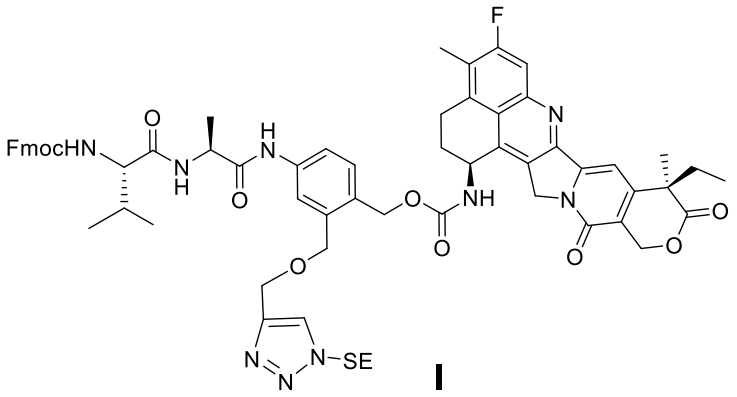


Ejemplo 2 - Síntesis del enlazador multimérico IV



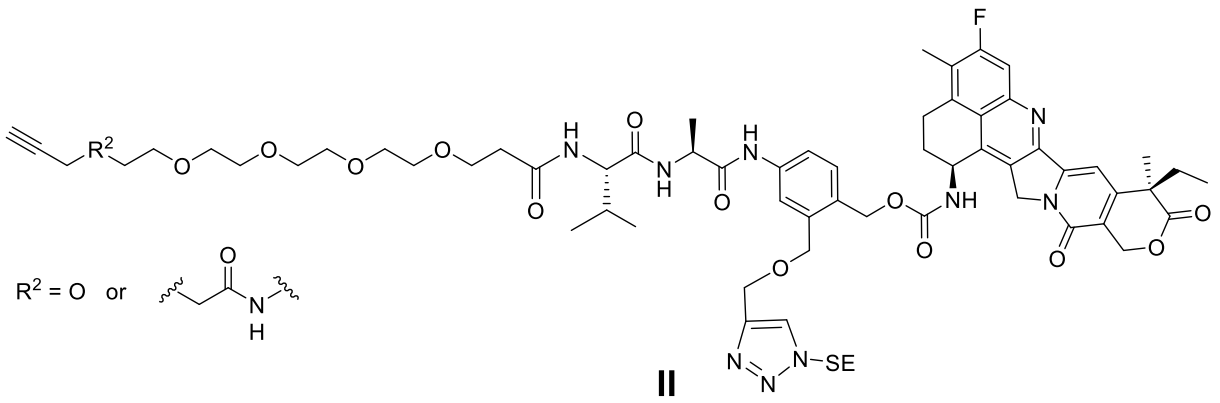
1.3

GP1



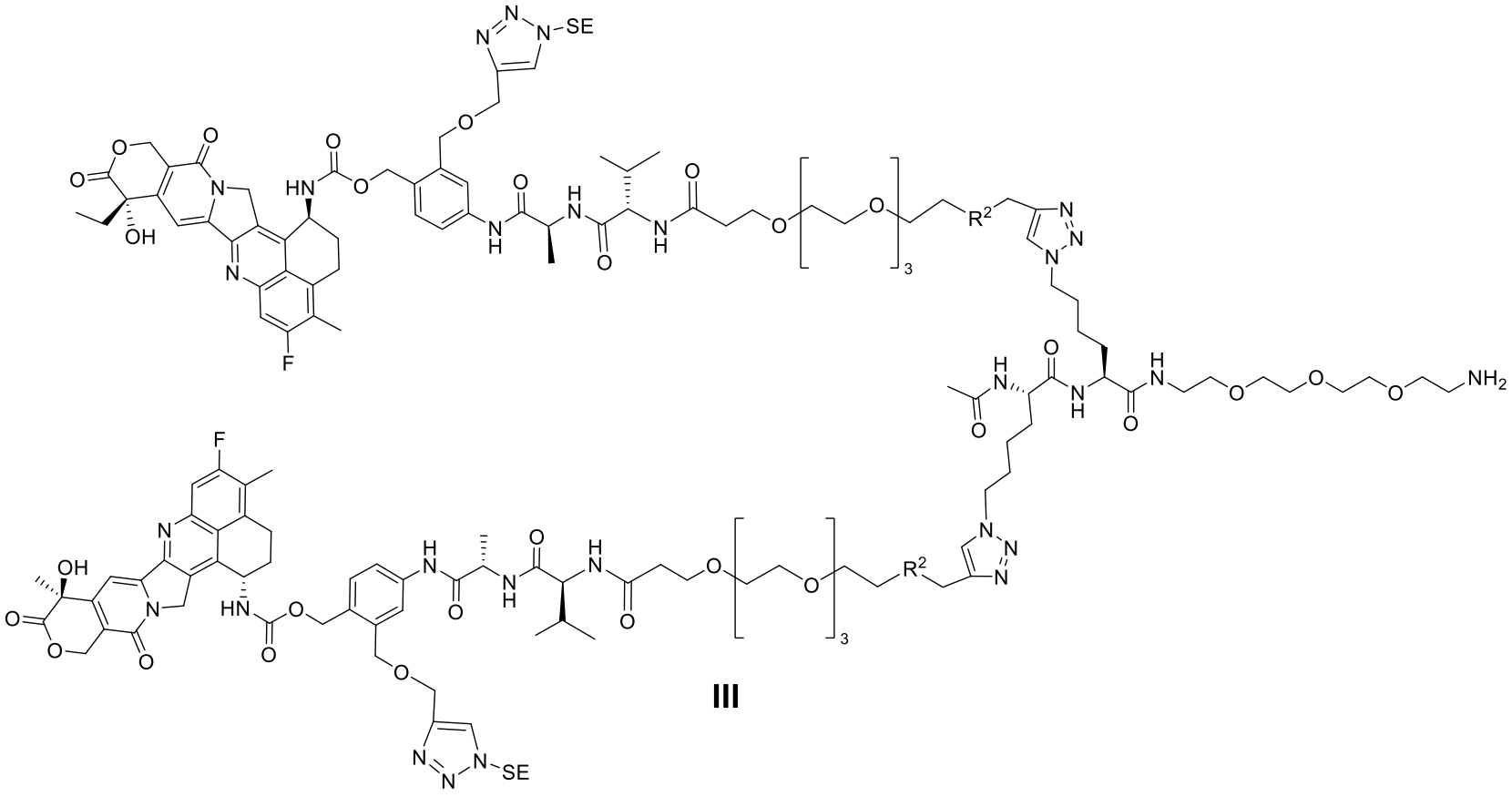
I

GP3



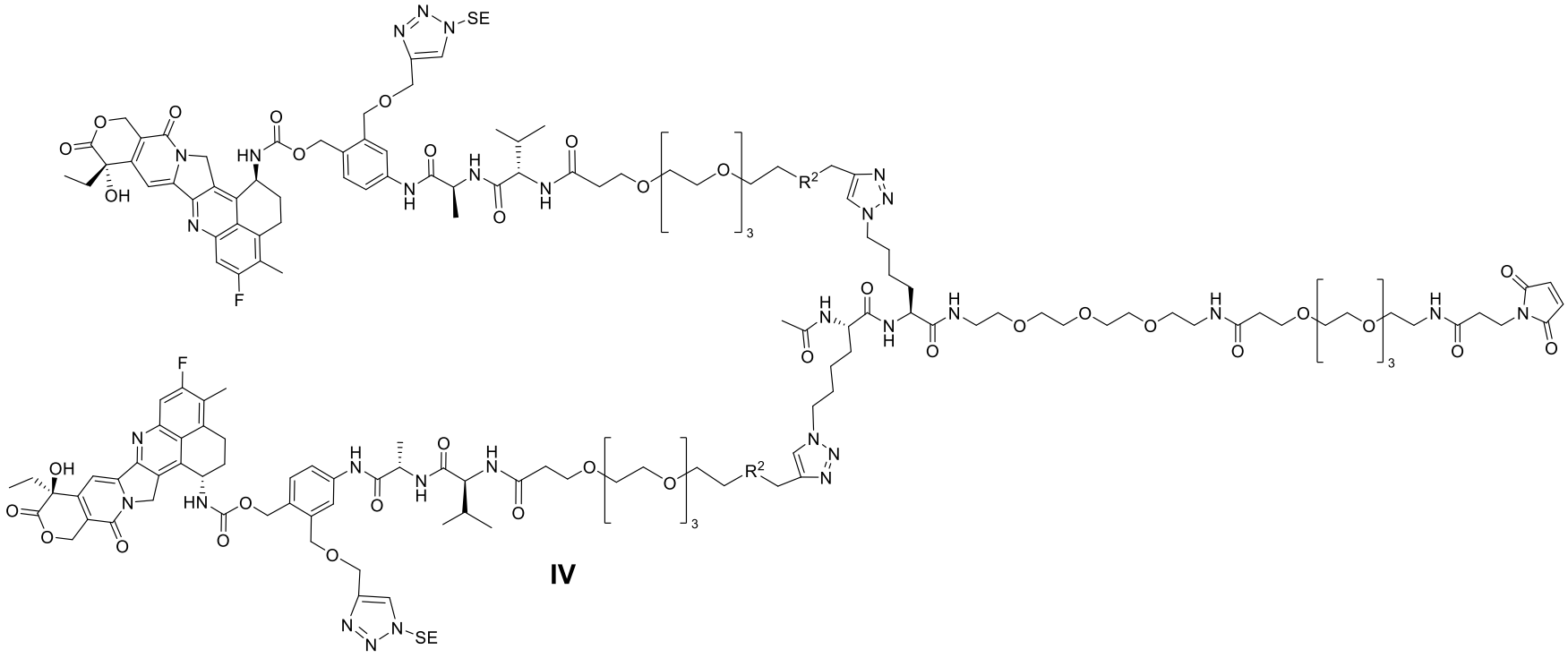
II

GP2



III

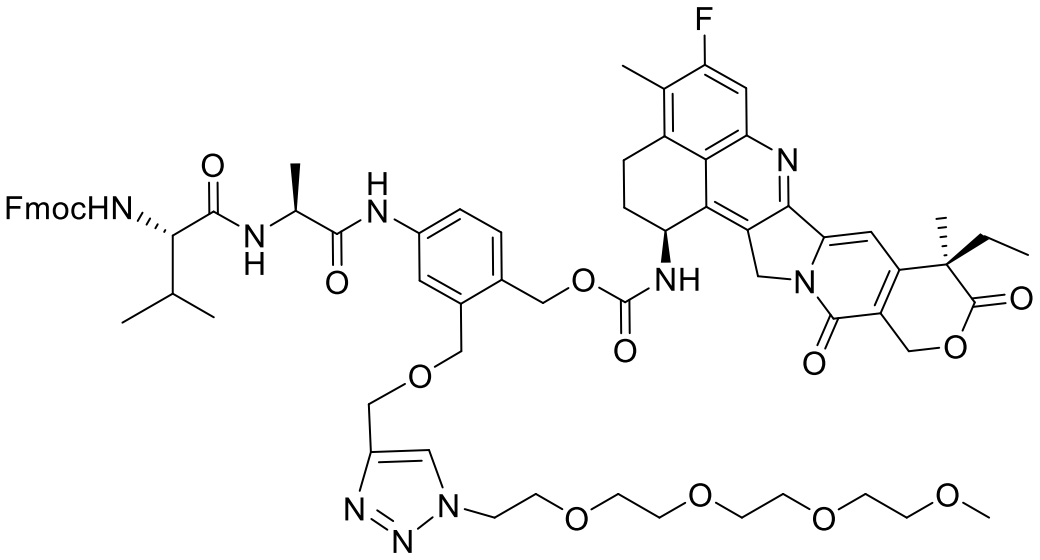
GP4



IV

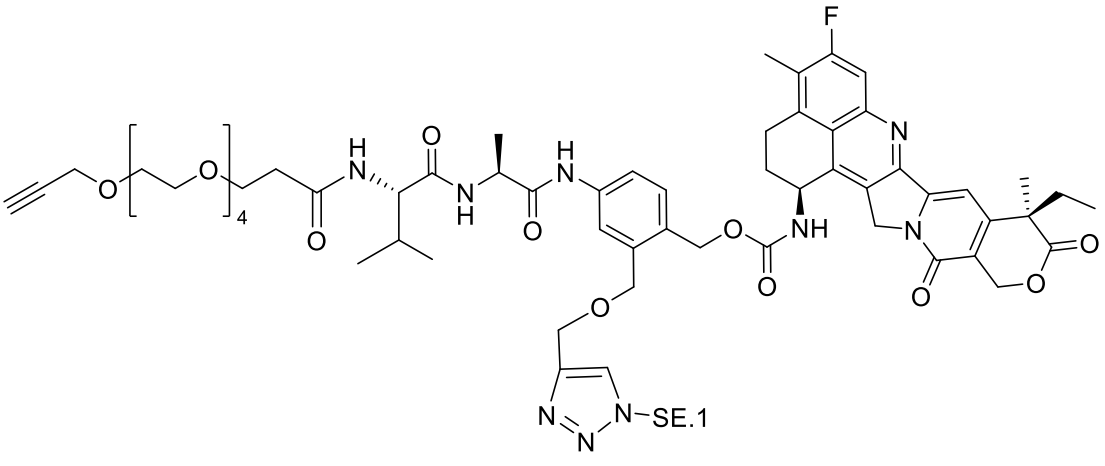
<u>Ejemplo 3 - Síntesis del compuesto IV.1</u>

Síntesis de **I.1**



El intermediario **I.1** se sintetizó según el GP1 utilizando m-PEG(4)-azida (40,4 mg, 173 µmol, 1,2 equiv.), intermediario **1.3** (150 mg, 144 µmol, 1,0 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (3,6 mg, 14,4 µmol, 0,1 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (9,6 mg, 18 µmol, 0,125 equiv.) y ascorbato sódico (7,1 mg, 36 µmol, 0,25 equiv.) en DMF/agua (1,65 mL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.1** (137 mg, 74 %) como un sólido amarillento. HPLC (método D): t_R= 11,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1278,5 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1278,5 [M+H]+

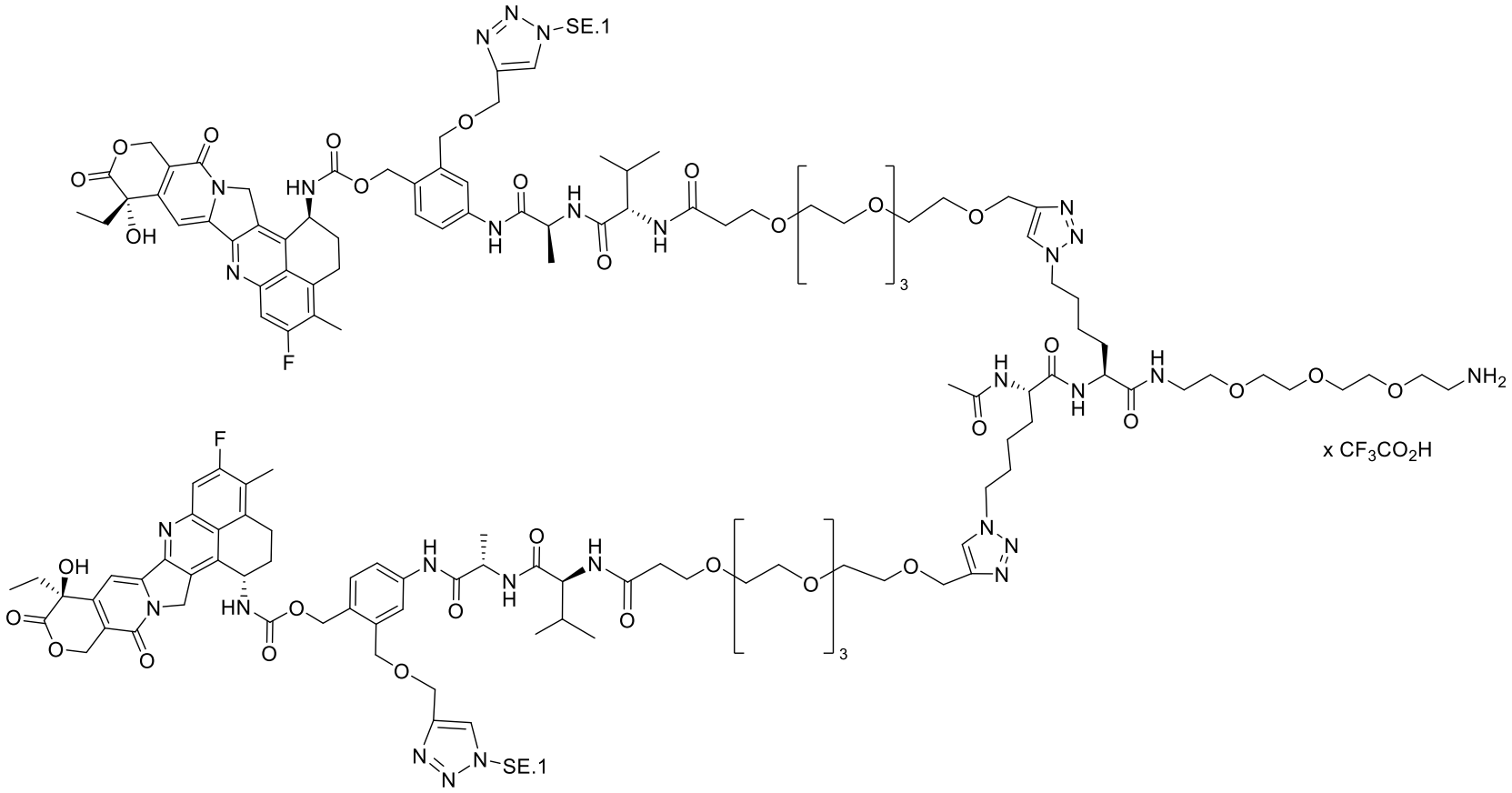
Síntesis de **II.1**



El intermediario **II.1** se sintetizó según el GP3 usando 222 µl de dietilamina (2,14

mmol, 20 equiv.) en 1,37 mL de DMF para la desprotección con Fmoc y el intermediario **I.1** (137 mg, 107 µmol, 1 equiv.), **el intermediario 3.1** (53,0 mg, 118 µmol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (56 µl, 321 µmol, 3 equiv.) en DMF (1 mL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.1** (101 mg, 70 %) como un sólido amarillento. HPLC (método A): t_R= 11,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1342,5 $[M+H]^+$, m/z calculado= 1342,6 [M+H]+----------

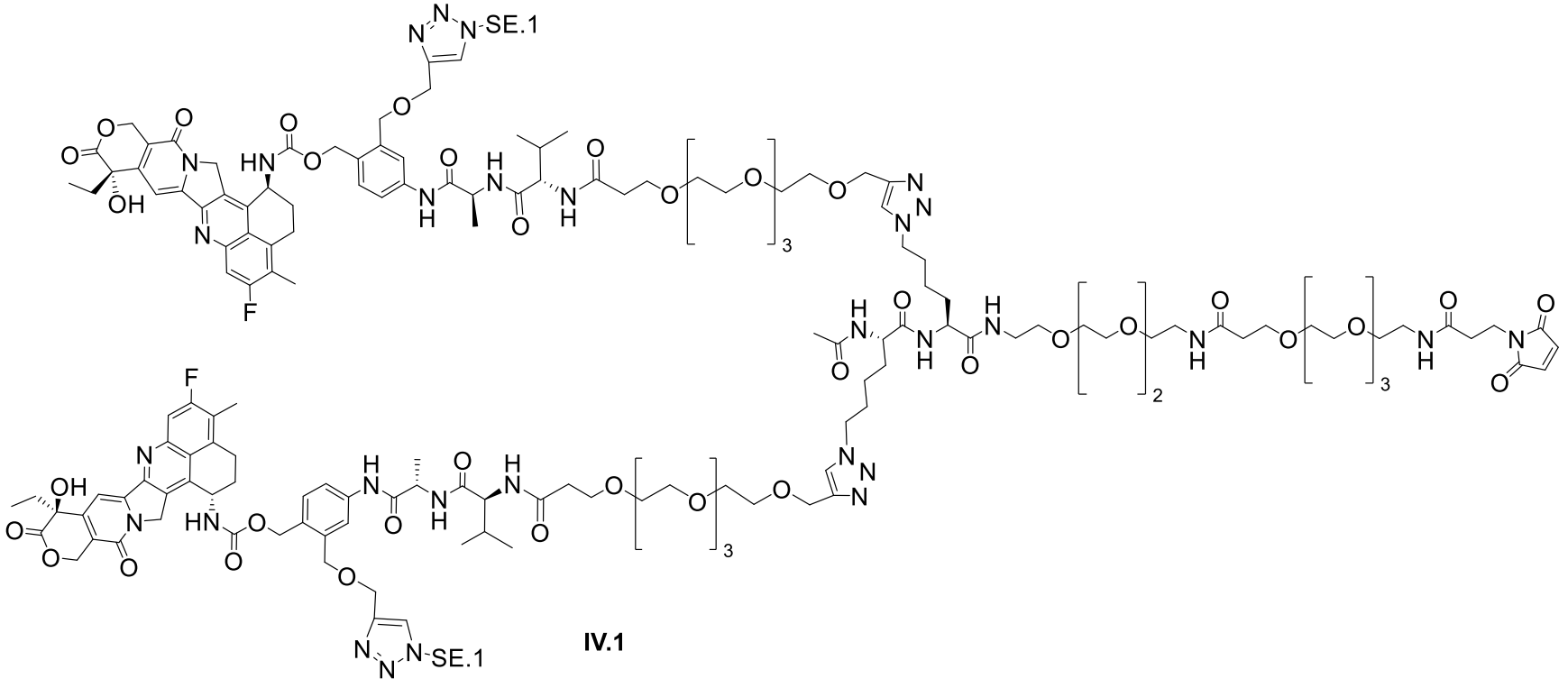
Síntesis de **III.1**



El intermediario **III.1** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (3,3 mg, 5,0 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.1** (17,3 mg, 12,9 µmol, 2,5 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,6 mg, 6,5 µmol, 1,25 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (5,6 mg, 12,9

µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (4,2 mg, 21,4 µmol, 4,3 equiv.) en DMF/agua (0,55 mL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **III.1** (22,4 mg, cuant.) como un sólido amarillento. HPLC (método J): t_R= 15,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1614,17 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1613,8 $[M+2H]^{2+}$

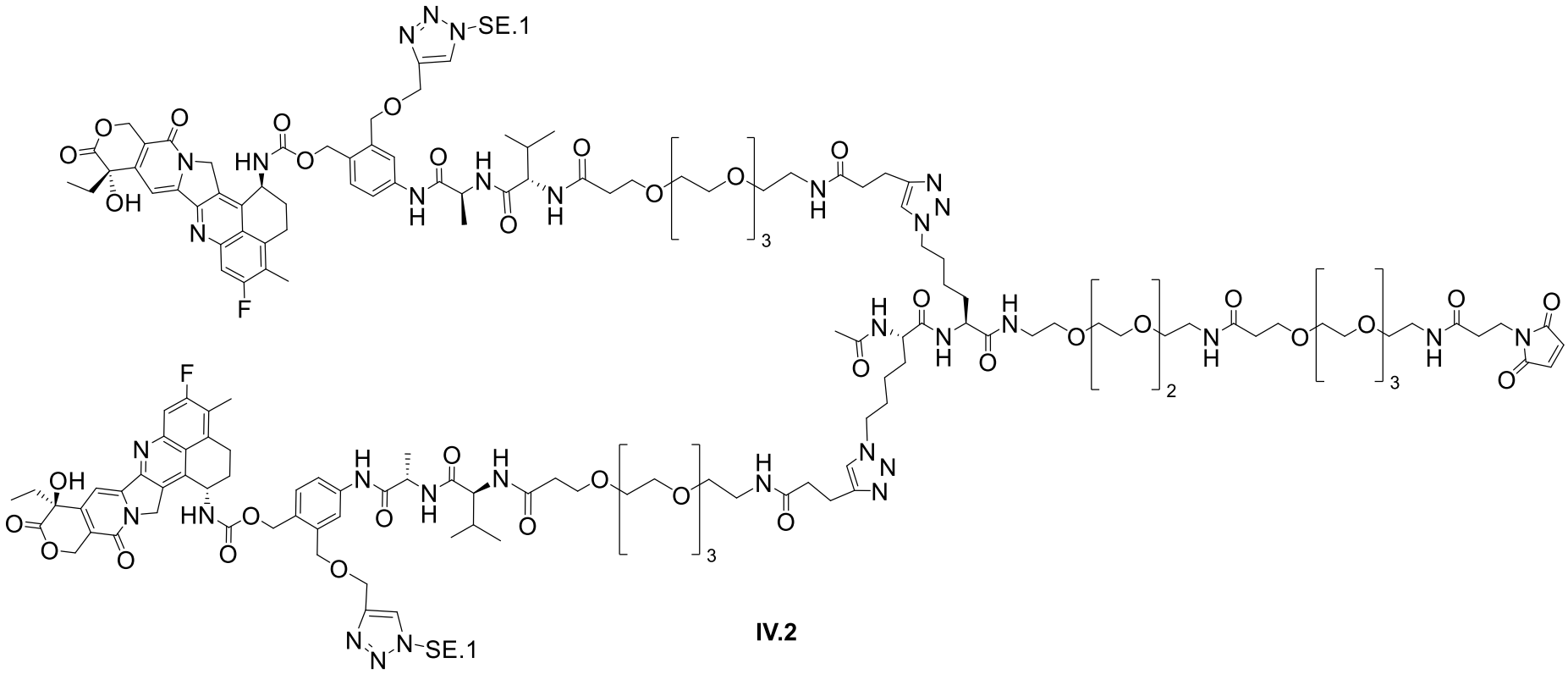
Síntesis de **IV.1**



IV.1

El compuesto **IV.1** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermediario **III.1** (16,3 mg, 4,9 µmol, 1 equiv.), *N*-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,*5-dioxo-1H-pirrol-1-propanamida*= Mal-PEG4-NHS-éster (10,8 mg, 21,0 µmol, 4,3 equiv.) y DIPEA (3,3 µL, 19,0 µmol, 3,9 equiv.) en DMF (652 µL). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto **IV.1** (7,4 mg, 42 %) como un sólido amarillento. $C_{174}H_{244}F_2N_{30}O_{52}$.HPLC (método J): t_R= 16,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1209,6 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1208,9 $[M+3H]^{3+}$

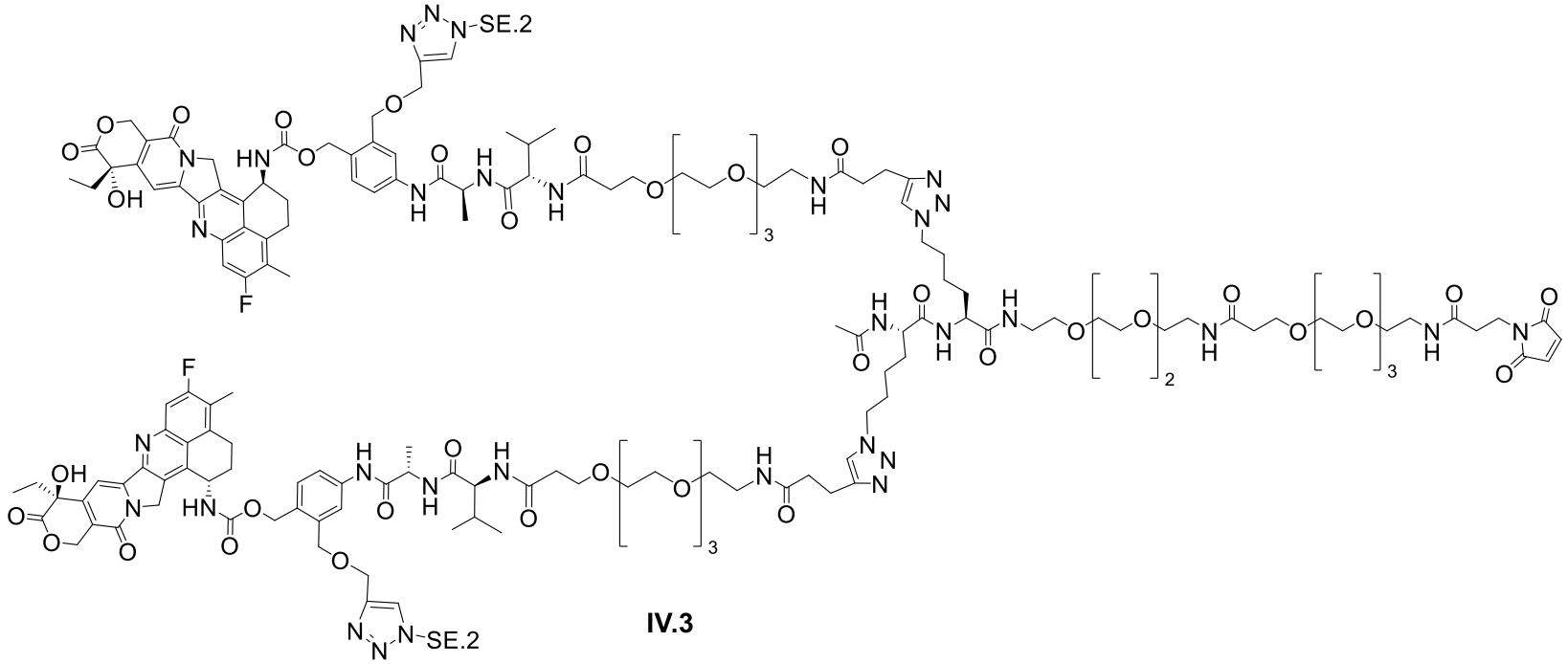
<u>Ejemplo 4 - Síntesis del compuesto IV.2</u>



IV.2

El compuesto IV.2 se sintetizó como se ha descrito para el compuesto IV.1 pero utilizando **el intermediario 3.2**. El compuesto **IV.2** (30,76 mg) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{178}H_{250}F_2N_{32}O_{52}$. HPLC (método J): t_R= 16,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1236,8 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1236,3 $[M+3H]^{3+}$

<u>Ejemplo 5 - Síntesis del compuesto IV.3</u>

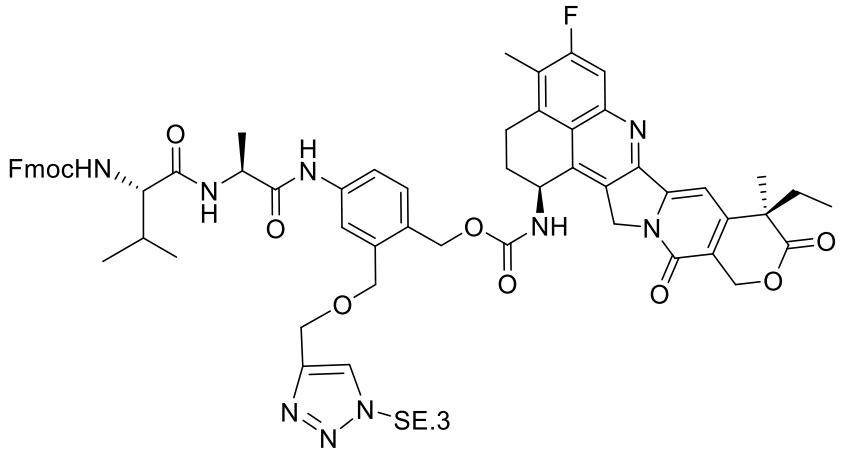


IV.3

El compuesto IV.**3** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**1** pero utilizando m-PEG(12)-azida en lugar de m-PEG(4)-azida y **el intermediario 3.2** en lugar del intermediario 3.**1**. El compuesto IV.**3** (5,07 mg) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{210}H_{314}F_2N_{32}O_{68}$ HPLC (método J): t_R= 16,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1471,7 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1471,1 $[M+3H]^{3+}$

Ejemplo 6 - Síntesis del compuesto IV.4

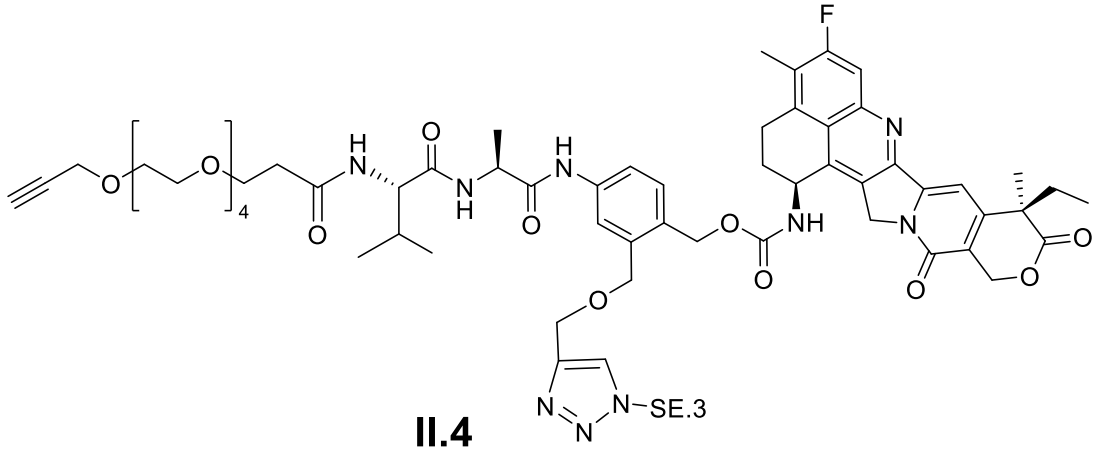
Síntesis de **I.4**



I.4

El intermediario **I.4** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermediario 4.**1** (22,4 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**3** (26,16 mg, 25,0 µmol, 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,23 mg, 4,9 µmol, 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (3,17 mg, 6,0 µmol, 0,26 equiv.) y ascorbato sódico (4,33 mg, 11,9 µmol, 0,5 equiv.) en DMF/agua (0,28 mL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.4** (31,51 mg, 60 %) como un sólido amarillento. $C_{108}H_{139}FN_{10}O_{48}$. HPLC (método D): t_R= 10,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1182,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1182,4 $[M+2H]^{2+}$

Síntesis de **II.4**

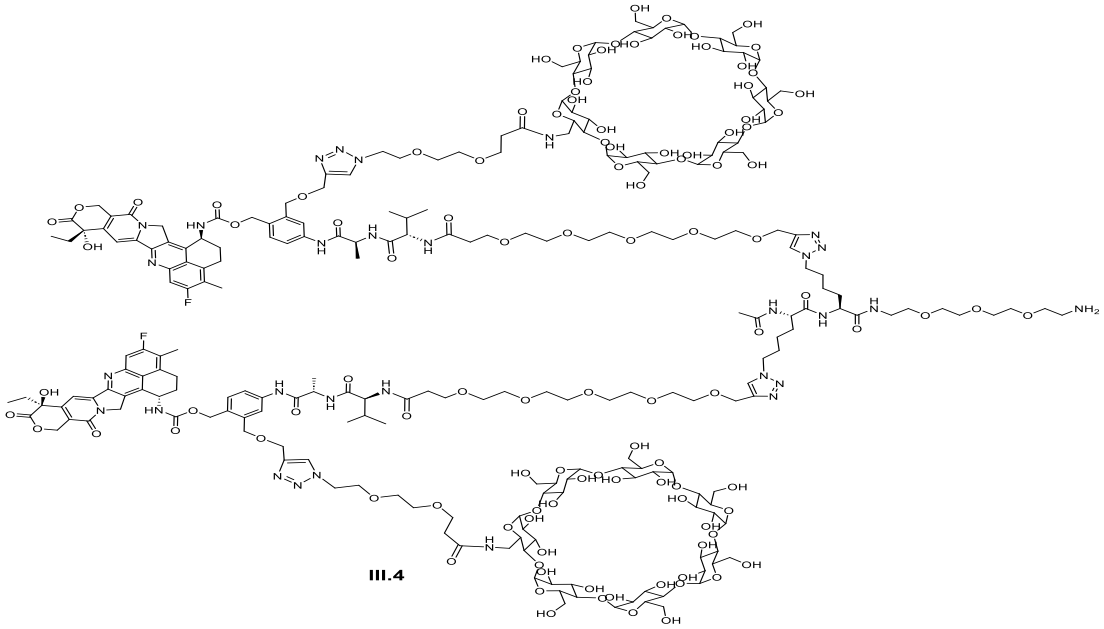


II.4

El intermediario **II.4** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.4** (31,51 mg, 13,3 µmol, 1 equiv.), 33 µL de dietilamina (319,9 µmol, 24 equiv.) en 1,6 mL de DMF para la desprotección por Fmoc y **el intermediario 3.1** (8,98 mg, 20,0

µmol, 1,5 equiv.), diisopropiletilamina (6,8 µL, 40,0 µmol, 3 equiv.) en DMF (2,1 mL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.4** (15,51 mg, 50 %) como un sólido amarillento. $C_{107}H_{151}FN_{10}O_{52}$. HPLC (método D): t_R= 9,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1214,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1214,5 $[M+2H]^{2+}$

Síntesis de **III.4**



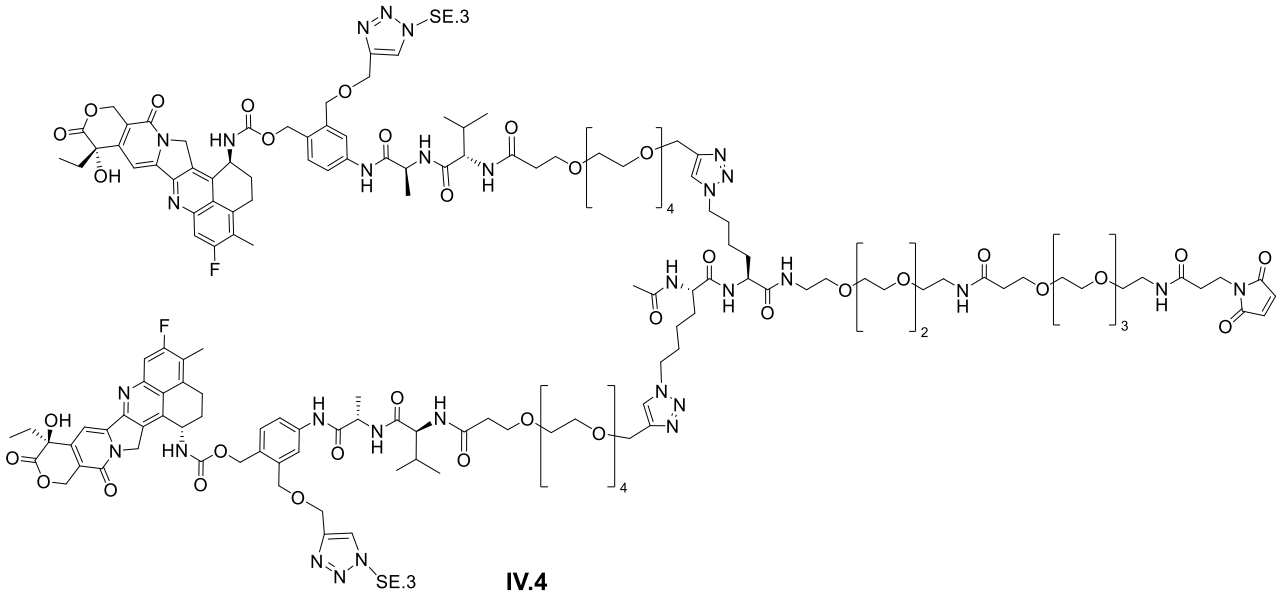
III.4

El intermediario **III.4** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (1,54 mg, 2,6 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.4** (15,51 mg, 6,4 µmol, 2,5 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,87 mg, 3,5 µmol, 1,3 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (2,83 mg, 6,5 µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (1,97 mg, 9,9 µmol, 3,8 equiv.) en DMF/agua (0,12 mL, 5:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **III.4** (9,61 mg, 70 %) como un sólido amarillento. $C_{236}H_{344}F_2N_{30}O_{110}$ HPLC (método E): t_R= 9,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1800,6 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1799,7 $[M+3H]^{3+}$

Síntesis de IV.**4**

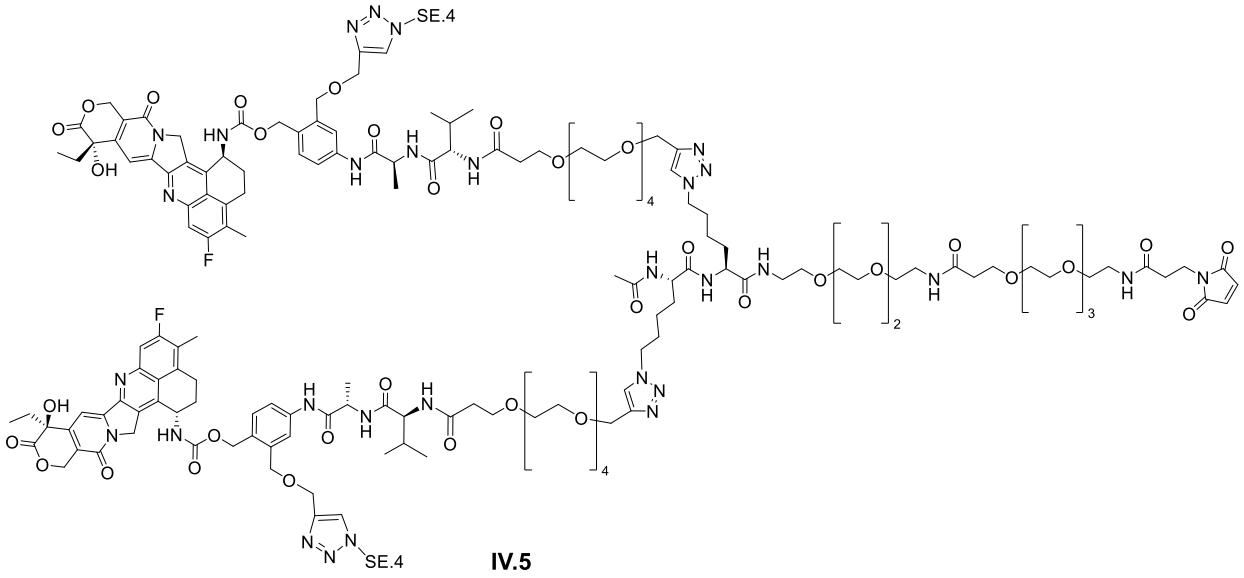
El compuesto IV.**4** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermediario **III.4** (9,61 mg, 1,74 µmol, 1 equiv.), *N*-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,*5-dioxo-1H-pirrol-1-propanamida*= Mal-PEG4-NHS-éster (1,1 equiv,89 mg, 3,68 µmol, 2,1 equiv.) y DIPEA (0,59 µL, 3,48 µmol, 2 equiv.) en DMF (0,4 mL). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto IV.**4** (6,95 mg, 69 %) como un sólido amarillento. $C_{254}H_{370}F_2N_{32}O_{118}$. HPLC (método J): t_R= 12,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1455,1

$[M+3H+Na]^{4+}$, m/z calculado= 1455,7 $[M+3H+Na]^{4+}$



IV.4

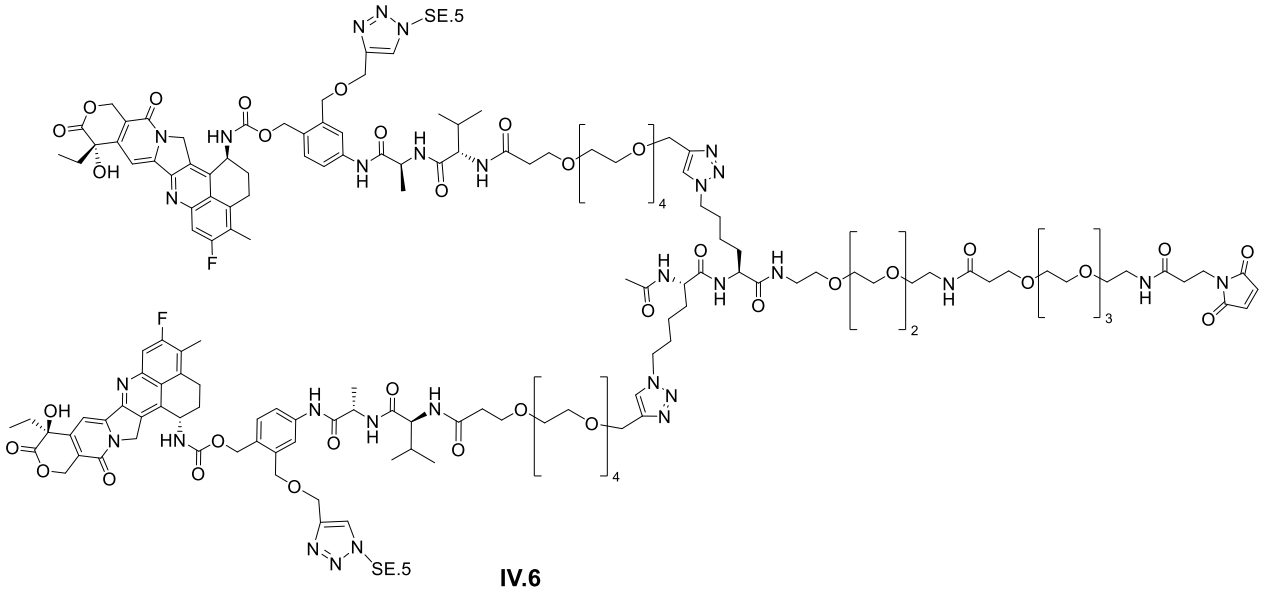
<u>Ejemplo 7 - Síntesis del compuesto IV.5</u>



IV.5

El compuesto IV.**5** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto IV.**4** pero utilizando **el intermediario 4.2**. El compuesto IV.**5** (25,55 mg, 68 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{262}H_{386}F_2N_{32}O_{122}$. HPLC (método J): t_R= 13,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1494,3 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1493,6 $[M+xH].^{x+}$

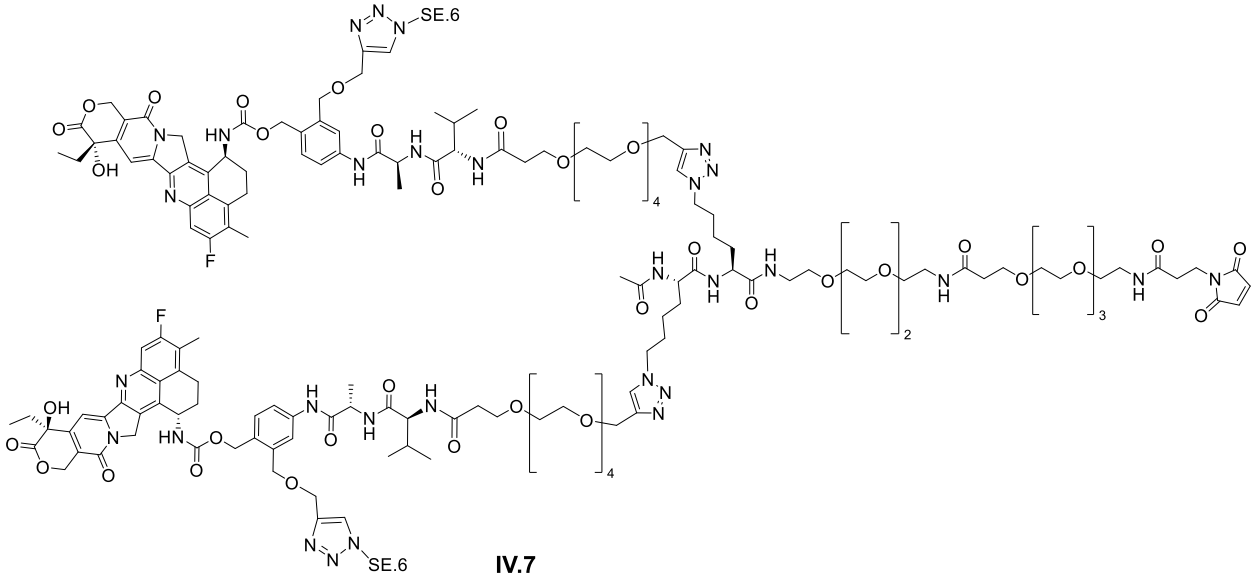
Ejemplo 8 - Síntesis del compuesto IV.6



IV.6

El compuesto IV.**6** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**4** pero utilizando **el intermediario 4.3**. El compuesto IV.**6** (6,70 mg, 83 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{278}H_{418}F_2N_{32}O_{130}$. HPLC (método J): t_R= 13,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1582,3 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1581,7 $[M+4H]^{4+}$

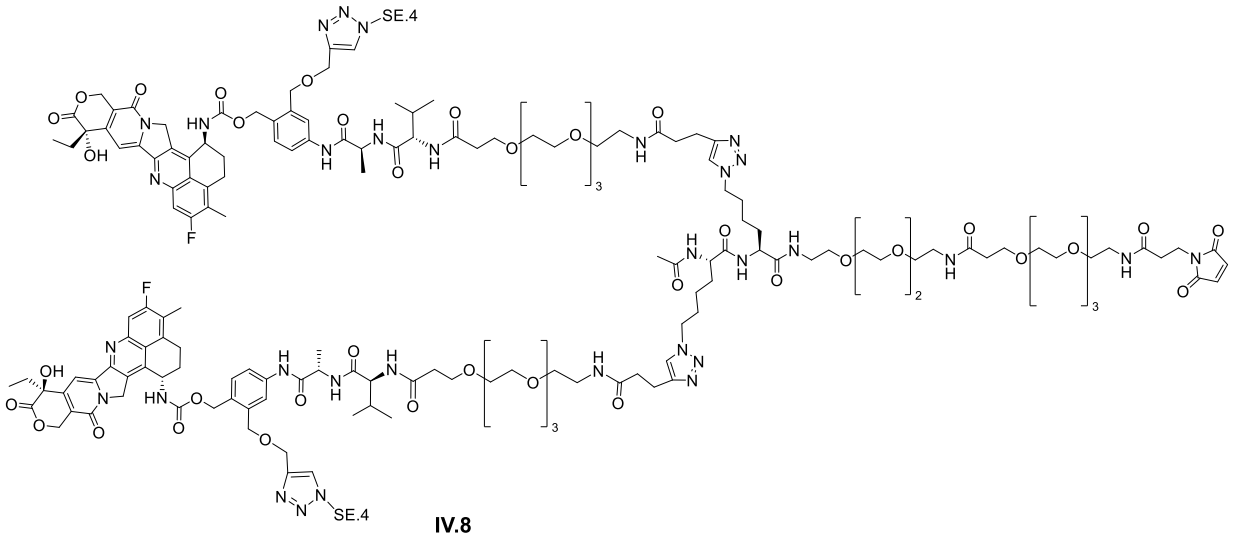
Ejemplo 9 - Síntesis del compuesto IV.7



IV.7

El compuesto IV.**7** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**4** pero utilizando **el intermediario 4.4**. El compuesto IV.**7** (10,41 mg, 51 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{342}H_{546}F_2N_{32}O_{162}$ HPLC (método J): t_R= 14,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1934,3 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1933,9 $[M+4H]^{4+}$

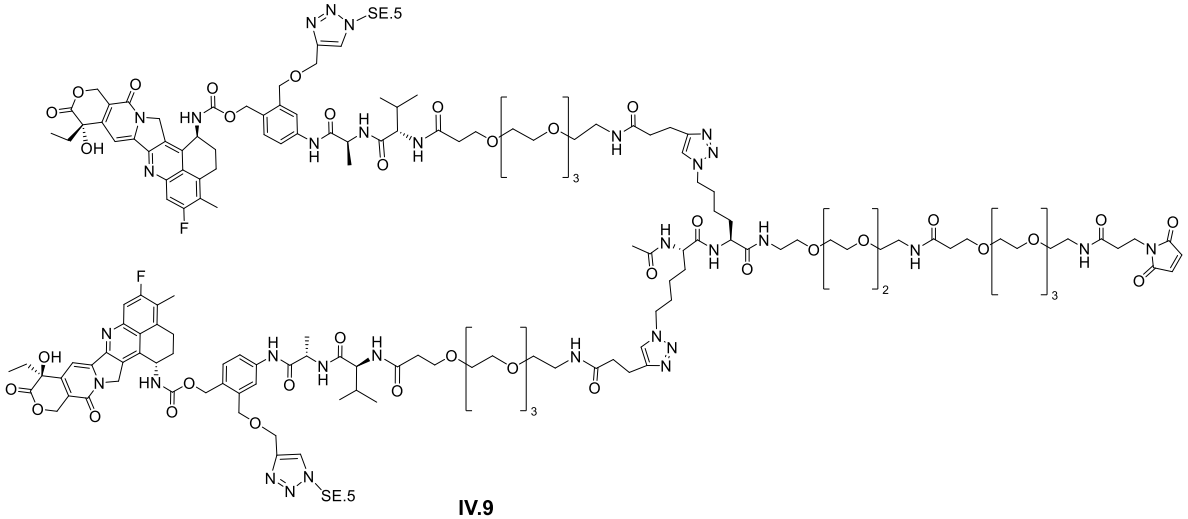
Ejemplo 10 - Síntesis del compuesto IV.8



IV.8

El compuesto IV.**8** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto IV.**4** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **4,2**. El compuesto IV.**8** (19,3 mg, 35 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{266}H_{392}F_2N_{34}O_{122}$ HPLC (método J): t_R= 12,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1514,6 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1514,1 $[M+4H]^{4+}$

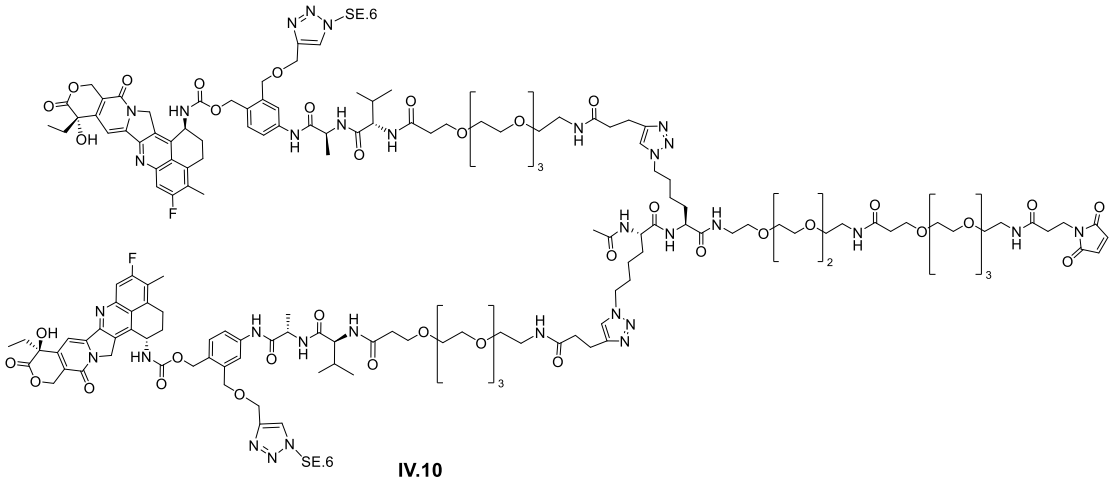
<u>Ejemplo 11 - Síntesis del compuesto IV.9</u>



IV.9

El compuesto IV.**9** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto IV.**4** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **4,3**. El compuesto IV.**9** (8,87 mg, 49 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{282}H_{424}F_2N_{34}O_{130}$. HPLC (método J): t_R= 13,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1602,7 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1602,2 $[M+4H]^{4+}$

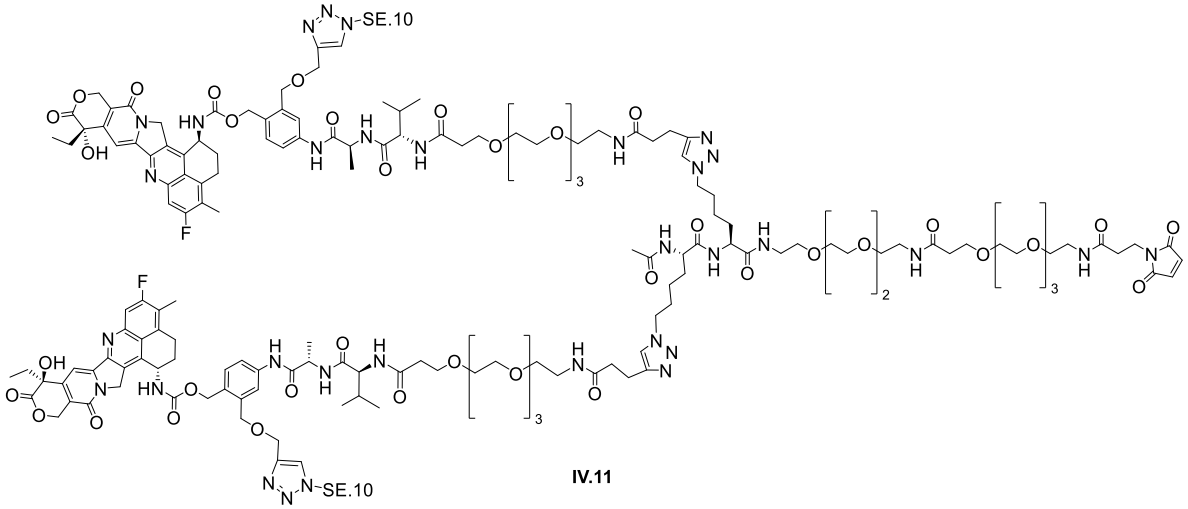
<u>Ejemplo 12 - Síntesis del compuesto IV.10</u>



IV.10

El compuesto IV.**10** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**4** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **4,4**. El compuesto IV.**10** (12,26 mg, 49 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{346}H_{552}F_2N_{34}O_{162}$. HPLC (método J): t_R= 13,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1304,3 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 1303,3 $[M+6H]^{6+}$

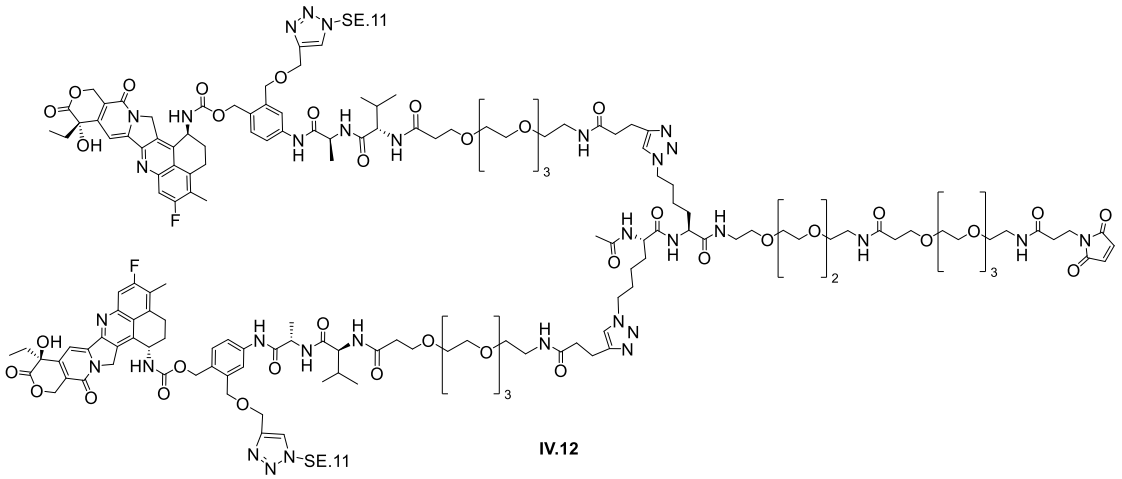
<u>Ejemplo 13 - Síntesis del compuesto IV.11</u>



IV.11

El compuesto IV.**11** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto IV.**4** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **4,5**. El compuesto IV.**11** (5,69 mg, 56 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{270}H_{396}F_2N_{34}O_{128}$ HPLC (método J): t_R= 12,6 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1551,8 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1551,1 $[M+4H]^{4+}$

<u>Ejemplo 14 - Síntesis del compuesto IV.12</u>

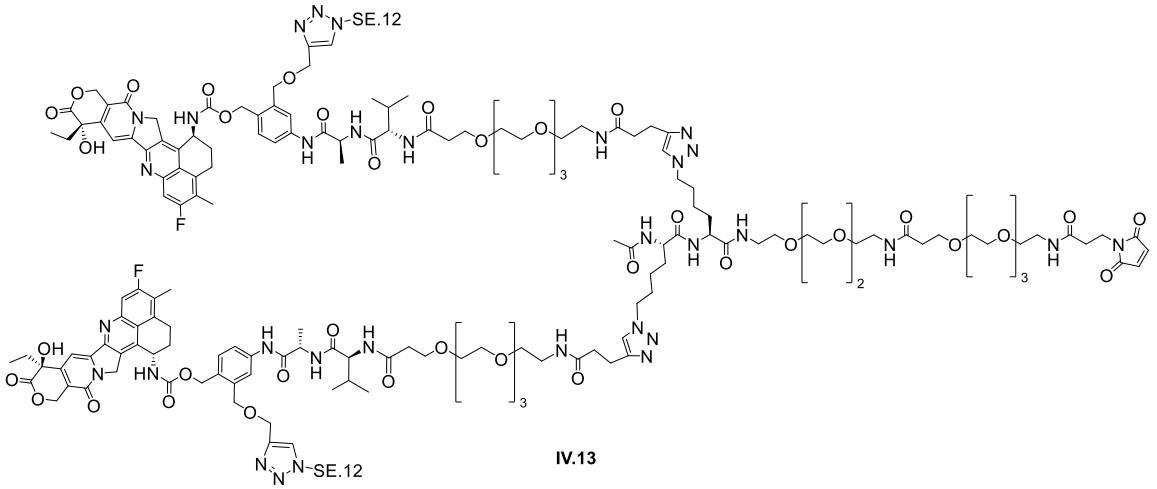


IV.12

El compuesto IV.**12** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**4** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **4,6**. El compuesto IV.**12** (43,17 mg, 59 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{278}H_{412}F_2N_{34}O_{132}$ HPLC (método J): t_R= 12,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1596,8 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1595,67 $[M+4H]^{4+}$

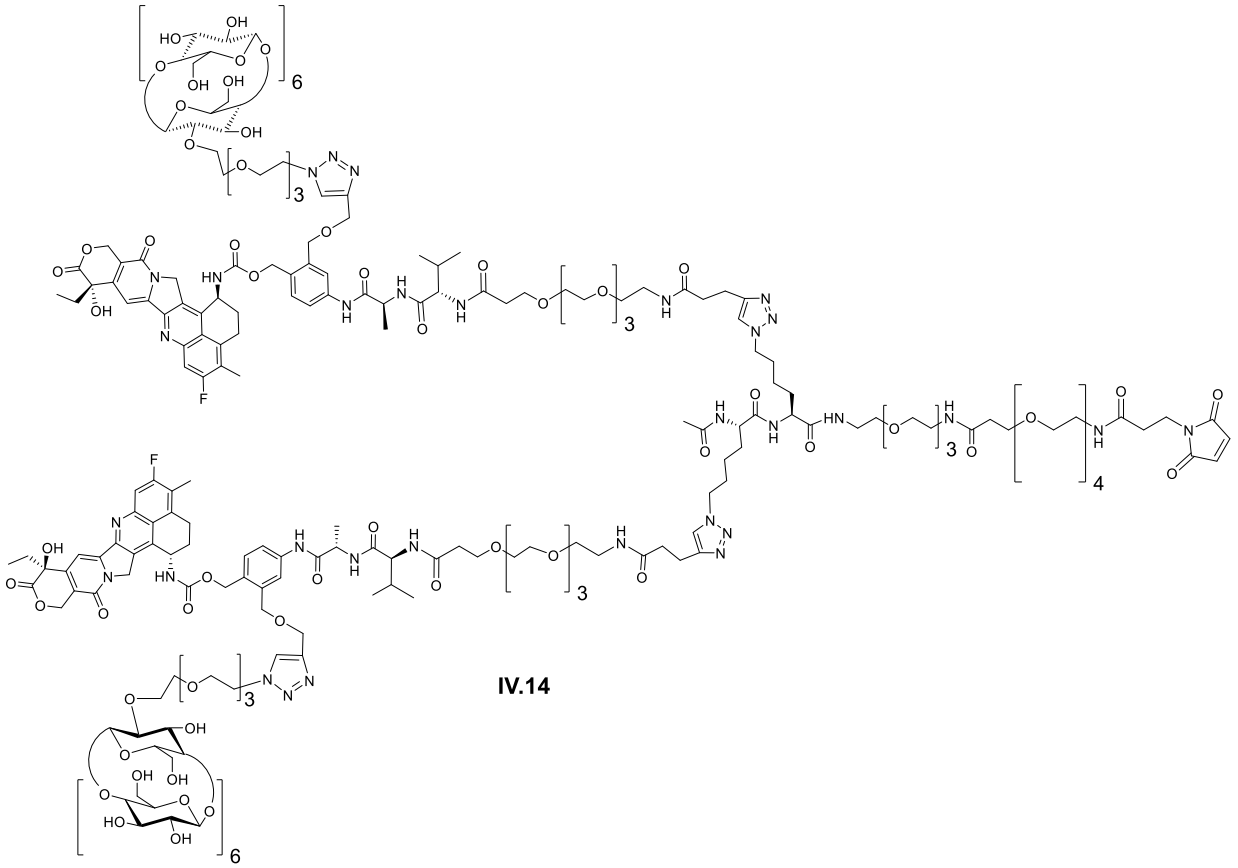
<u>Ejemplo 15 - Síntesis del compuesto IV.13</u>

El compuesto IV.**13** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**4** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **4,7**. El compuesto IV.**13** (29,51 mg, 59 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{294}H_{444}F_2N_{34}O_{140}$. HPLC (método J): t_R= 12,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1684,5 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1683,2 $[M+4H]^{4+}$



IV.13

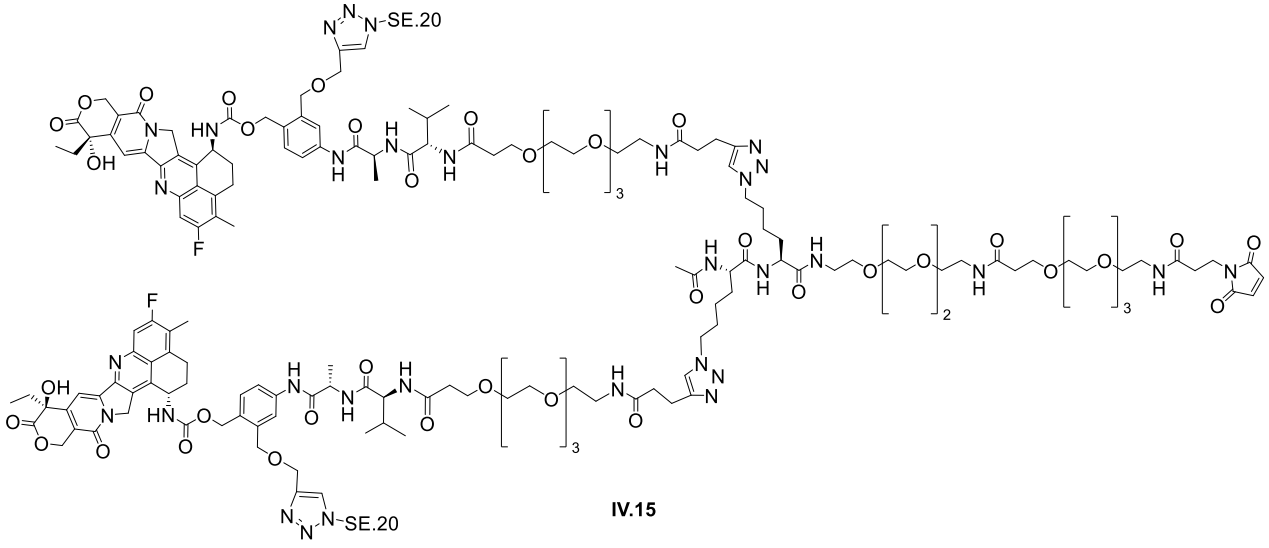
Ejemplo 16 - Síntesis del compuesto IV.14



IV.14

El compuesto IV.**14** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**4** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **4,8**. El compuesto IV.**14** (61,21 mg, 81 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{260}H_{382}F_2N_{32}O_{120}$. HPLC (método J): t_R= 12,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1479,8 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1478,6 $[M+4H]^{4+}$

Ejemplo 17 - Síntesis del compuesto IV.15

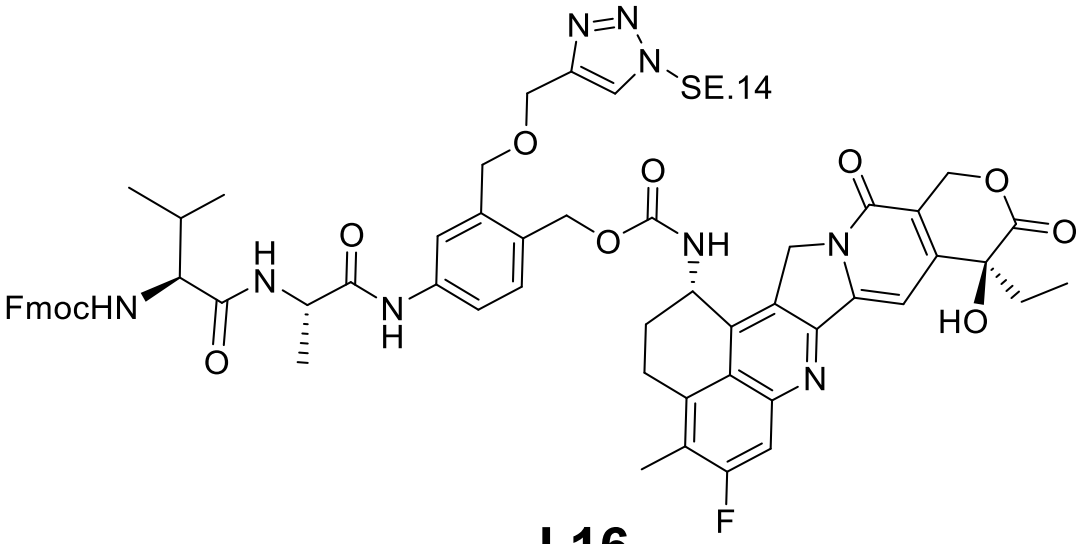


IV.15

El compuesto IV.**15** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**4** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **4,9**. El compuesto IV.**15** (29,68 mg, 68 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{272}H_{402}F_2N_{32}O_{130}$ HPLC (método J): t_R= 12,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1560,1 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1559,7 $[M+4H]^{4+}$

Ejemplo 18 - Síntesis del compuesto IV.16

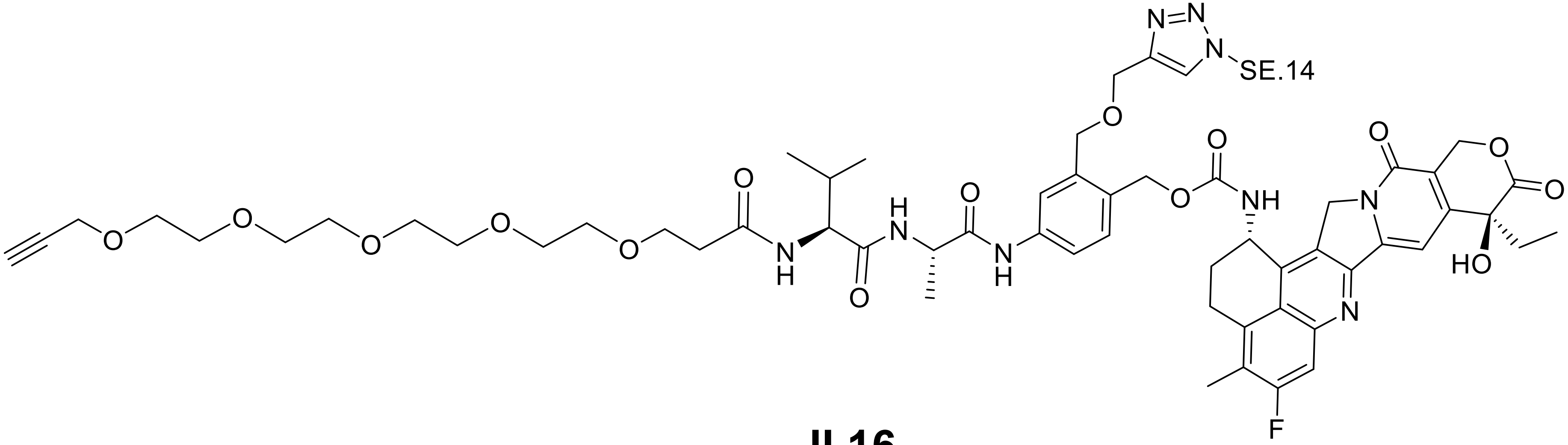
Síntesis de **I.16**



I.16

El intermediario **I.16** se sintetizó según el GP1 usando el intermediario 5.**1** (30 mg, 37,0 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**3** (42,5 mg, 40,7 µmol, 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,85 mg, 7,4 µmol, 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (4,91 mg, 9,25 µmol, 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (3,66 mg, 18,5 µmol, 0,5 equiv.) en DMF/agua (0,33 mL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.16** (51,7 mg, 74 %) como un sólido amarillento. $C_{91}H_{110}FN_{19}O_{23}$ HPLC (método A): t_R= 11,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1855,1 $[M-H]^-$, m/z calculado= 1854,8 $[M-H]^-$

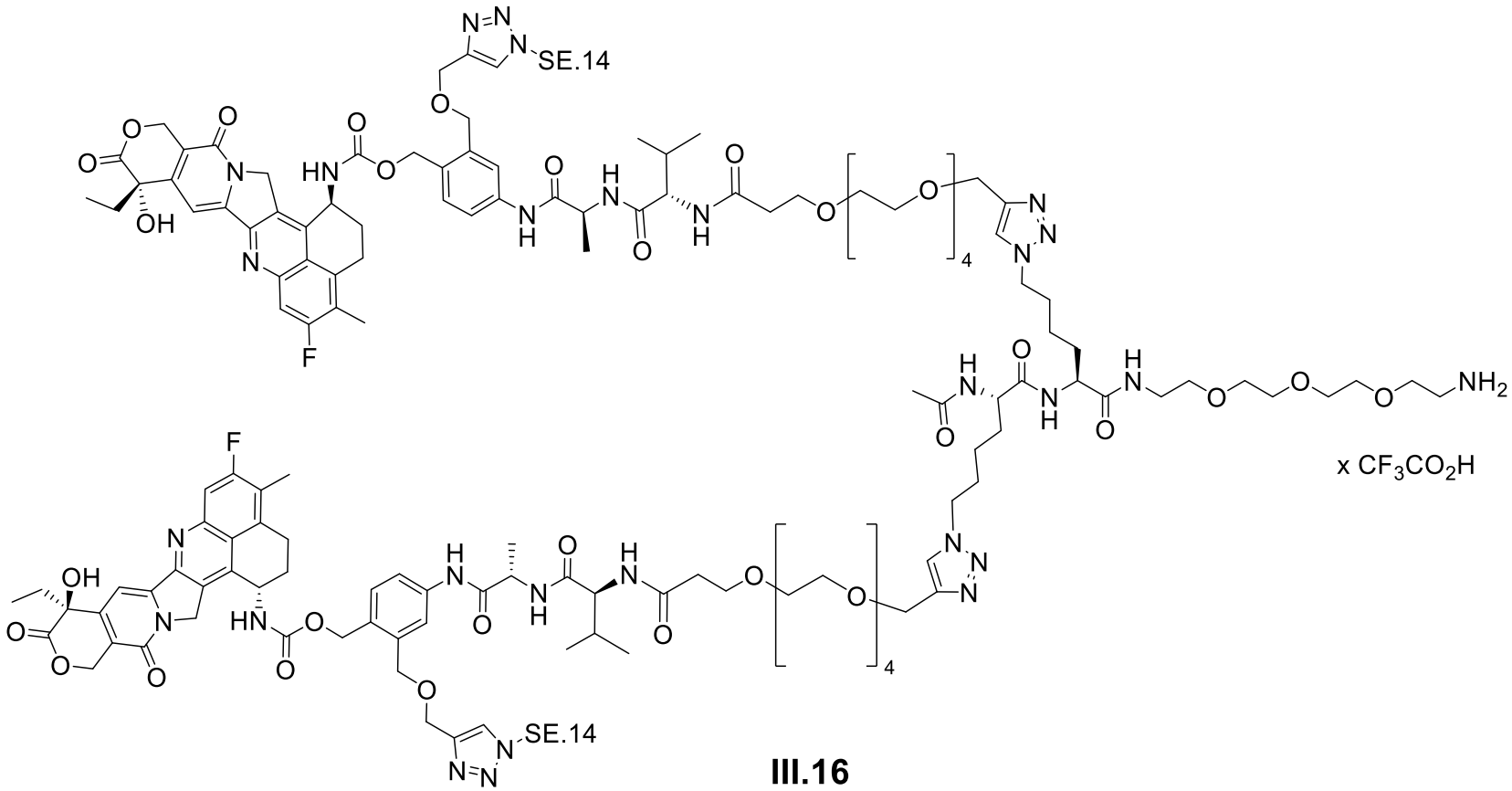
Síntesis de **II.16**



II.16

El intermediario **II.16** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.16** (51,7 mg, 27,8 µmol, 1 equiv.), dietilamina (68,7 µL, 667,0 µmol, 24 equiv.) en 2,5 mL de DMF para la desprotección Fmoc y **el intermediario 3.1** (18,7 mg, 41,7 µmol, 1,5 equiv.), diisopropiletilamina (14,2 µL, 83,4 µmol, 3 equiv.) en DMF (3,44 mL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.16** (43,8 mg, 82 %) como un sólido amarillento. $C_{90}H_{122}FN_{19}O_{27}$ HPLC (método A): t_R= 9,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 961,6 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 960,9 $[M+2H]^{2+}$

Síntesis de **III.16**

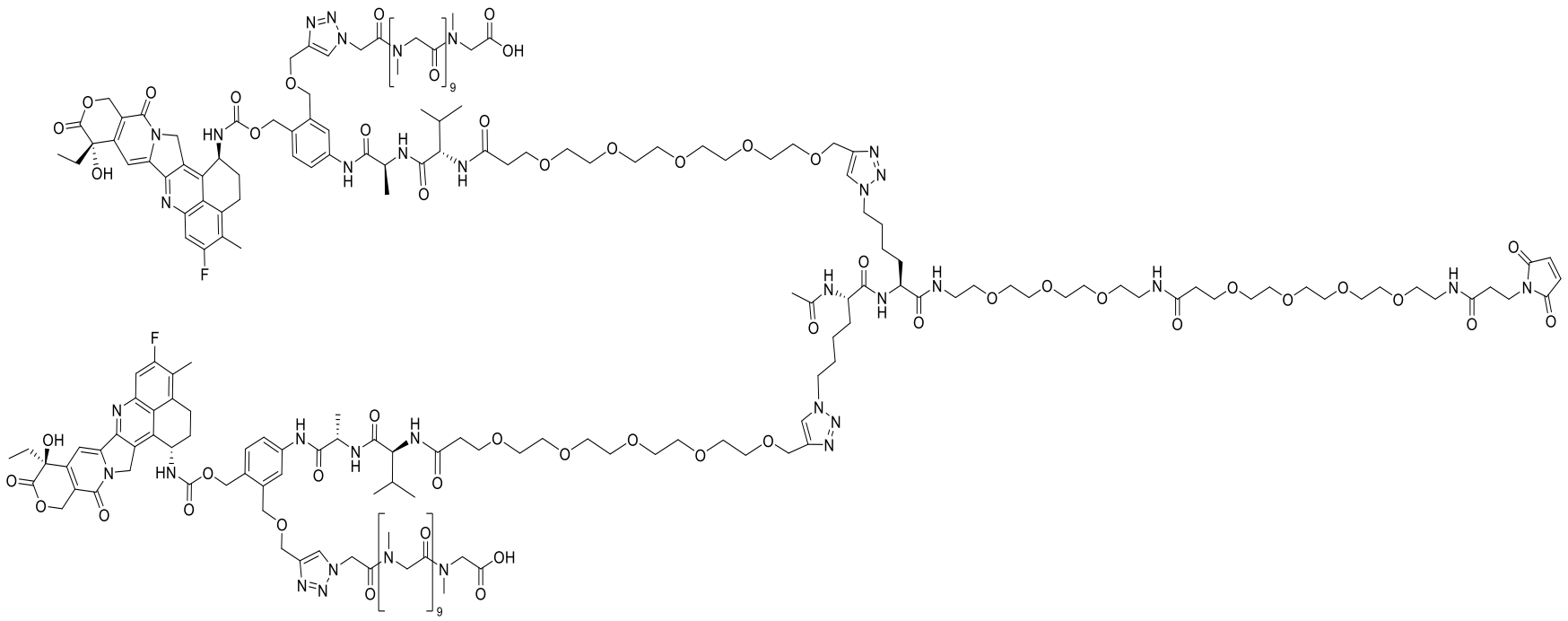


III.16

El intermediario **III.16** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (2,67 mg, 4,6 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.16** (20,4 mg, 10,6 µmol, 2,3 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,44 mg, 5,8 µmol, 1,25 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (5,02 mg, 11,6 µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (3,43 mg, 17,3 µmol, 3,8 equiv.) en DMF/agua (0,44 mL, 10:1). La purificación por RP-HPLC

proporcionó el intermediario **III.16** (9,2 mg, 46 %) como un sólido amarillento. $C_{202}H_{286}F_2N_{48}O_{60}$. HPLC (método L): t_R= 16,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1462,5 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1461,7 $[M+3H]^{3+}$

Síntesis de IV.**16**

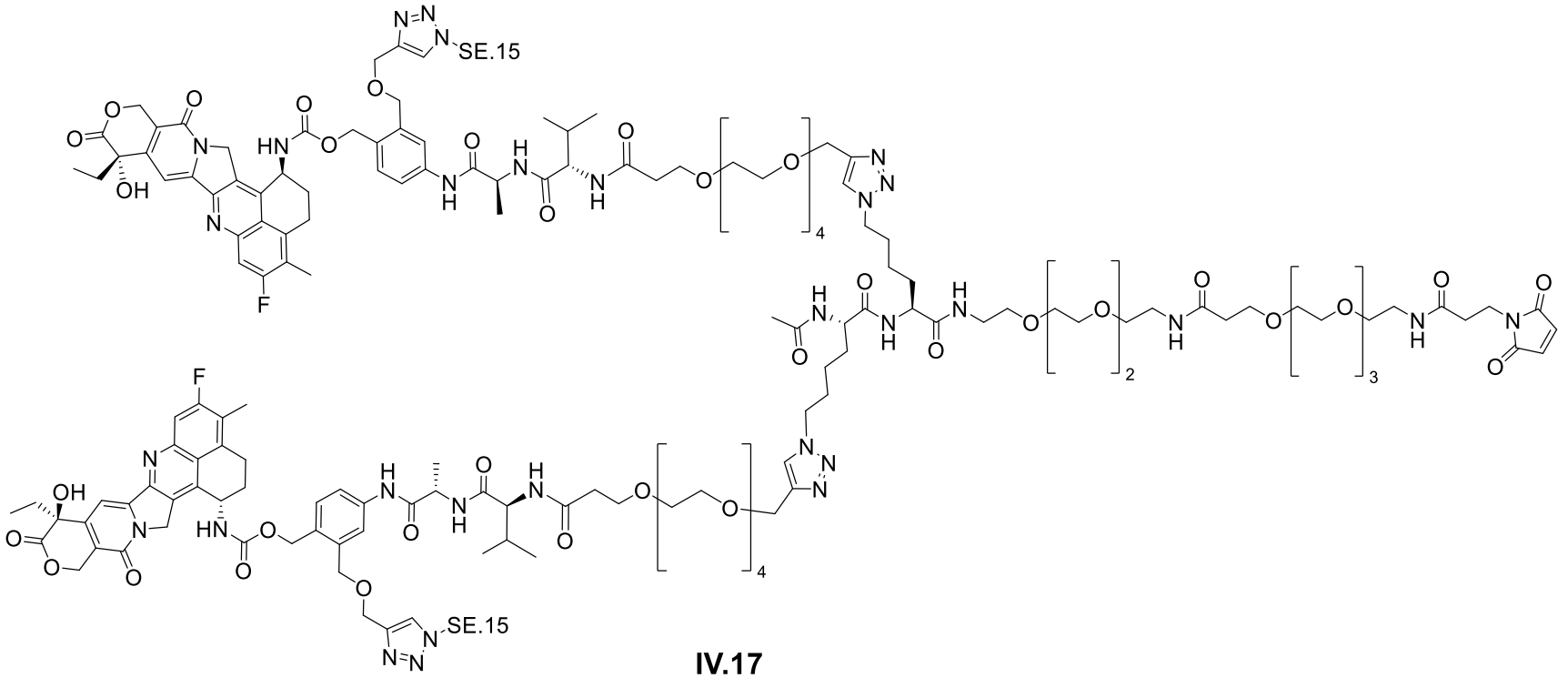


IV.16

El compuesto IV.**16** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermediario **III.16** (7,4 mg, 1,26 µmol, 1 equiv.), *N*-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,*5-dioxo-1H-pirrol-1-propanamida*= Mal-PEG4-NHS-éster (0,72 mg, 1,39

µmol, 1,1 equiv.) y DIPEA (0,22 µL, 1,26 µmol, 1 equiv.) en DMF (0,3 mL). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto IV.**16** (3,85 mg, 61 %) como un sólido amarillento. $C_{220}H_{312}F_2N_{50}O_{68}$ HPLC (método J): t_R= 14,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1595,3 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1594,4 $[M+3H]^{3+}$

<u>Ejemplo 19 - Síntesis del compuesto IV.17</u>

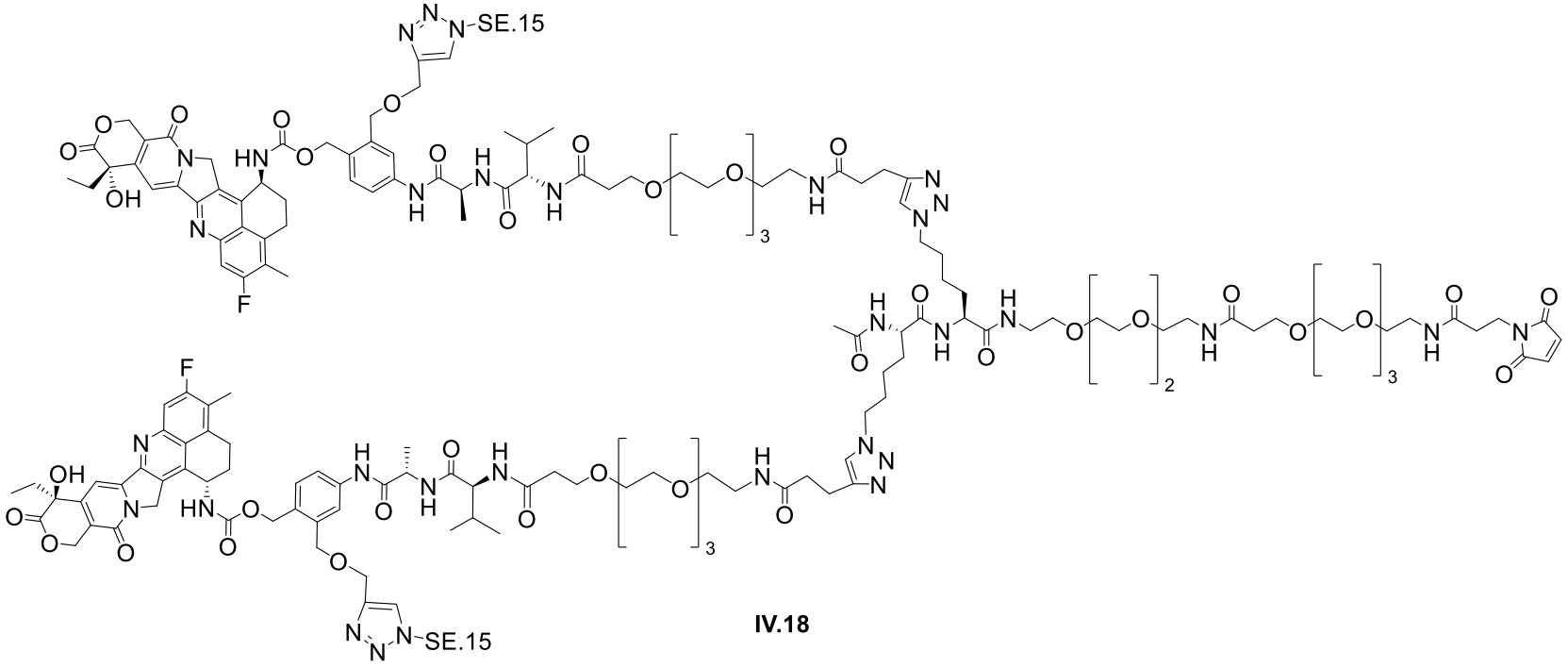


IV.17

El compuesto IV.**17** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**16** pero utilizando el intermediario 5.**2**. El compuesto IV.**17** (23,5 mg,

75 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{220}H_{314}F_2N_{52}O_{66}$. HPLC (método J): t_R= 13,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1594,2 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1593,8 $[M+3H]^{3+}$

<u>Ejemplo 20 - Síntesis del compuesto IV.18</u>



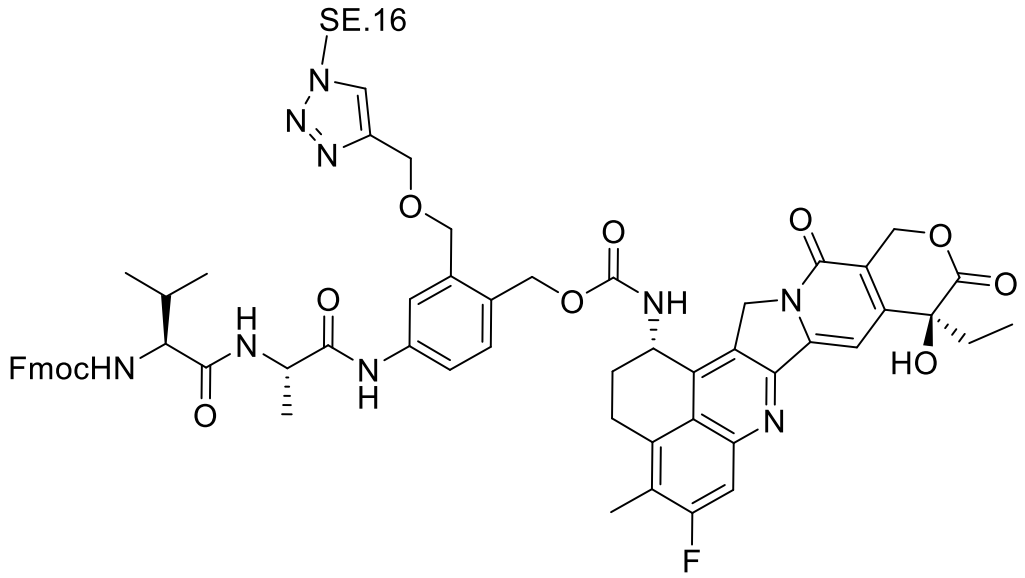
IV.18

El compuesto IV.**18** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**16** pero utilizando **los intermediarios 3,2** y **5,2**. El compuesto IV.**18**

(15,9 mg, 57 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{224}H_{320}F_2N_{54}O_{66}$. HPLC (método J): t_R= 12,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1621,8 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1621,1 $[M+3H]^{3+}$

<u>Ejemplo 21 - Síntesis del compuesto IV.19</u>

Síntesis de **I.19**

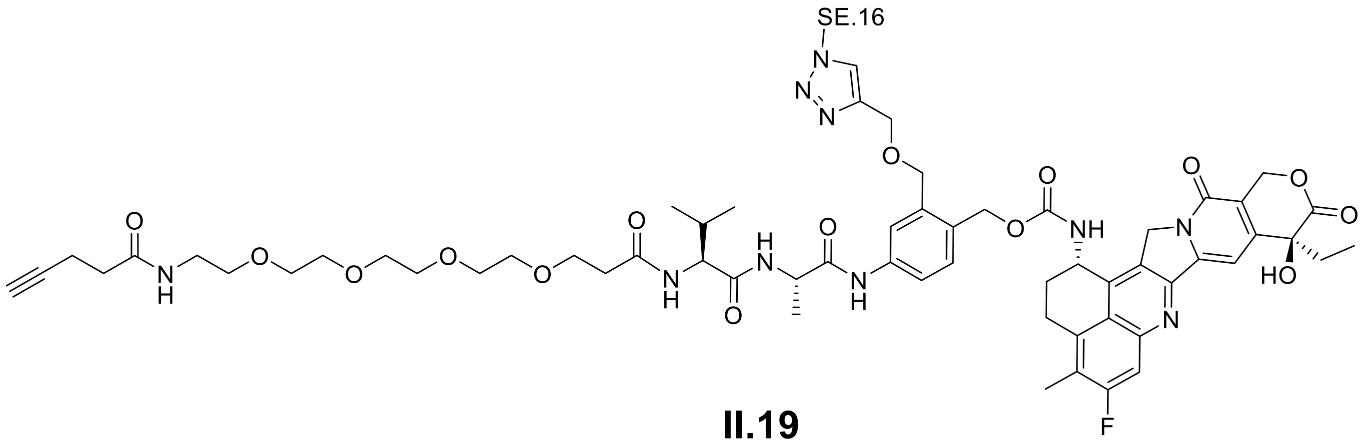


I.19

El intermediario **I.19** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermediario 6.**1** (64,31 mg, 86,11 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**3** (60,0 mg, 57,4 µmol, 1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (14,3 mg, 57,4 µmol, 1 equiv.), THPTA (50,08 mg, 115,2 µmol, 2 equiv.) y ascorbato

sódico (34,38 mg, 173,5 µmol, 3 equiv.) en DMF/agua (1,72 mL, 2:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.17** (76,18 mg, 74 %) como un sólido amarillento. $C_{87}H_{111}FN_{12}O_{28}$. HPLC (método B): t_R= 16,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 896,7 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 896,4 $[M+2H]^{2+}$

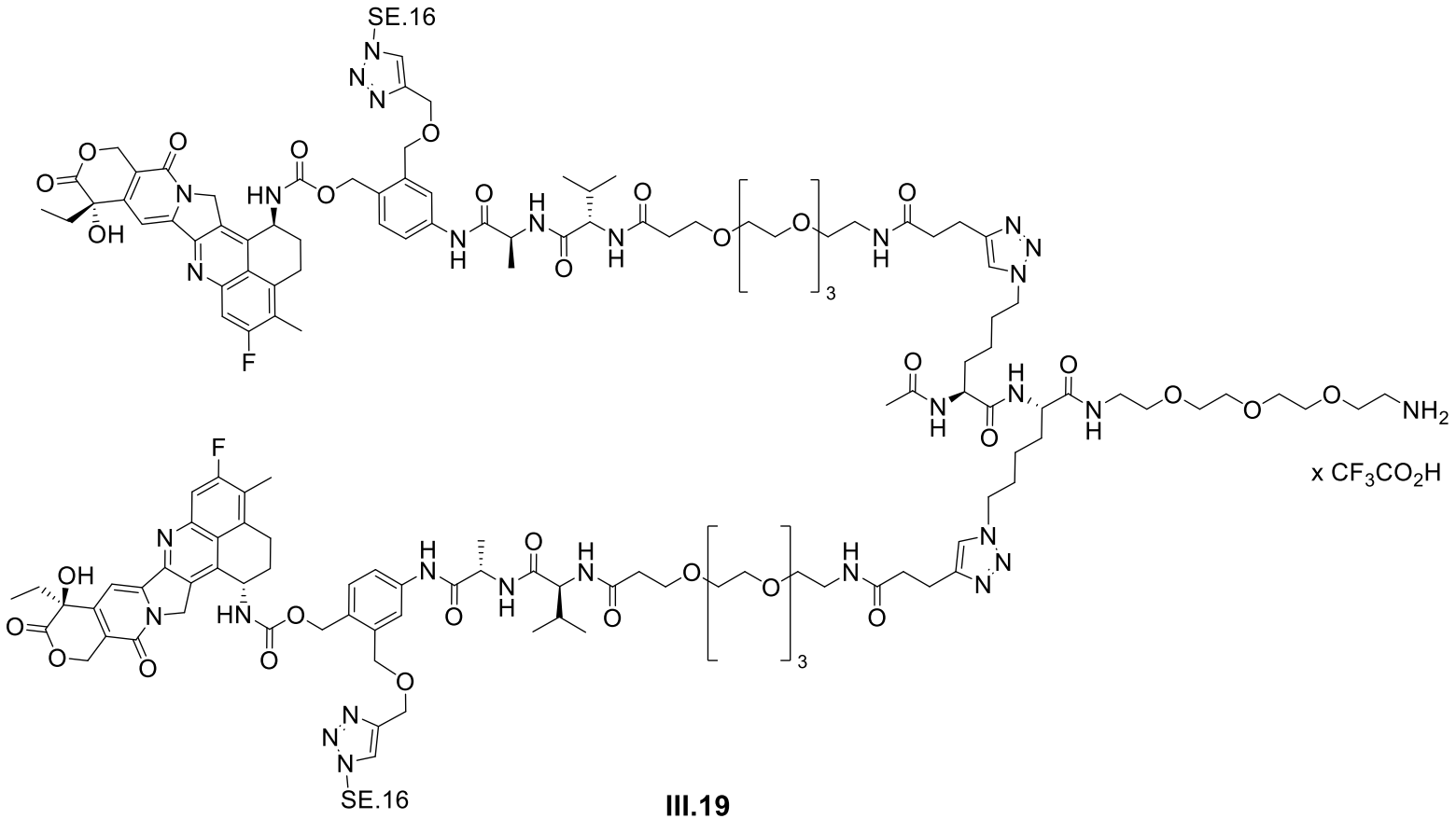
Síntesis de **II.19**



II.19

El intermediario **II.19** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.19** (76,18 mg, 42,51 µmol, 1 equiv.), dietilamina (105 µL, 1020 µmol, 24 equiv.) en 5 mL de DMF (abs.) para la desprotección Fmoc y **el intermediario 3.2** (31,28 mg, 63,8 µmol, 1,5 equiv.), diisopropiletilamina (21,7 µL, 127,5 µmol, 3 equiv.) en DMF (1 mL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.19** (38,97 mg, 48 %) como un sólido amarillento. $C_{88}H_{126}FN_{13}O_{32}$. HPLC (método N): t_R= 16,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 949,6 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 948,9 $[M+2H]^{2+}$

Síntesis de **III.19**



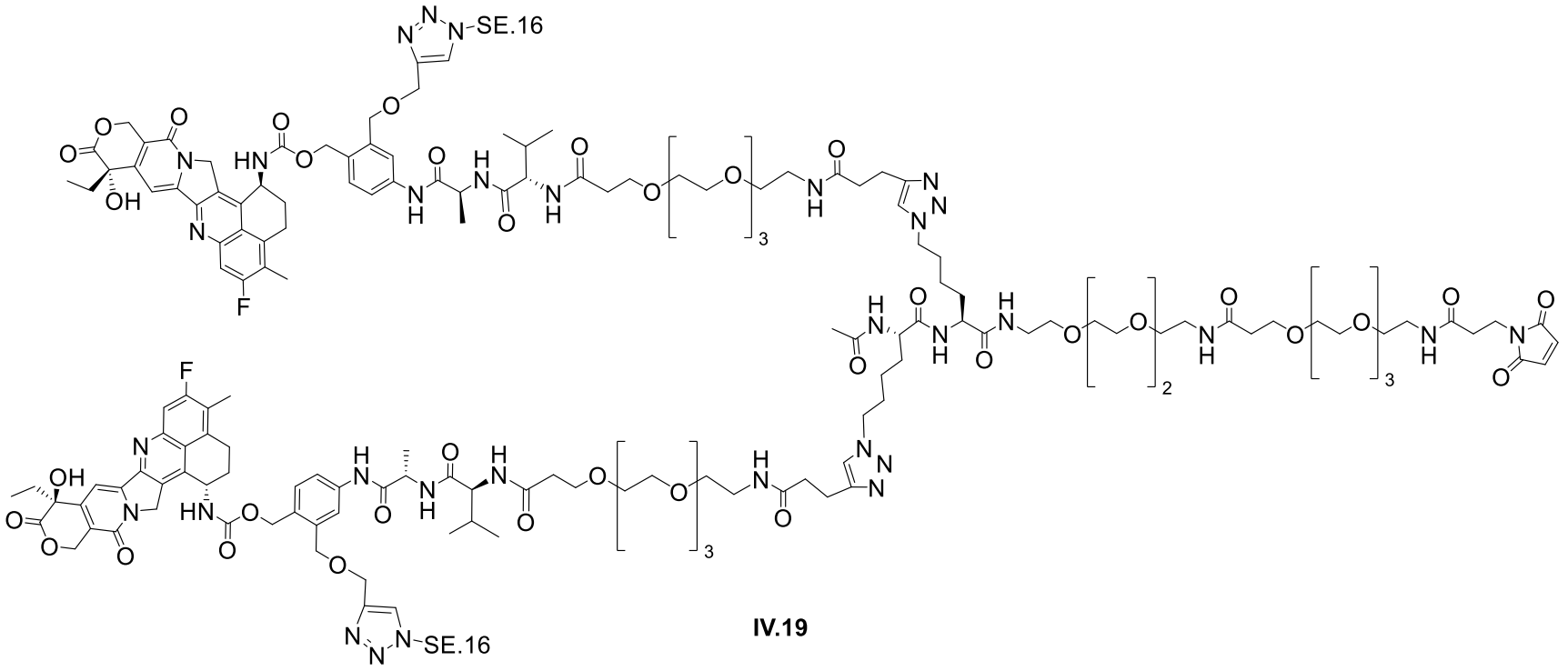
III.19

El intermediario **III.19** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (4,96 mg, 8,6 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.19** (38,97 mg, 20,5 µmol, 2,4 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (2,57 mg, 10,3 µmol, 1,2 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (8,95 mg, 20,6 µmol, 2,4 equiv.) y ascorbato sódico (6,10 mg, 30,8 µmol, 3,6 equiv.) en DMF/agua (1,13 mL, 10:1). Después de 3 h, se añadió de nuevo la

misma cantidad de catalizador y la solución se agitó durante 40 min más a temperatura ambiente. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **III.19** (29,03 mg, 76 %) como un sólido amarillento. $C_{198}H_{294}F_2N_{36}O_{70}$. HPLC (método O): t_R= 12,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1446,6 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1245,7 $[M+3H]^{3+}$

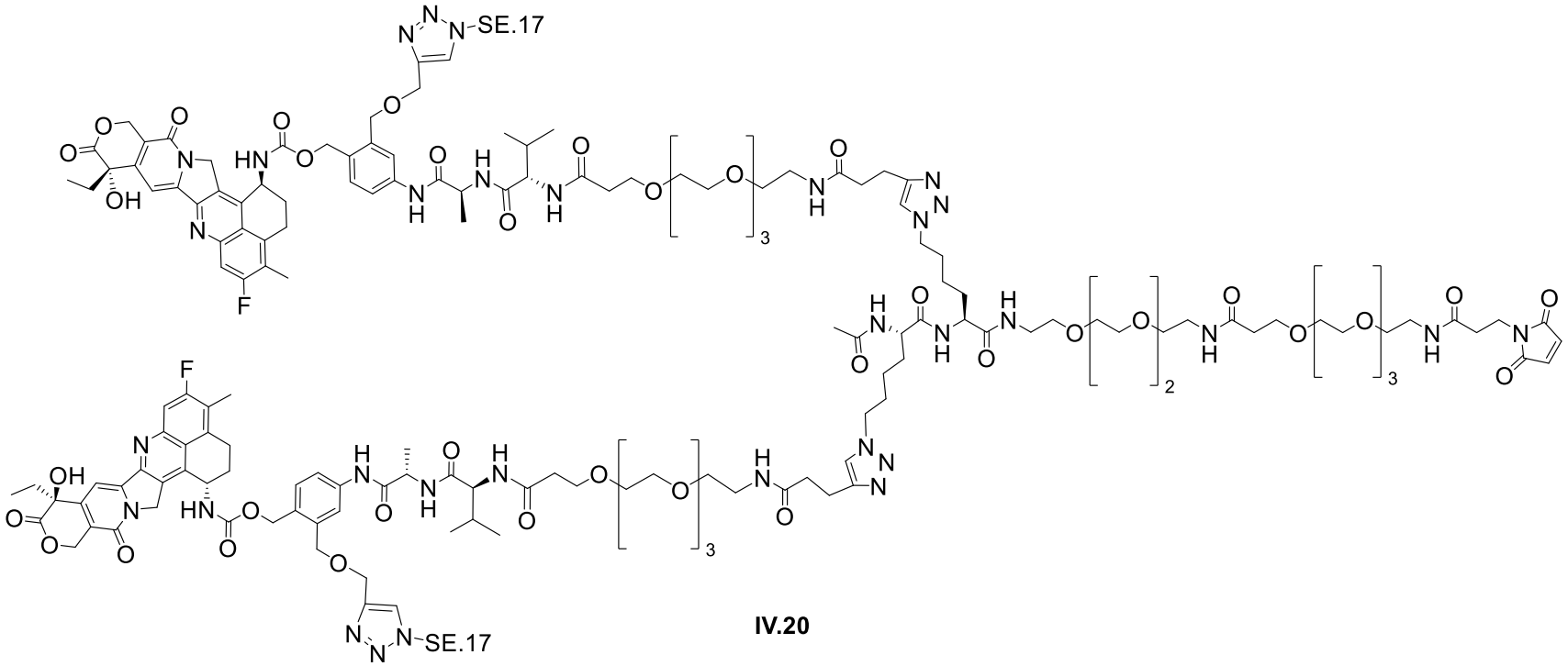
Síntesis de IV.**19**

El compuesto IV.**19** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermediario **III.19** (29,03 mg, 6,5 µmol, 1 equiv.), *N*-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,5-*dioxo-1H-pirrol-1-propanamida*= Mal-PEG4-NHS-éster (13. µl, 26,1 µmol, 4 equiv.) y DIPEA (4,43 µl, 26,1 µmol, 1 equiv.),40 mg, 26,1 µmol, 4 equiv.) y DIPEA (4,43 µL, 26,1 µmol, 4 equiv.) en DMF (0,78 mL). Tras 1,5 h, el producto se precipitó en MTBE frío acidificado con TFA (6 equiv.) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**17** (21,48 mg, 70 %) como un sólido amarillento. $C_{216}H_{320}F_2N_{38}O_{78}$. HPLC (método J): t_R= 13,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1578,7 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1578,4 $[M+3H]^{3+}$



IV.19

<u>Ejemplo 22 - Síntesis de IV.20</u>

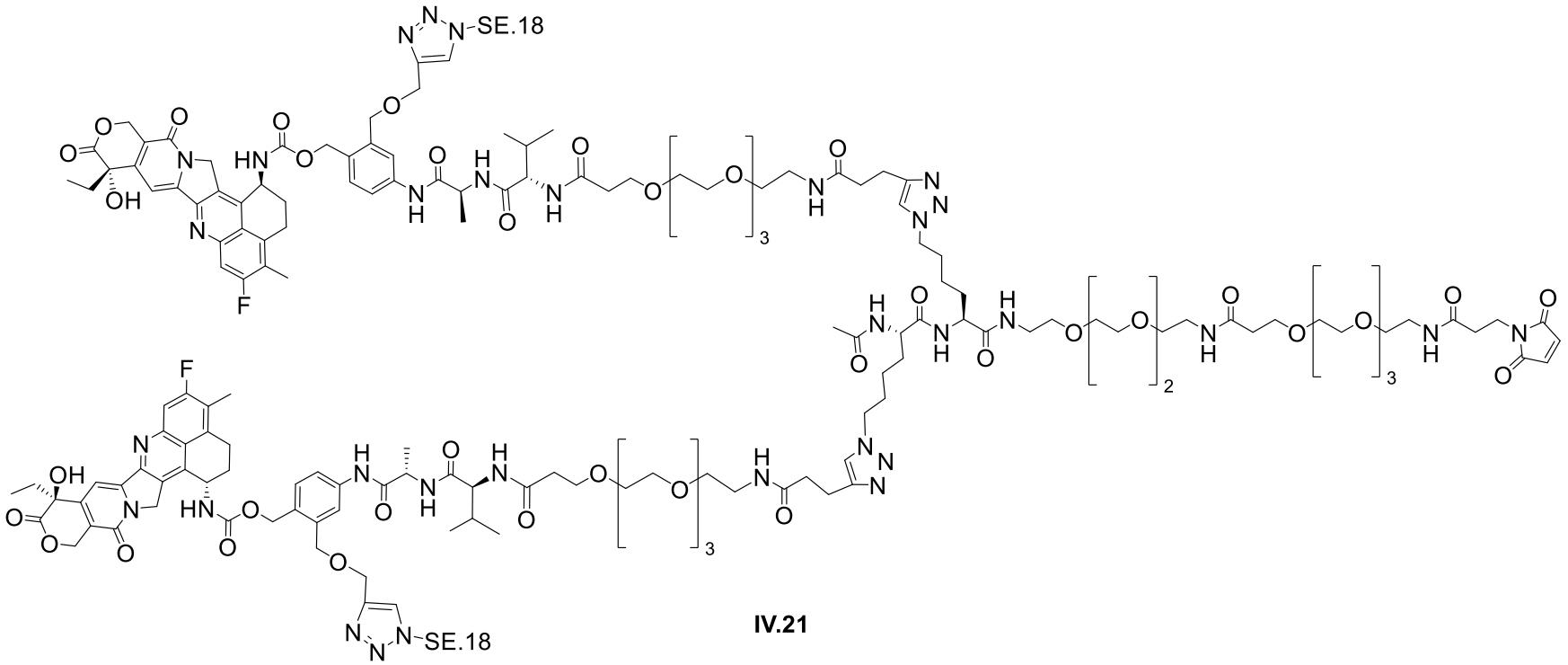


IV.20

El compuesto IV.**20** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto IV.**19** pero utilizando **el intermediario 6.2**. El compuesto IV.**20** (14,34 mg, 31 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{192}H_{276}F_2N_{34}O_{64}$. HPLC (método J): t_R= 13,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1374,9

$[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1374,3 $[M+3H]^{3+}$

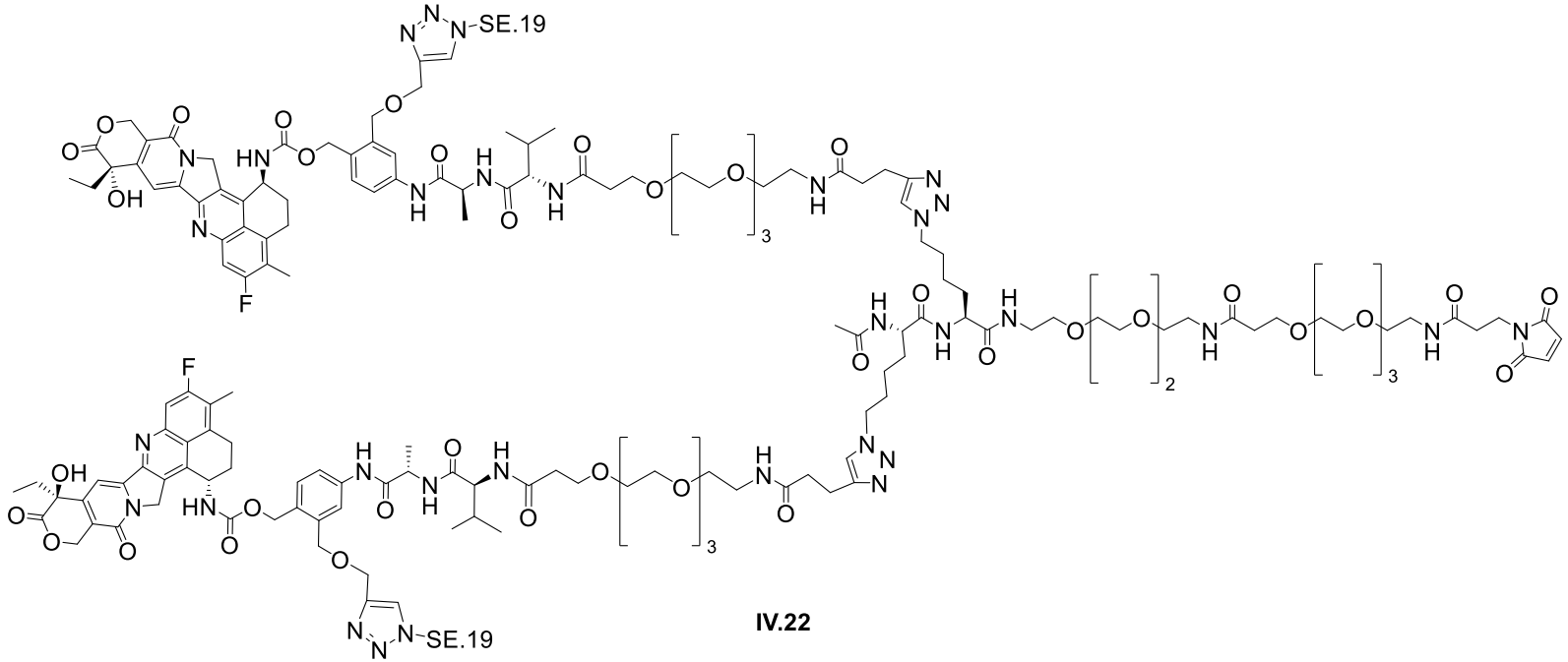
Ejemplo 23 - Síntesis de IV.21



IV.21

El compuesto IV.**21** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto IV.**19** pero utilizando **el intermediario 6.3**. El compuesto IV.**21** (17,83 mg, 64 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{216}H_{320}F_2N_{38}O_{78}$. HPLC (método J): t_R= 13,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1579,1 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1578,4 $[M+3H]^{3+}$

Ejemplo 24 - Síntesis de IV.22

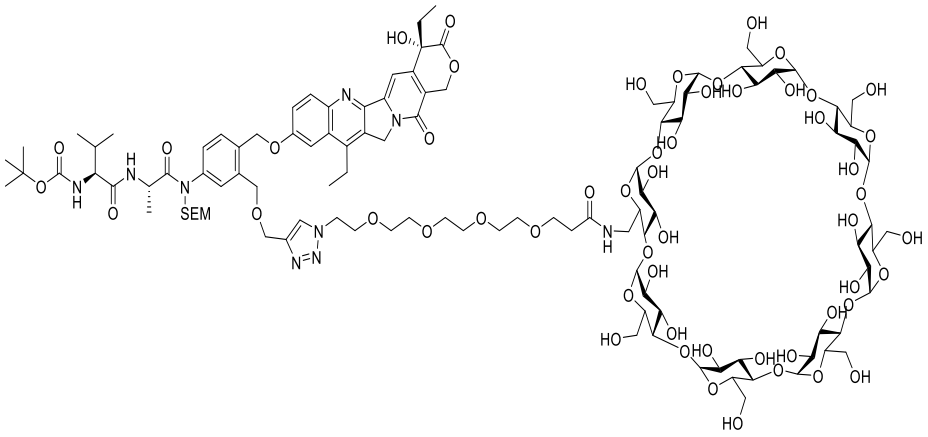


IV.22

El compuesto IV.**22** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**19** pero utilizando **el intermediario 6.4**. El compuesto IV.**22** (27,9 mg, 55 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{232}H_{352}F_2N_{38}O_{86}$. HPLC (método J): t_R= 13,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1697,0 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1695,8 $[M+3H]^{3+}$

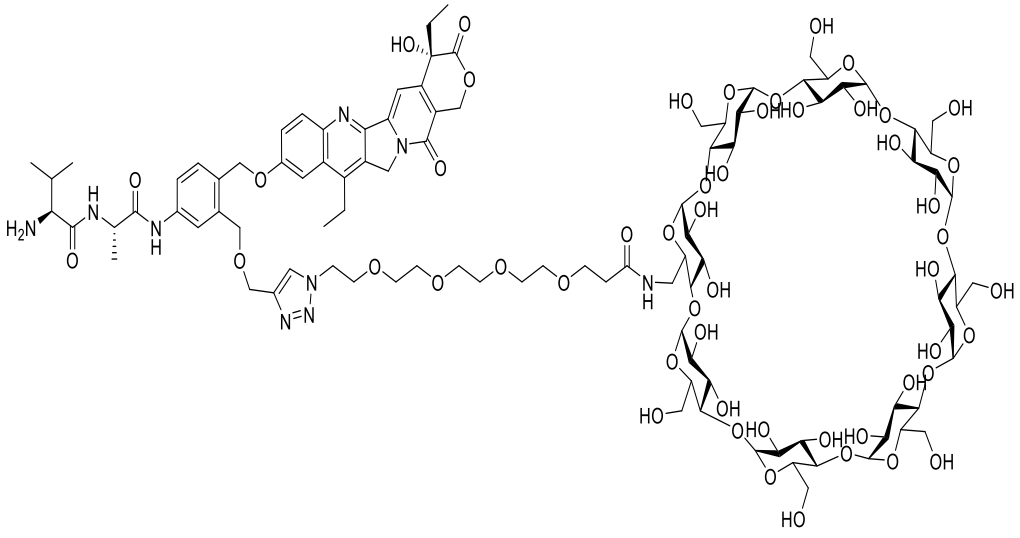
<u>Ejemplo 25 - Síntesis de IV.23</u>

Síntesis de **I.23a**



El compuesto **I.23a** se sintetizó según GP1 usando el intermediario 4.6 (65 mg, 41,4 µmol, 1 equiv.), el intermediario 4.**6** (40 mg, 41,4 µmol, 1,0 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (2,1 mg, 8,3 µmol, 0,2 equiv.), THPTA (4,5 mg, 10,3 µmol, 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (4,1 mg, 20,7 µmol, 0,5 equiv.) en DMF/agua (640 µL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.23a** (113 mg, cuant.) HPLC (método **A** (380 nm)): t_R = 10,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1267,3 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1268,52

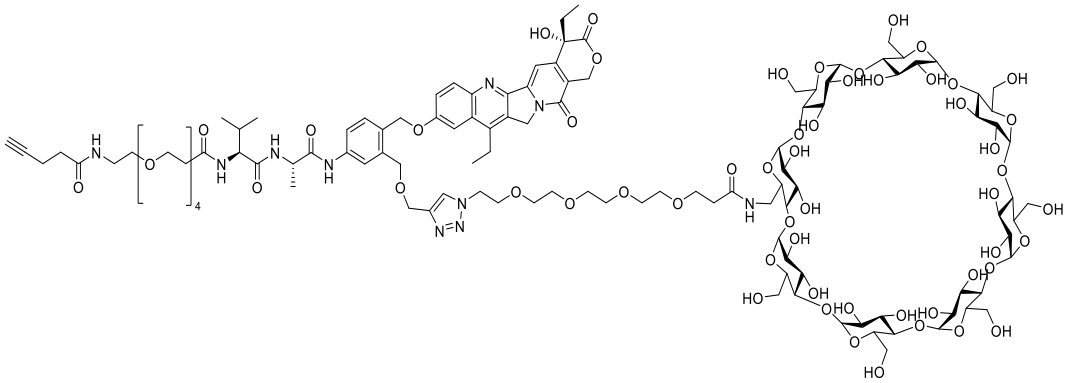
Síntesis de **I.23b**



El intermediario **I.23a** (113,5 mg, 41 µmol, 1 equiv.) se disolvió en TFA (3,14 mL, 41 mmol, 1000 equiv.). La mezcla de reacción resultante se hizo girar en un evaporador rotatorio a 400 mbar a temperatura ambiente. Después de 2 minutos, la solución se concentró hasta sequedad. El residuo se disolvió en 3 mL de H2O y se ajustó a pH= 10 añadiendo gota a gota 1,2 mL de amoniaco acuoso al 3,2 % a

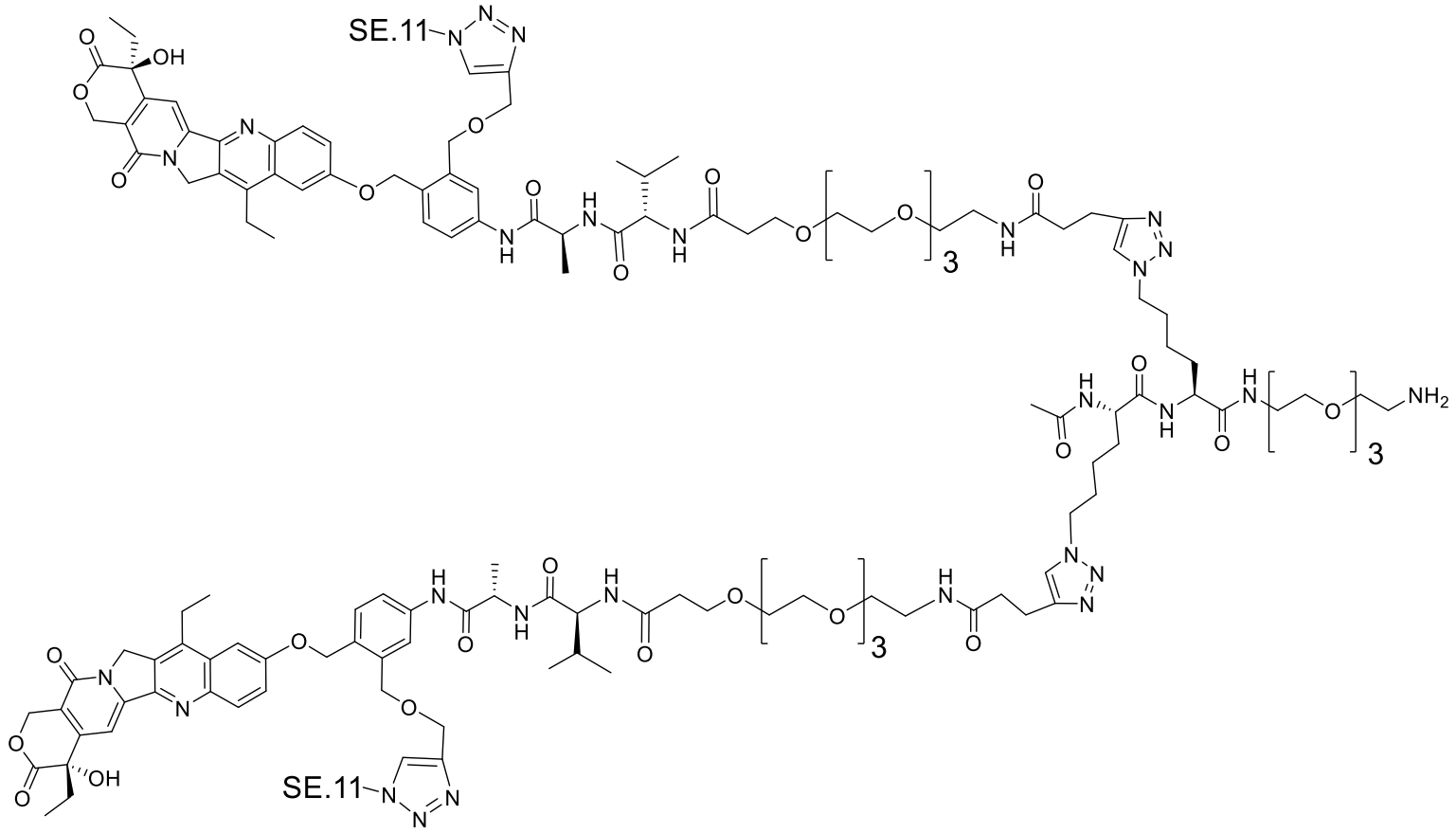
temperatura ambiente. La mezcla resultante se liofilizó durante una noche para obtener el intermediario **I.23b** como un liofilizado amarillento (0,047 g, 45 %). HPLC (método **A** (380 nm)): t_R = 7,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1152,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1153,46

Síntesis de **II.23**



El intermediario **I.23b** (0,047 g, 0,02 mmol, 1 equiv.) se disolvió en 0,28 mL de DMF seca. Bajo atmósfera de argón se añadieron el intermediario 3.2 (0,01 g, 0,022 mmol, 1,1 equiv.) y DIPEA (0,0011 mL, 0,061 mmol, 3 equiv.). La solución se agitó a temperatura ambiente y el progreso se siguió por RP-HPLC. Una vez completada (~1 h), la mezcla de reacción se neutralizó con TFA y se purificó directamente sin pretratamiento por HPLC preparativa para obtener el intermediario **II.23** como un liofilizado amarillento (0,041 mg, 78 %). HPLC (método **N** a 380 nm)): t_R = 13,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1316,2 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1317,04 ----------

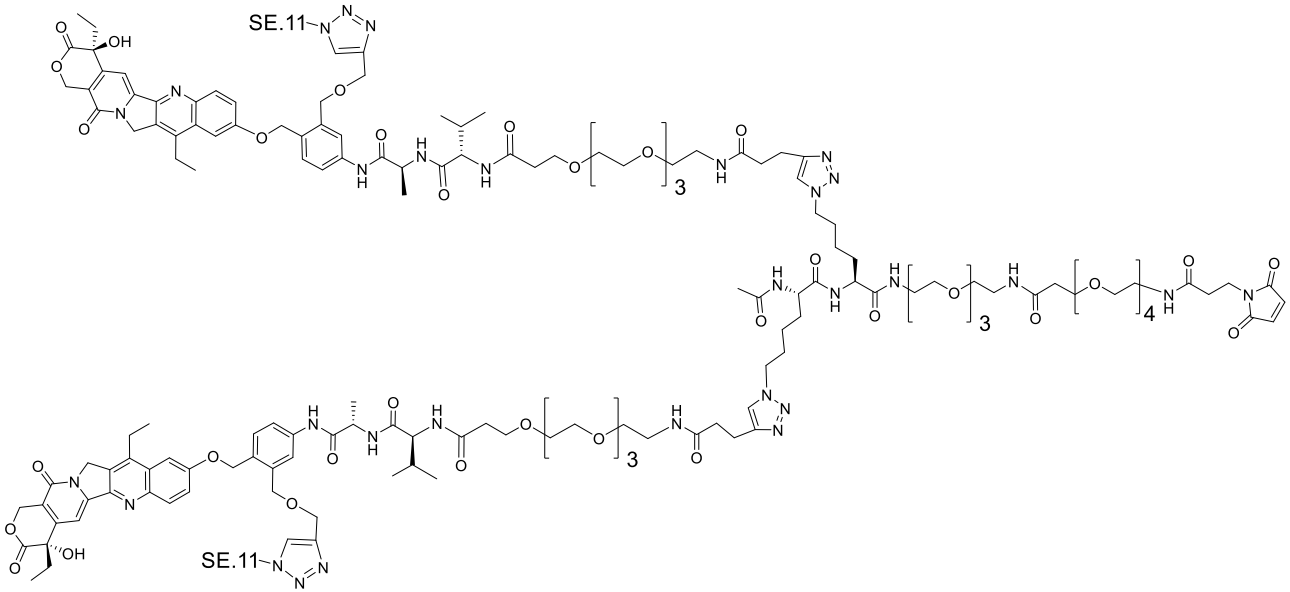
Síntesis de **III.23**



El intermediario **III.23** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (4,6 mg, 7,9 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.23** (45,5 mg, 17,3 µmol, 2,2 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (4,92 mg, 19,7 µmol, 2,5 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (17,1 mg,

39,3 µmol, 5 equiv.) y ascorbato sódico (11,7 mg, 59 µmol, 7,5 equiv.) en DMF/agua (385,4 µL, 10:1). Tras 2 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento por HPLC prep. para obtener el intermediario **III.23** como un liofilizado amarillento (21,9 mg, 48 %). $C_{254}H_{382}N_{30}O$. HPLC (método O): t_R= 12,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1936,2 $[M+3H]^{3+}$, m/z calculado= 1936,16 $[M+3H]^{3+}$

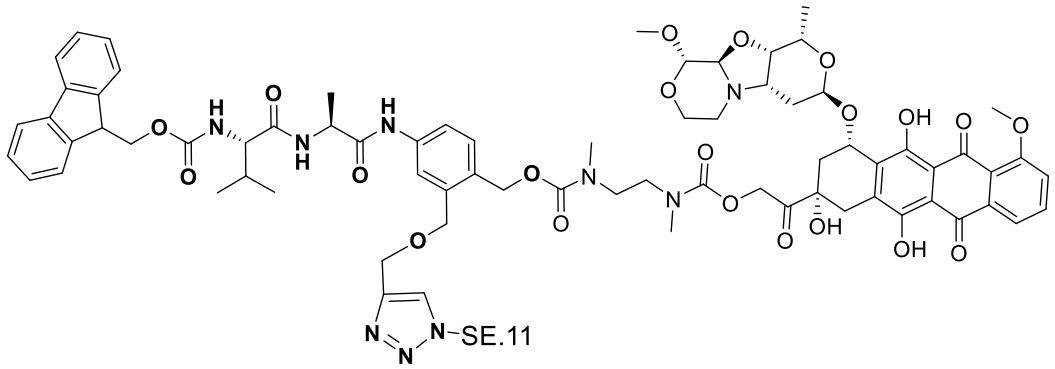
Síntesis de IV.**23**



El compuesto IV.**23** se sintetizó como se describe para el compuesto IV.**16**. El compuesto IV.**23** (10,3 mg, 44 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{272}H_{408}N_{32}O_{130}$. HPLC (método J): t_R= 12,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 15551,7 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1551,41 $[M+4H]^{4+}$

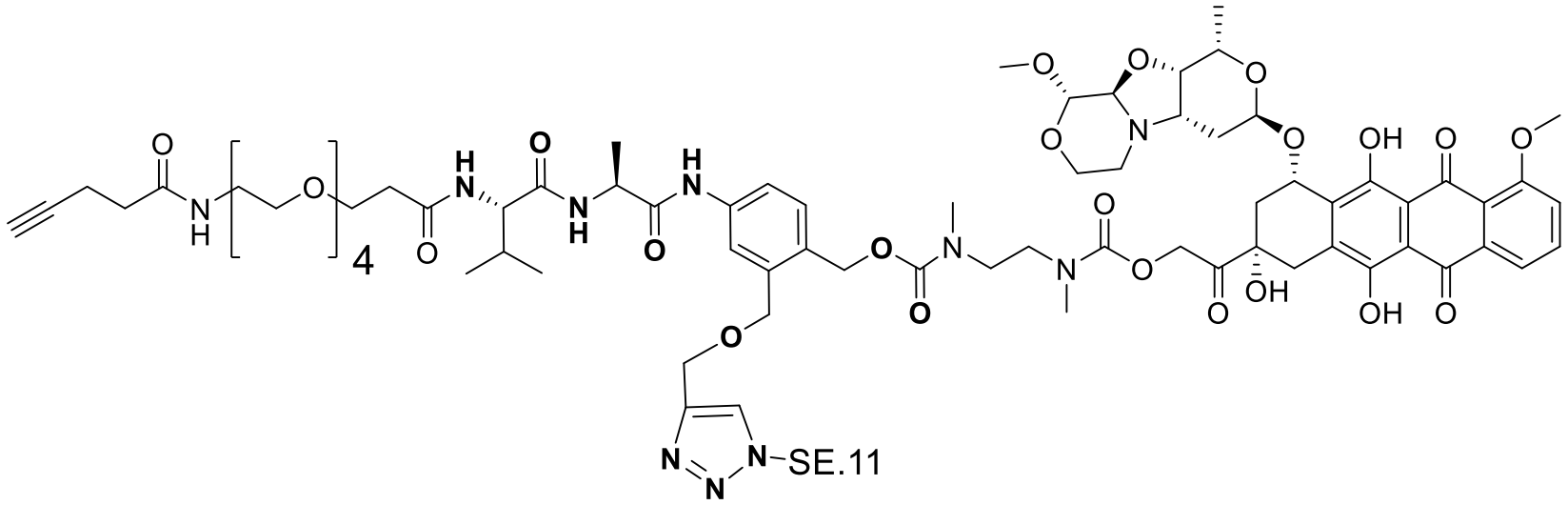
<u>Ejemplo 26 - Síntesis de IV.24</u>

Síntesis de **I.24**



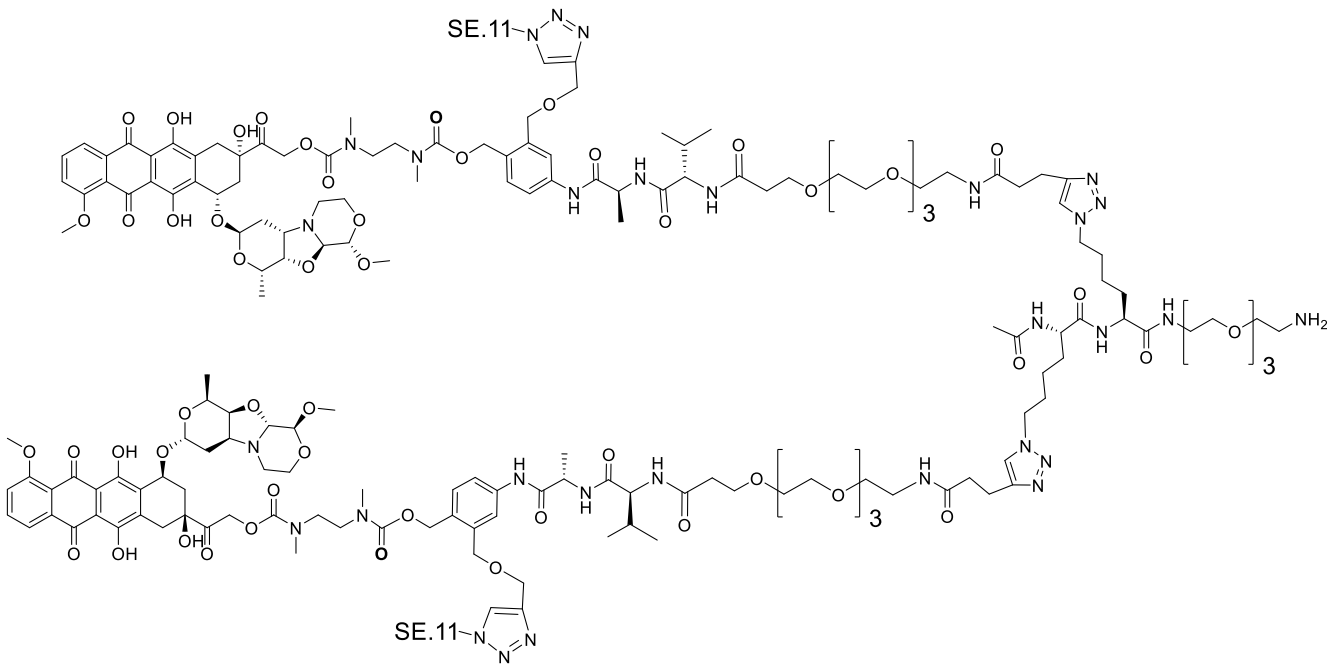
A una disolución agitada del intermediario 4.6 (31,5 mg, 20,1 µmol, 1 equiv.) y del intermediario 1.**16** (28,8 mg. 21,1 µmol, 1,05 equiv.) en 286 µL de DMF se añadieron 286 µL de DMF que contenía TBTA (2,66 mg, 5,02 µmol, 0,25 equiv.) y 57,2 µL de agua que contenía, sulfato de cobre(II) pentahidratado (1 mg, 4,02 µmol, 0,2 equiv.) y ascorbato de sodio (1,98 mg, 10 µmol, 0,5 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso se siguió por RP-UHPLC. Después de 15 min, la mezcla de reacción se añadió a 10 mL de acetona helada. El precipitado resultante se aisló por centrifugación, se resuspendió en 6 mL de acetona fría y se centrifugó de nuevo. El producto crudo (54,3 mg, 92 %) se utilizó sin purificación adicional. UHPLC (método **Q**): t_R = 2,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1467,0 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1468,06 ----------

Síntesis de **II.24**



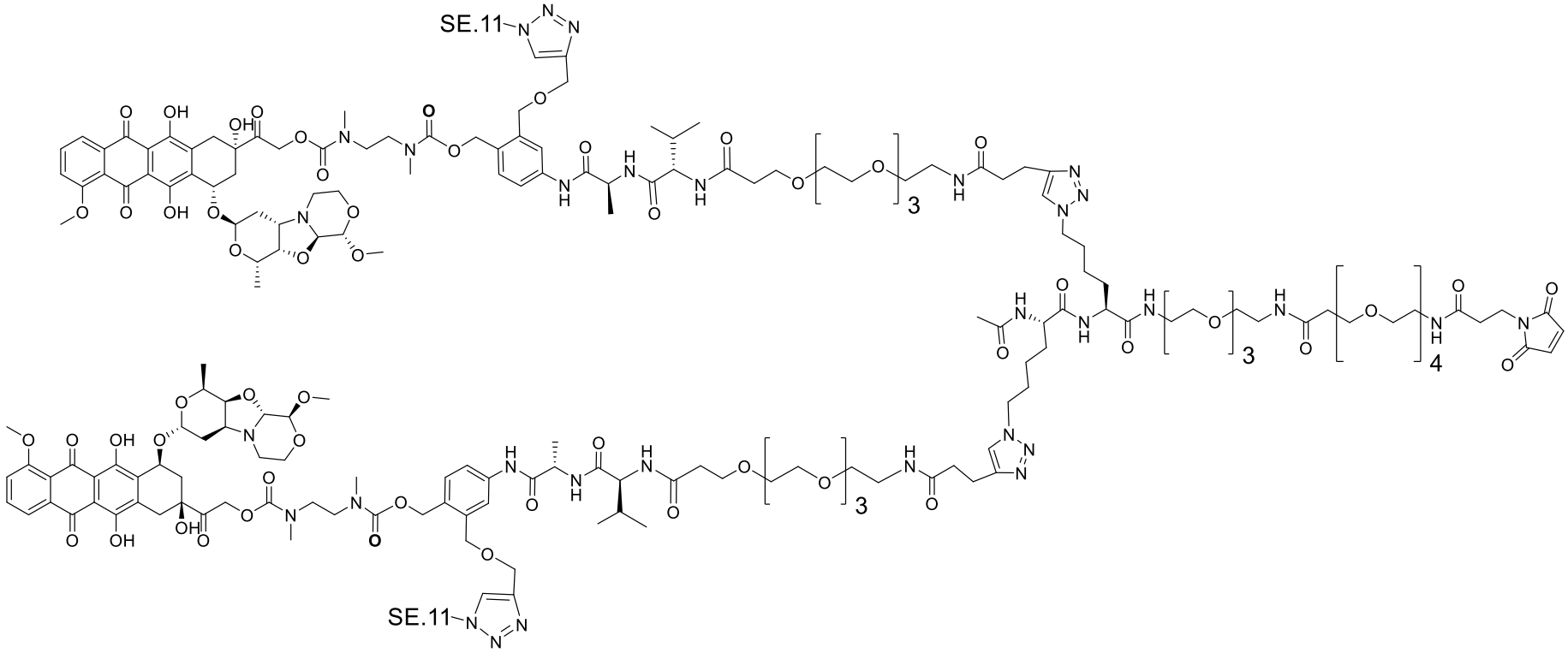
El intermediario **II.24** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.24** (54,3 mg, 18,5 µmol, 1 equiv.), 45,8 µL de dietilamina (444,6 µmol, 24 equiv.) en 272 µL de DMF para la desprotección por Fmoc y **el intermediario 3.2** (10 mg, 20,4 µmol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (7,57 µL, 55,5 µmol, 3 equiv.) en DMF (270 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.24** (17,2 mg, 31 %) como un sólido rojo. $C_{132}H_{195}N_{11}O_{69}$. HPLC (método **R**): t_R= 2,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1520,61 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1520,0

Síntesis de **III.24**



El intermediario **III.24** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (1,98 mg, 3,14 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.24** (21 mg, 6,91 µmol, 2,2 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,96 mg, 7,85 µmol, 2,5 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (6,82 mg, 15,7 µmol, 5 equiv.) y ascorbato sódico (4,68 mg, 23,6 µmol, 7,5 equiv.) en DMF/agua (165 µL, 10:1). Después de 30 min se completó la reacción, y la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento por HPLC prep. para producir el intermediario **III.24** como un liofilizado rojo (6,1 mg, 33 %). $C_{286}H_{432}N_{32}O_{144}$. UHPLC (método **S**): t_R= 3,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1655,6 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1655,69 -

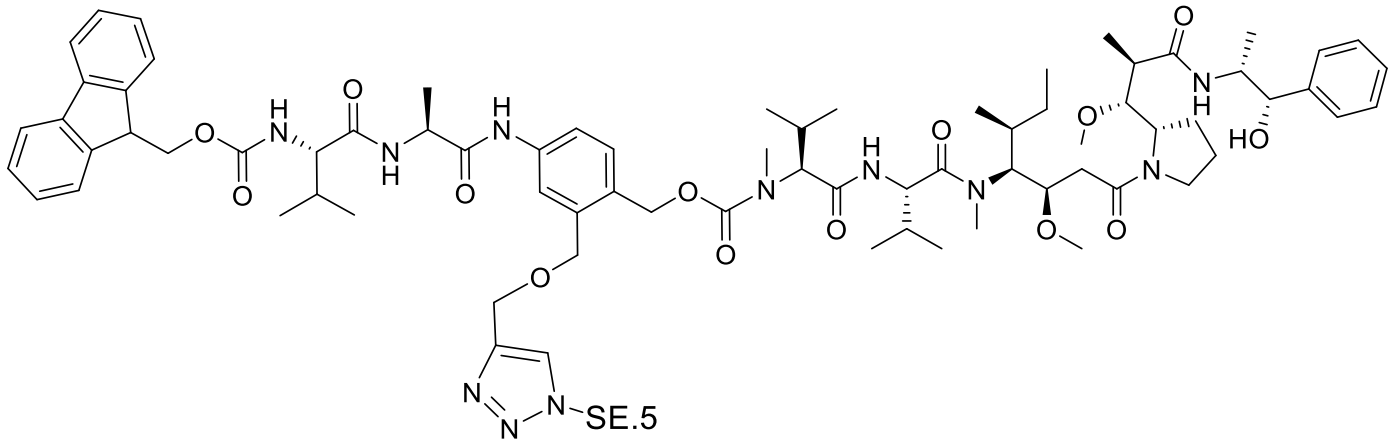
Síntesis de IV.**24**



El compuesto IV.**24** se sintetizó como se describe para el compuesto IV.**16**. El compuesto IV.**24** (2,87 mg, 39 %) se obtuvo como un sólido rojo. $C_{304}H_{458}N_{34}O_{152}$. UHPLC (método **T**): t_R= 5,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1755,0 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1755,23

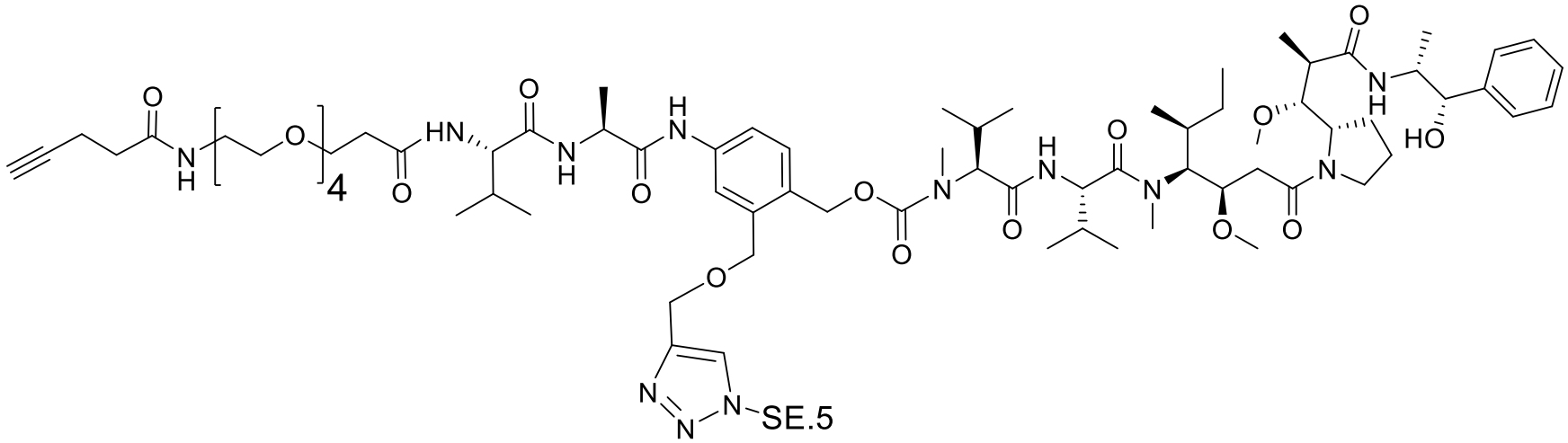
Ejemplo 27 - Síntesis de IV.25

Síntesis de **I.25**



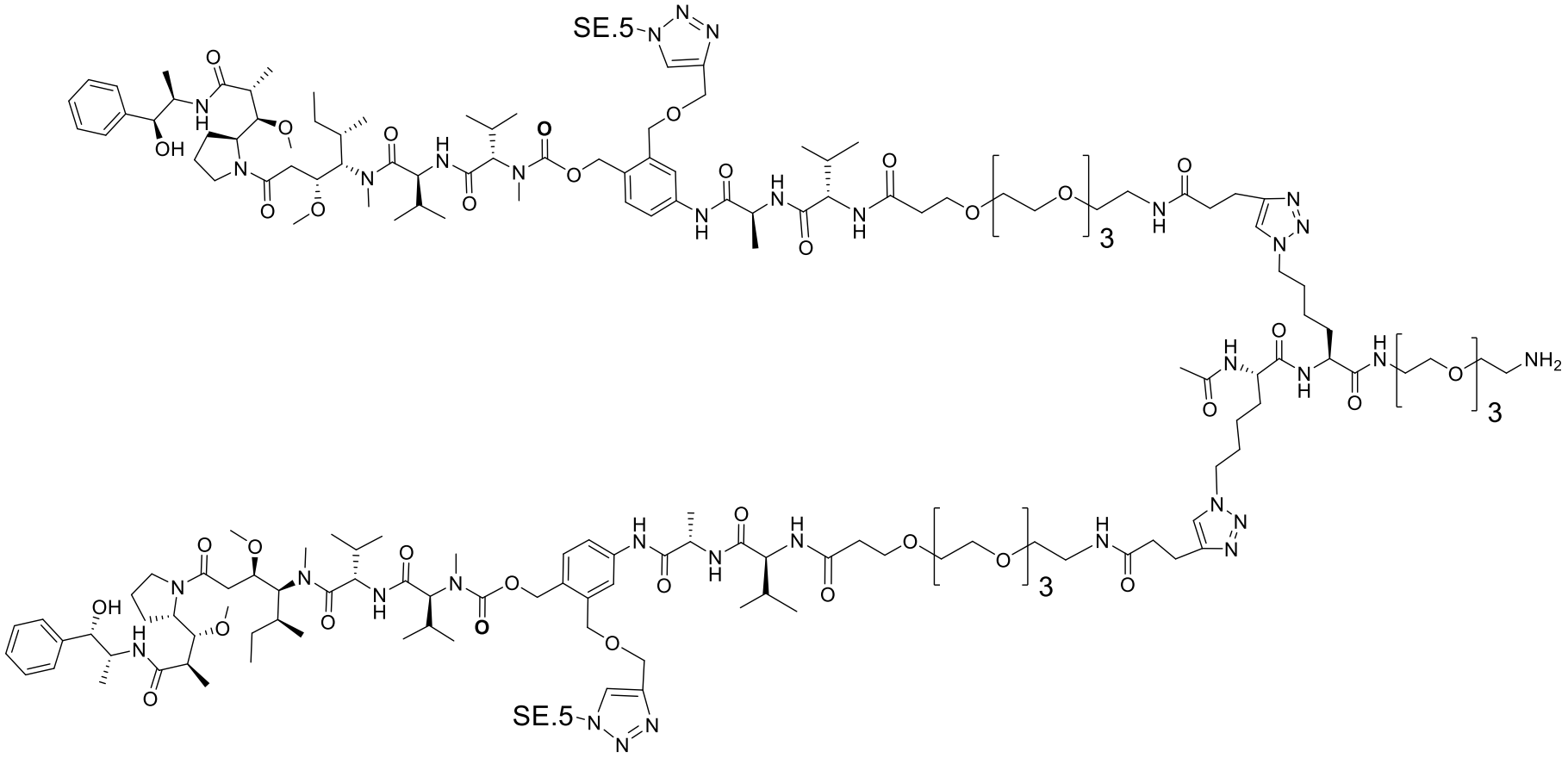
El intermediario **I.25** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermediario 4.**3** (56,46 mg, 35,6 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**6** (51,98 mg, 39,2 µmol, 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,87 mg, 7,1 µmol, 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (4,7 mg, 8,9 µmol, 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (3,5 mg, 17,8 µmol, 0,5 equiv.) en DMF/agua (1188 µL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.25** como un sólido incoloro (69,98 mg, 68 %) HPLC (método **Q** a 290 nm y TFA como aditivo): t_R = 2,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1328,9 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1327,75.

Síntesis de **II.25**



El intermediario **II.25** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.25** (69,98 mg, 24,04 µmol, 1 equiv.), 59,4 µL de dietilamina (577 µmol, 24 equiv.) en 3,5 mL de DMF para la desprotección por Fmoc y **el intermediario 3.2** (13 mg, 26,44 µmol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (12,6 µL, 72,12 µmol, 3 equiv.) en DMF (350 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.25** (36 mg, 50 %) como un sólido incoloro. $C_{136}H_{223}N_{13}O_{61}$. HPLC (método **Q** con TFA como aditivo): t_R= 2,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1509,1 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1508,24

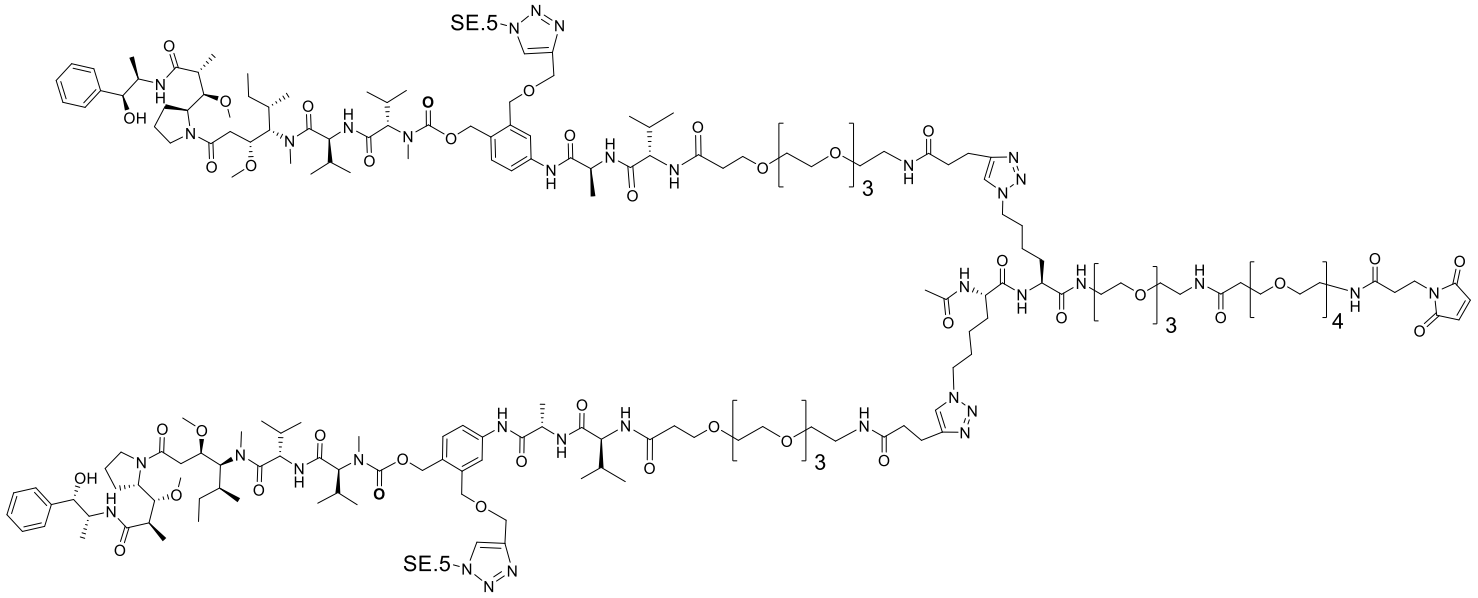
Síntesis de **III.25**



El intermediario **III.25** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (1,53 mg, 2,66 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.25** (20 mg, 6,64 µmol, 2,5 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (0,8 mg, 3,32 µmol, 1,25 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (2,89 mg,

6,64 µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (1,97 mg, 9,96 µmol, 3,75 equiv.) en DMF/agua (130,9 µL, 10:1). Tras 45 min, se añadió la misma cantidad de $CuSO_4$ x $5H_2O$, THPTA y ascorbato de sodio a la mezcla de reacción. Tras 2,5 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento por HPLC prep. para producir el intermediario **III.25** como un liofilizado incoloro (12,57 mg, 72 %). $C_{294}H_{488}N_{36}O_{128}$. UHPLC (método **U**): t_R= 2,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1644,9 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1643,82

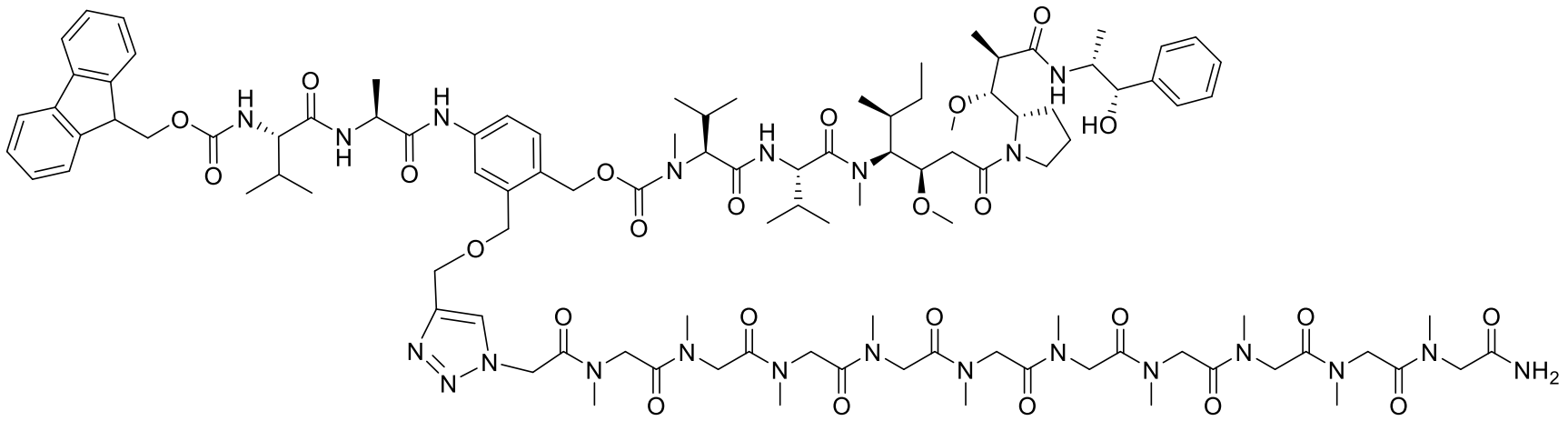
Síntesis de IV.**25**



El compuesto IV.**25** se sintetizó como se describe para el compuesto IV.**16**. El compuesto IV.**25** (8,15 mg, 62 %) se obtuvo como un sólido incoloro. $C_{312}H_{514}N_{38}O_{136}$. UHPLC (método **T**): t_R= 3,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1744,6 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1744,12

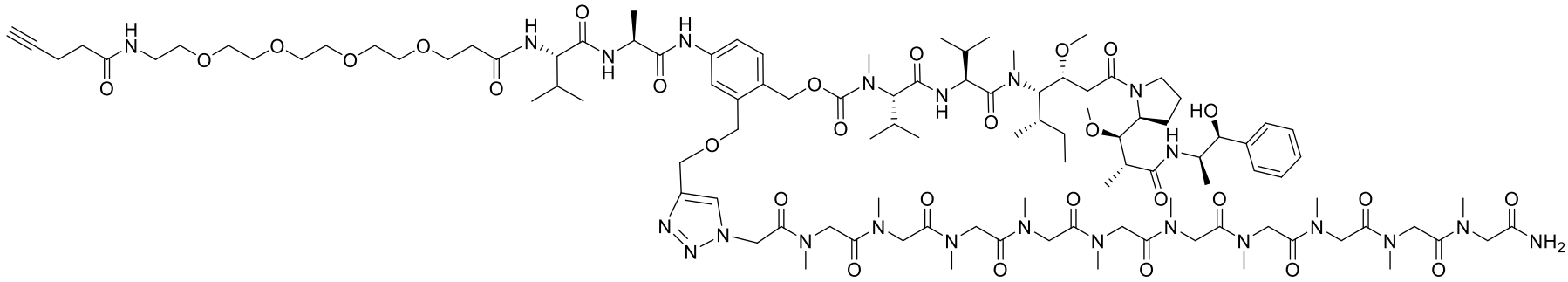
<u>Ejemplo 28 - Síntesis de IV.26</u>

Síntesis de **I.26**



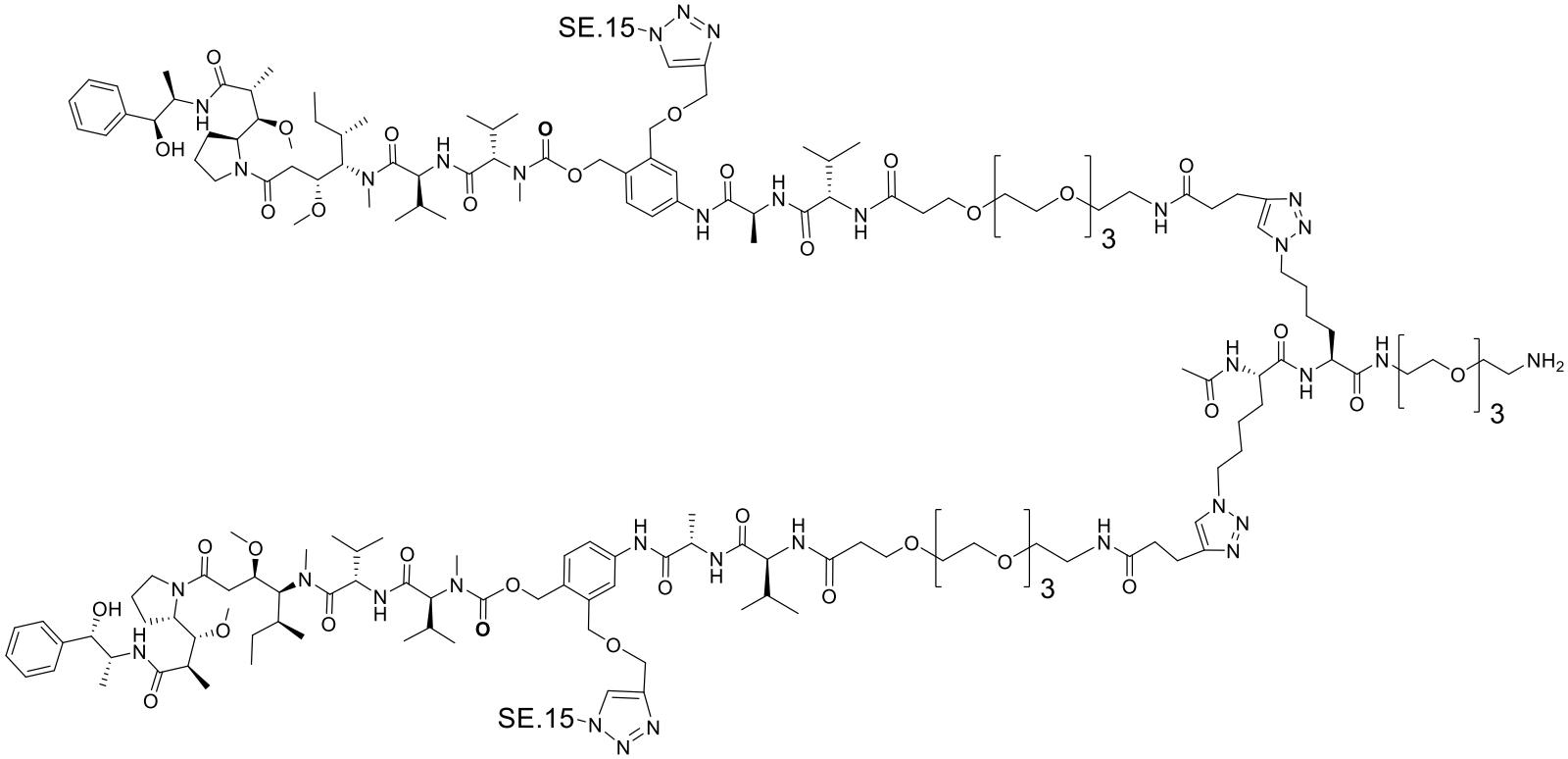
El intermediario **I.26** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermediario 5.**2** (29,3 mg, 35,8 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**6** (52,3 mg, 39,4 µmol, 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,79 mg, 7,2 µmol, 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (4,8 mg, 8,9 µmol, 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (3,6 mg, 17,9 µmol, 0,5 equiv.) en DMF/agua (1144 µL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.26** como un sólido incoloro (59,18 mg, 77 %) HPLC (método **Q** a 290 nm y TFA como aditivo): t_R = 2,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1070,1 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1069,58

Síntesis de **II.26**



El intermediario **II.26** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.26** (59,18 mg, 27,7 µmol, 1 equiv.), 68,4 µL de dietilamina (664 µmol, 24 equiv.) en 3 mL de DMF para la desprotección por Fmoc y el intermediario 3.**2** (15,2 mg, 30,9 µmol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (14,5 µL, 83 µmol, 3 equiv.) en DMF (296 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.26** (32,77 mg, 53 %) como un sólido incoloro. $C_{107}H_{171}N_{23}O_{29}$. HPLC (método **U**): t_R= 2,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1122,7 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1122,13

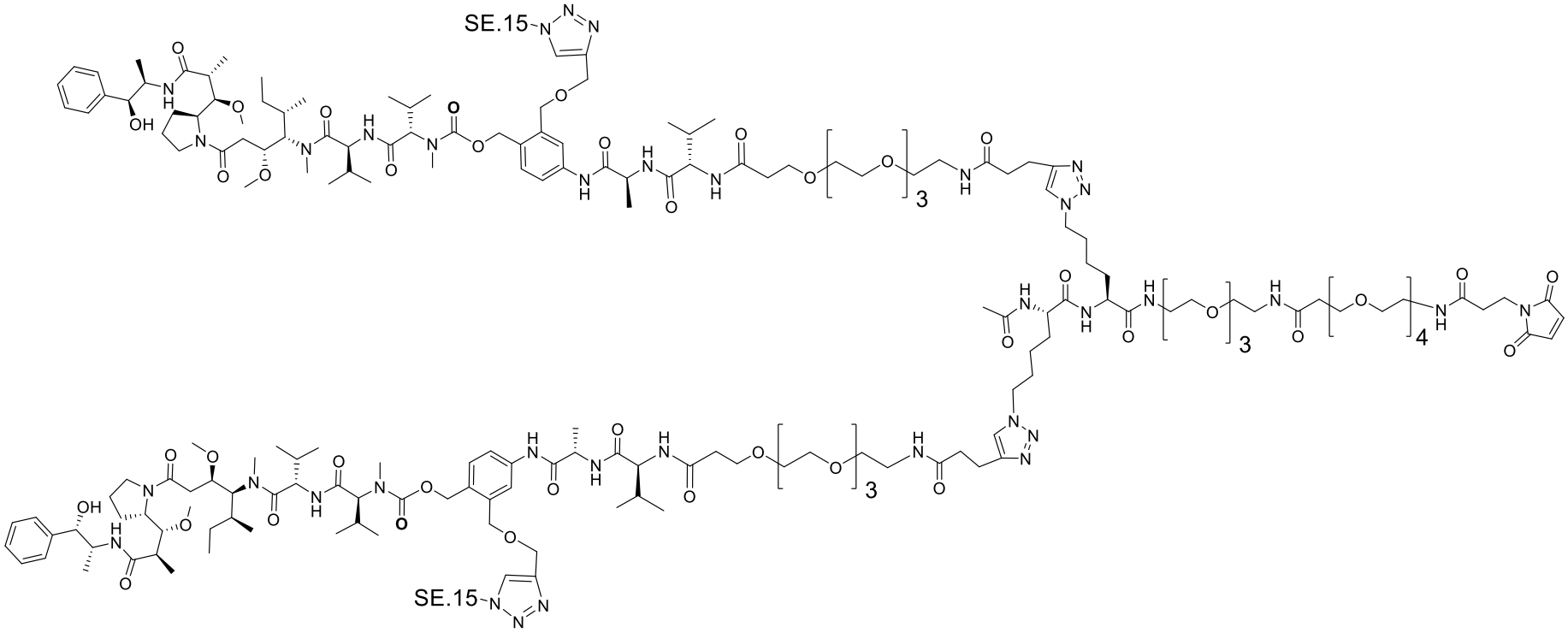
Síntesis de **III.26**



El intermediario **III.26** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermediario 2.**1** (3,36 mg, 5,8 µmol, 1 equiv.), el intermedioII.**26** (32,5 mg, 14,5 µmol, 2,5 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,81 mg, 7,25 µmol, 1,25 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (6,3 mg, 14,5 µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (4,3 mg, 21,7 µmol, 3,75 equiv.) en DMF/agua (286 µL, 10:1). Después de 30 min, se añadió la misma cantidad de $CuSO_4$ x $5H_2O$, THPTA y ascorbato de sodio a la mezcla de reacción. Tras 1,5 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción se

purificó directamente sin pretratamiento por HPLC prep. para producir el intermediario **III.26** como un liofilizado incoloro (22,9 mg, 78 %). $C_{236}H_{384}N_{56}O_{64}$. UHPLC (método **U**): t_R= 2,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1258,4 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1257,71

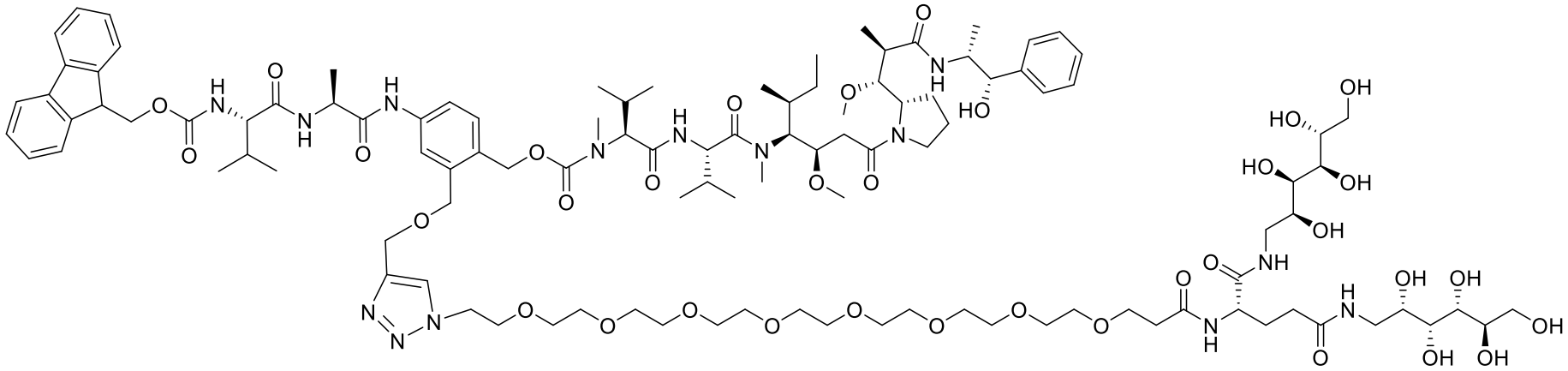
Síntesis de IV.**26**



El compuesto IV.**26** se sintetizó como se ha descrito para el compuesto IV.**16**. El compuesto IV.**26** (18,37 mg, 76 %) se obtuvo como un sólido incoloro. $C_{254}H_{410}N_{58}O_{72}$. UHPLC (método **U**): t_R= 3,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1358,2 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1358,01

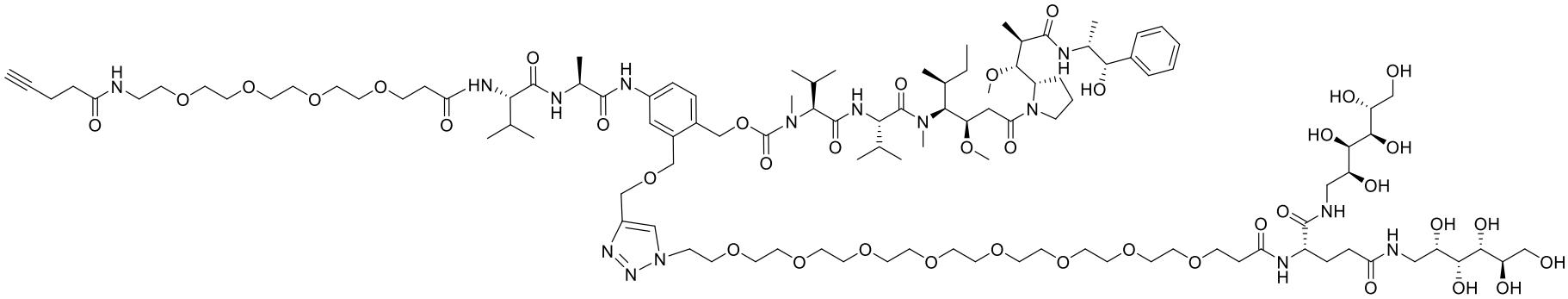
Ejemplo 29 - Síntesis de IV.27

Síntesis de **I.27**



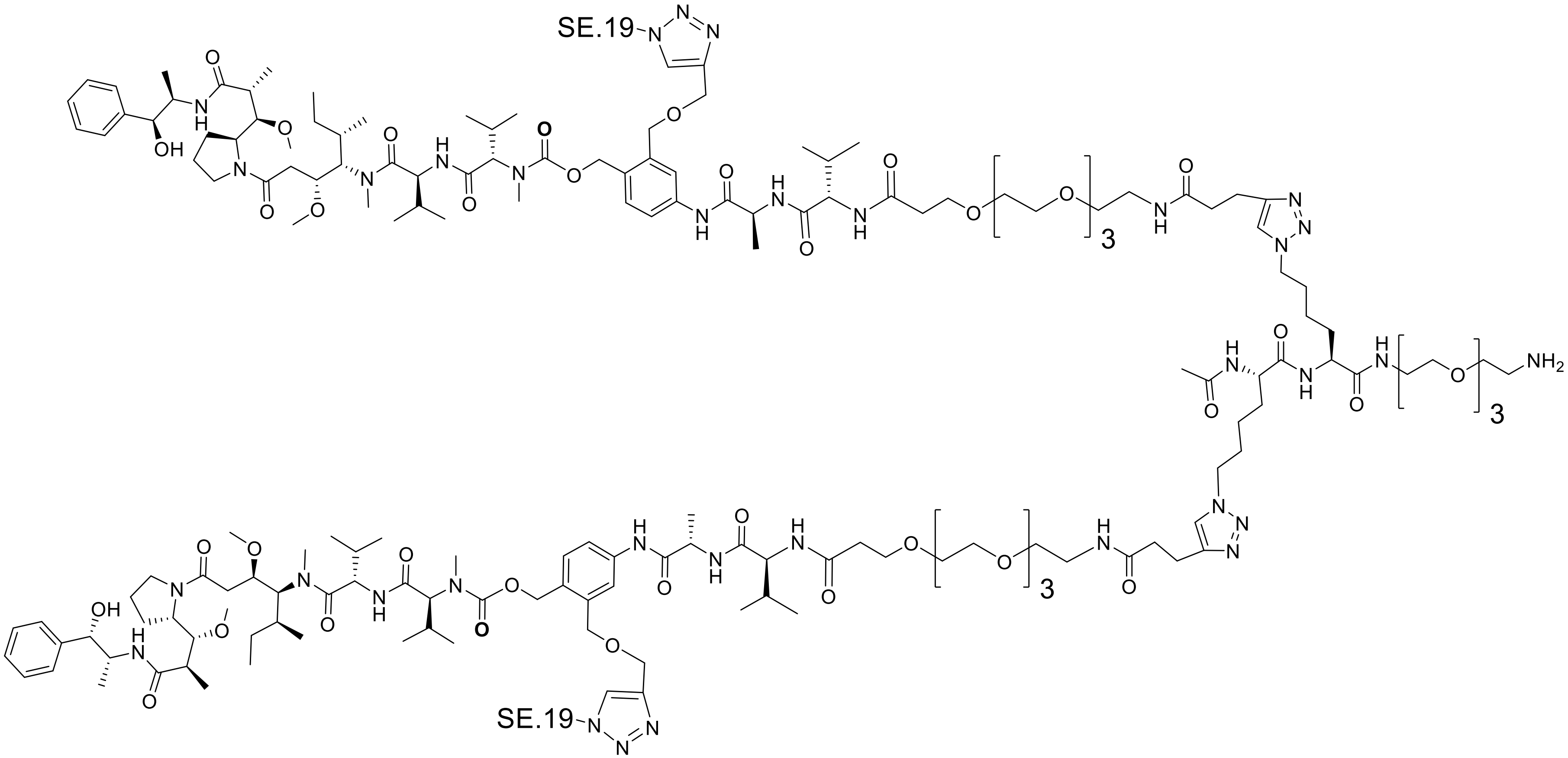
El intermediario **I.27** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermediario 6.4 (35,5 mg, 38,3 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**6** (55,5 mg, 41,8 µmol, 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,9 mg, 7,6 µmol, 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (5 mg, 9,5 µmol, 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (3,8 mg, 19 µmol, 0,5 equiv.) en DMF/agua (1221 µL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.27** como un sólido incoloro (68,01 mg, 80 %) HPLC (método **Q** a 290 nm y TFA como aditivo): t_R = 2,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1126,2 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1125,61

Síntesis de **II.27**



El intermediario **II.27** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.27** (68,01 mg, 30,2 µmol, 1 equiv.), 74,7 µL de dietilamina (725,3 µmol, 24 equiv.) en 3,4 mL de DMF para la desprotección Fmoc y **el intermediario 3.2** (16,3 mg, 33,24 µmol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (15,8 µL, 90,66 µmol, 3 equiv.) en DMF (340 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.27** (30,1 mg, 42 %) como un sólido incoloro. $C_{111}H_{187}N_{15}O_{39}$. HPLC (método **U**): t_R= 2,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1178,7 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1178,16

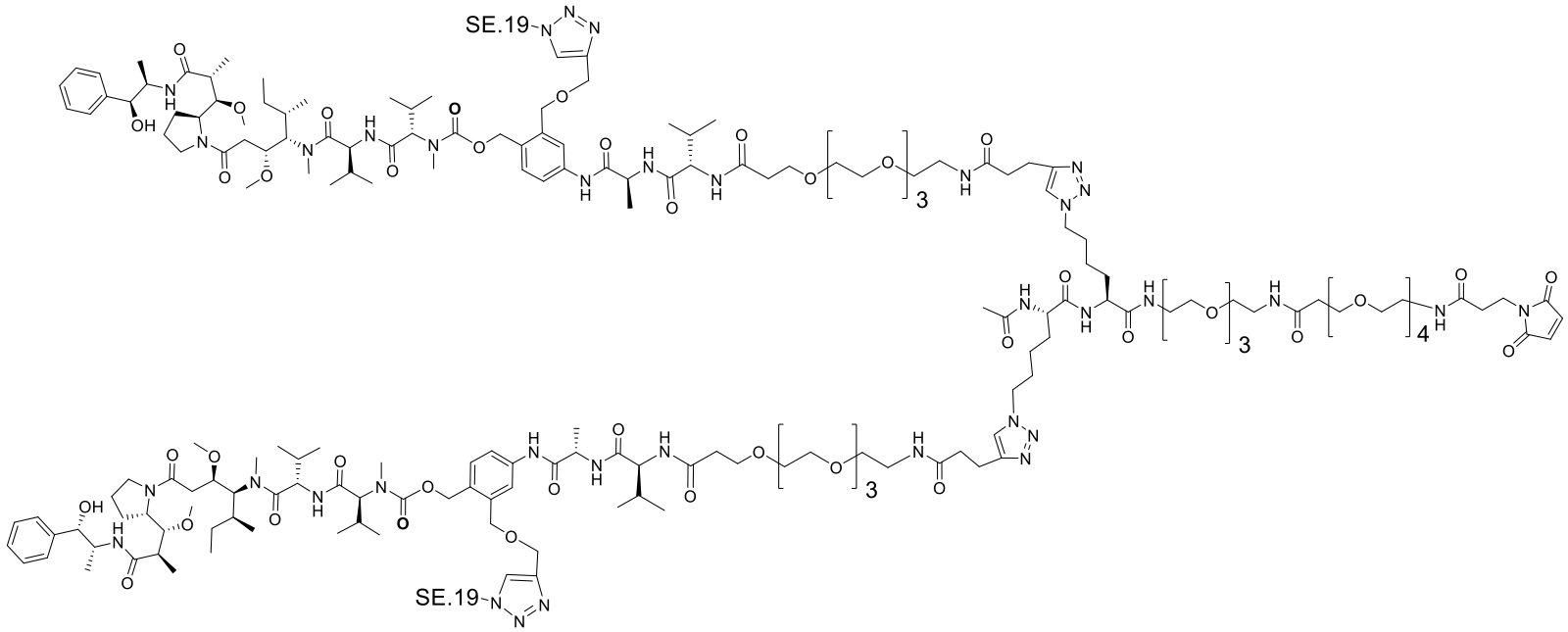
Síntesis de **III.27**



El intermediario **III.27** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (3 mg, 5,18 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.27** (30,4 mg, 12,9 µmol, 2,5 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,62 mg, 6,47 µmol, 1,25 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (5,61 mg,

12,9 µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (3,84 mg, 19,4 µmol, 3,75 equiv.) en DMF/agua (130,9 µL, 10:1). Después de 30 min, se añadió la misma cantidad de $CuSO_4$ x $5H_2$ O, THPTA y ascorbato de sodio a la mezcla de reacción. Tras 1,5 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento por HPLC prep. para obtener el intermediario **III.27** como un liofilizado incoloro (21,06 mg, 77 %). $C_{294}H_{488}N_{36}O_{128}$. UHPLC (método **U**): t_R= 2,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1178,7 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1178,16

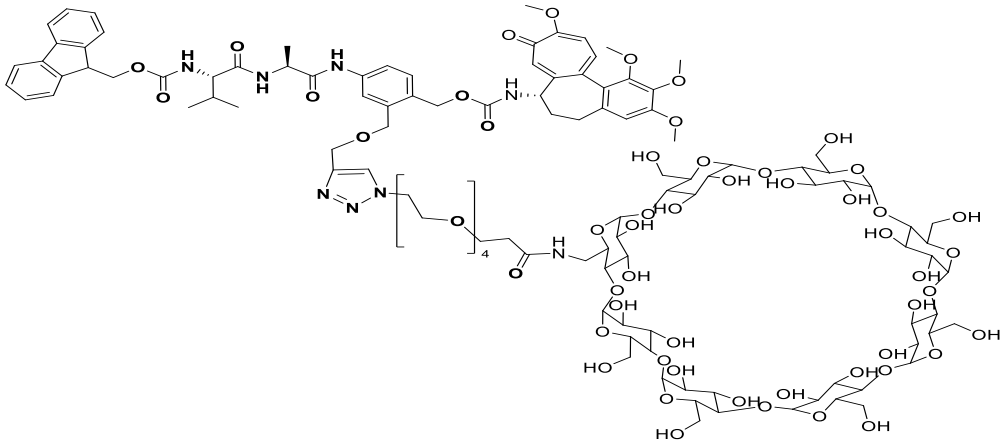
Síntesis de IV.**27**



El compuesto IV.**27** se sintetizó como se describe para el compuesto IV.**16**. El compuesto IV.**27** (15,92 mg, 72 %) se obtuvo como un sólido incoloro. $C_{262}H_{442}N_{42}O_{92}$. UHPLC (método **U**): t_R= 3,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1414,2 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1414,04

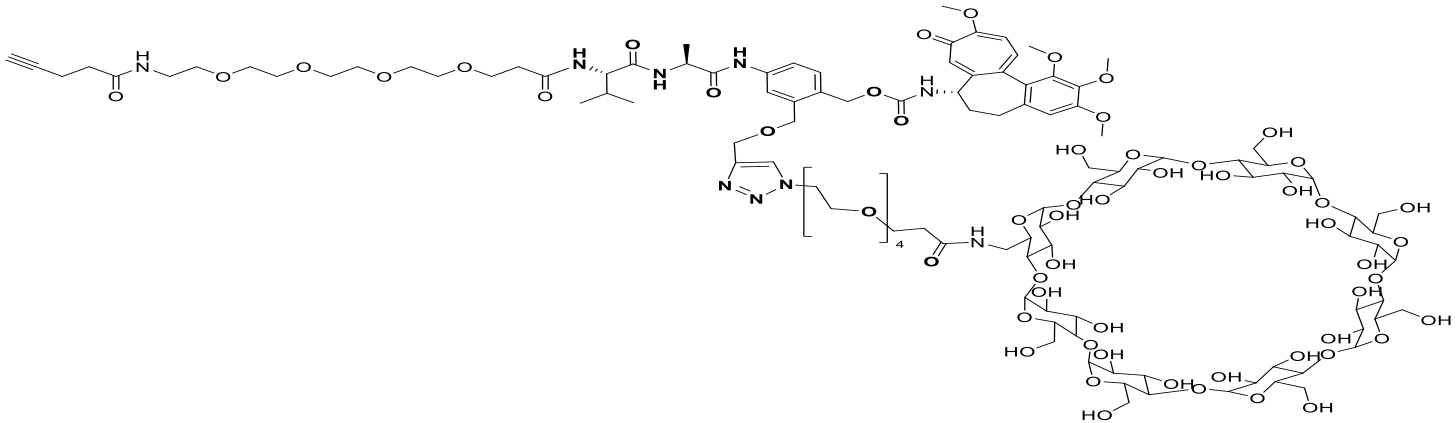
Ejemplo 30 - Síntesis de IV.28

Síntesis de **I.28**

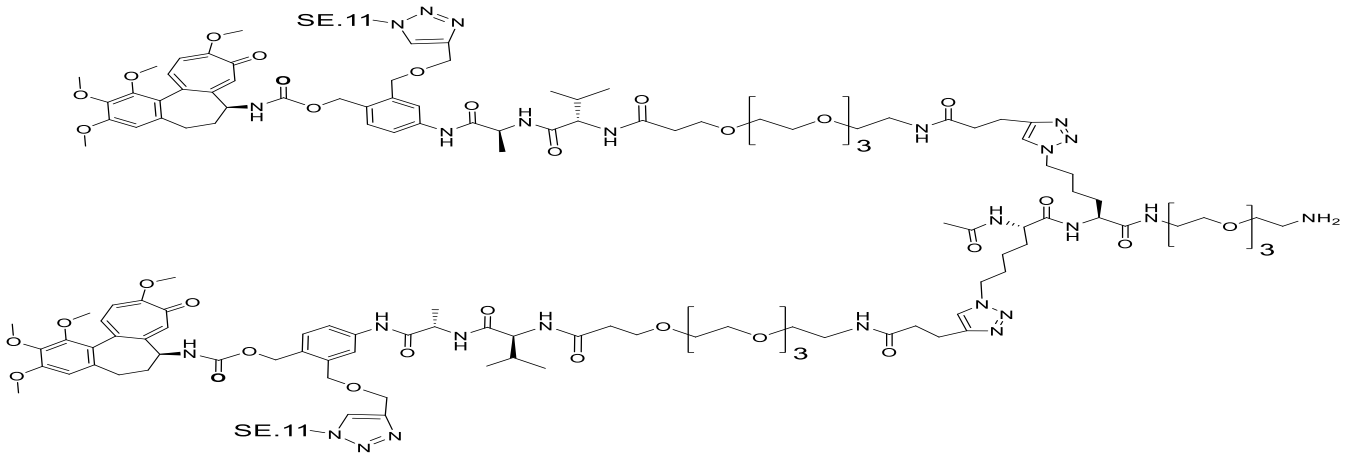


El intermediario **I.28** se sintetizó según el intermediario **I.24** utilizando el intermediario 4.6 (268,92 mg, 171 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**7** (182,24 mg, 188 µmol, 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (8,1 mg, 34,2 µmol, 0,2 equiv,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (22,76 mg, 42,8 µmol, 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (17 mg, 85,5 µmol, 0,5 equiv.) en DMF/agua (4004 µL, 10:1). Después de 20 min, la mezcla de reacción se precipitó en acetona helada para obtener el intermediario **I.28.** El producto crudo (489,62 mg con una pureza del 91 %) se utilizó sin purificación adicional. UHPLC (método **R** con 0,05 % de TFA como aditivo): t_R = 2,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1268,2 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1268,49.

Síntesis de **II.28**



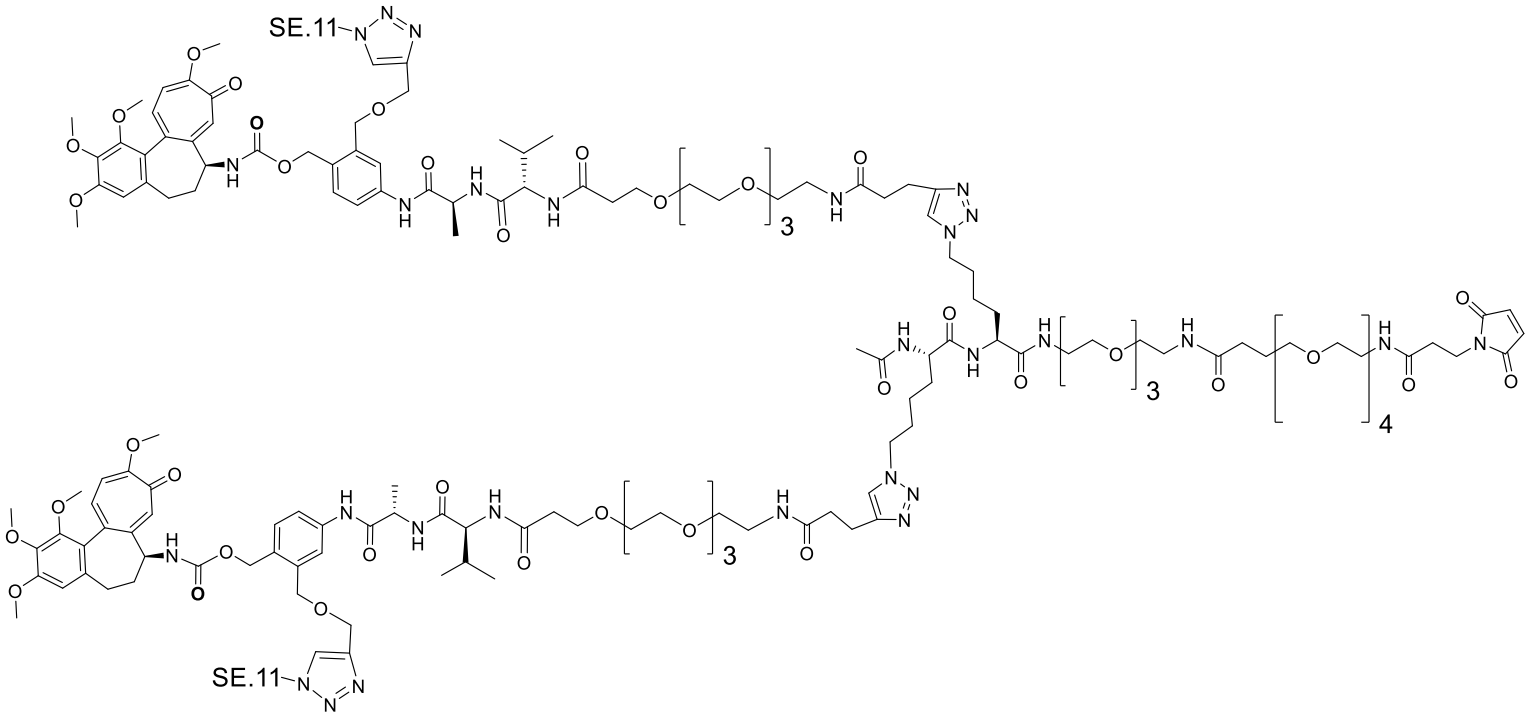
El intermediario **II.28** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.28** (200,52 mg, 39,4 µmol, 1 equiv.), 97,6 µL de dietilamina (946 µmol, 24 equiv.) en 1 mL de DMF para la desprotección por Fmoc y **el intermediario 3.2** (21,2 mg, 43,3 µmol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (20,6 µL, 1,2 mmol, 3 equiv.) en DMF (500 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.28** (93,5 mg, 50 %) como un sólido amarillo. $C_{136}H_{223}N_{13}O_{61}$. HPLC (método **W**): t_R= 1,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1320,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1321,04 Síntesis de **III.28**



El intermediario **III.28** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (3,37 mg, 5,8 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.28** (33,78 mg, 12,8 µmol, 2,2 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,82 mg, 7,3 µmol, 1,25 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (6,3 mg, 14,5 µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (4,32 mg, 21,8 µmol, 3,75 equiv.) en DMF/agua (130,9 µL, 10:1). Después de 30 min, se añadió la misma cantidad de $CuSO_4$ x $5H_2O$, THPTA y ascorbato de sodio a la mezcla de reacción. Tras 2 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción

se purificó directamente sin pretratamiento por HPLC prep. para producir el intermediario **III.28** como un liofilizado incoloro (21,56 mg, 67 %). $C_{252}H_{388}N_{28}O_{126}$. UHPLC (método **T** con 0,05 % TFA como aditivo a 380 nm): t_R= 3,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1456,4 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1456,62

Síntesis de IV.**28**

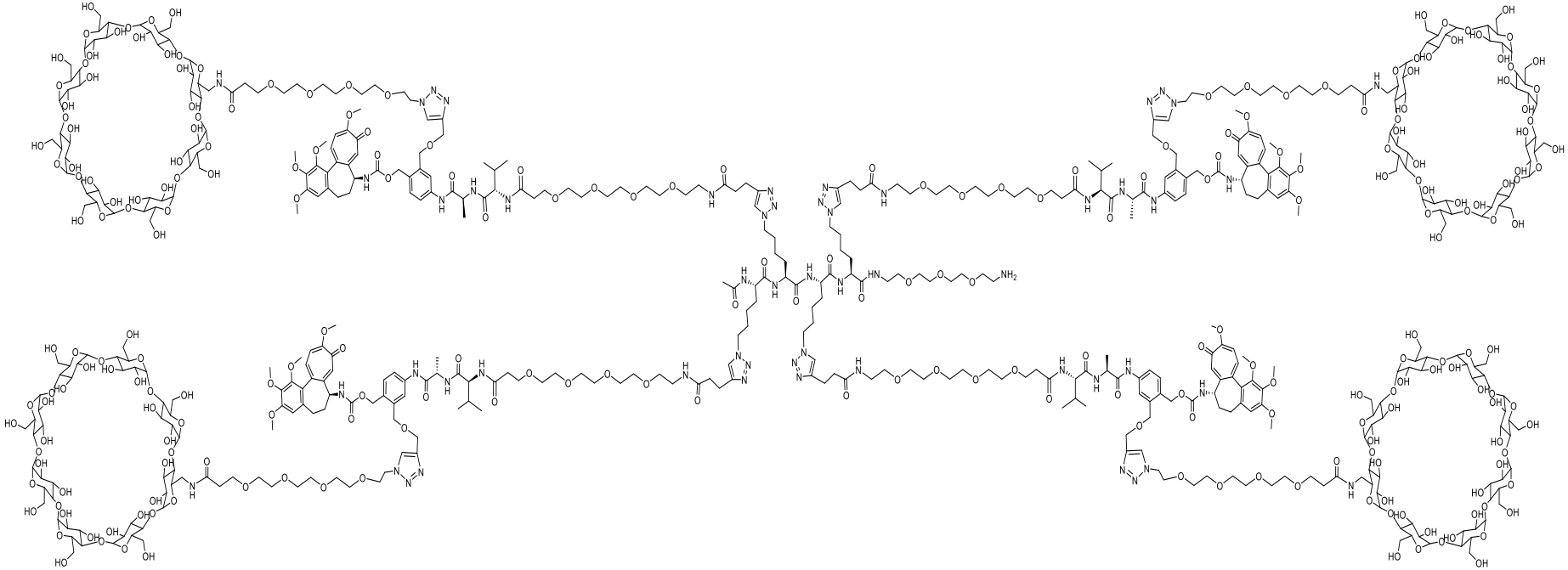


El compuesto IV.**28** se sintetizó como se describe para el compuesto IV.**16**. El compuesto IV.**28** (17,2 mg, 76 %) se obtuvo como un sólido

amarillo. $C_{270}H_{414}N_{30}O_{134}$. UHPLC (método **T**): t_R= 3,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1555,9 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1556,16

Ejemplo 31 - Síntesis de IV.29

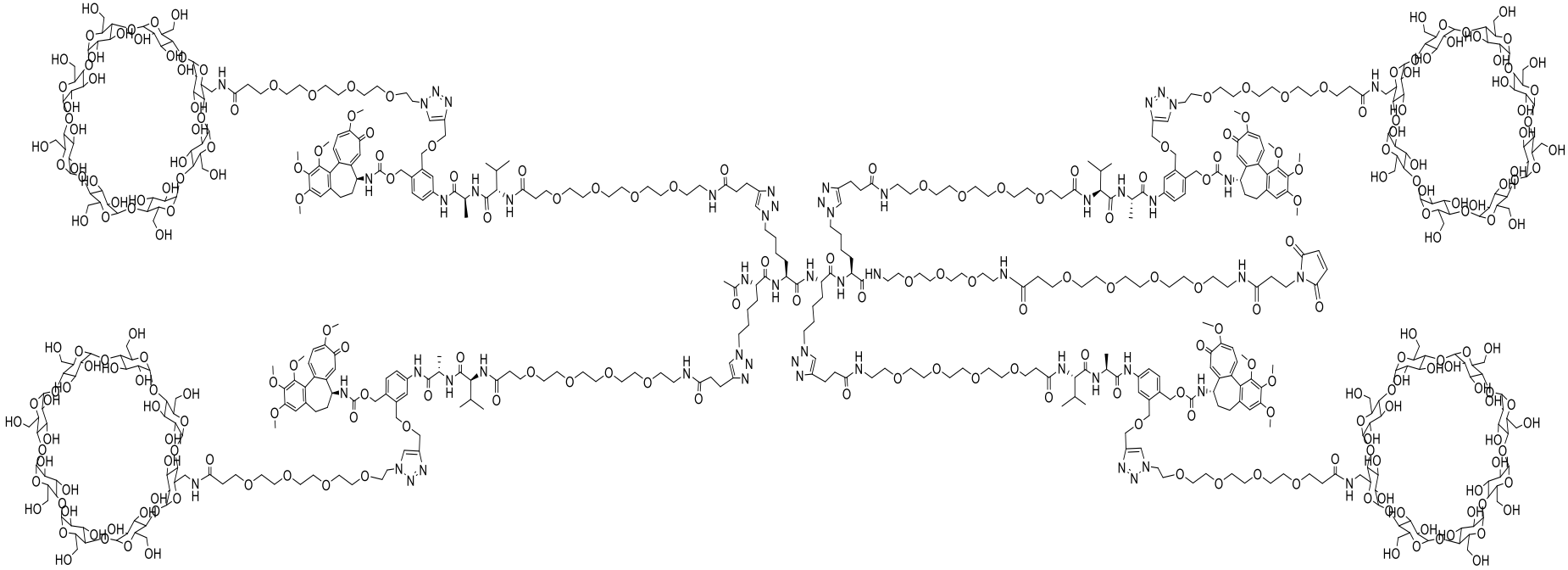
Síntesis de **III.29**



El intermediario **III.29** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.2** (4,4 mg, 5,3 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.28** (60,12 mg, 23,2 µmol, 4,4 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (3,2 mg, 13,2 µmol, 2,5 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (11,3 mg, 26,4 µmol, 5 equiv.) y ascorbato sódico (7,65 mg, 39,6 µmol, 7,5 equiv.) en DMF/agua (130,9 µL, 10:1). Después de 30 min, se añadió la misma

cantidad de $CuSO_4$ x $5H_2O$, THPTA y ascorbato de sodio a la mezcla de reacción. Tras 2 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción se purificó directamente sin pretratamiento por HPLC prep. para producir el intermediario **III.29** como un liofilizado amarillo pálido (32,58 mg, 67 %). $C_{494}H_{754}N_{54}O_{255}$. UHPLC (método **T** con 0,05 % TFA como aditivo a 380 nm): t_R= 4,15 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1902,7 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 1902,8

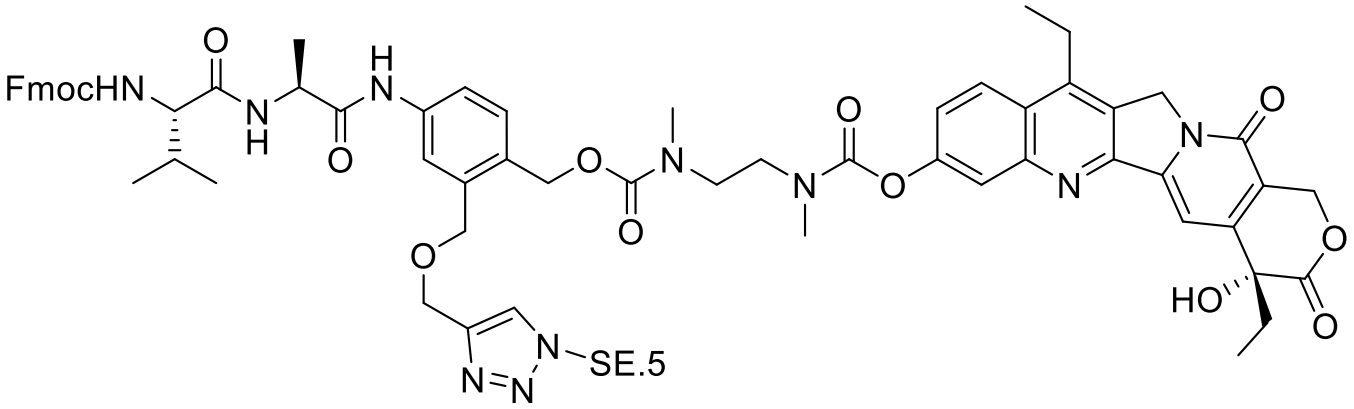
Síntesis de IV.**29**



El compuesto IV.**29** se sintetizó como se describe para el compuesto IV.**16**. El compuesto IV.**29** (22,37 mg, 67 %) se obtuvo como un sólido

amarillo pálido. $C_{512}H_{780}N_{56}O_{256}$. UHPLC (método **T**): t_R= 4,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1969,0 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 1969,16

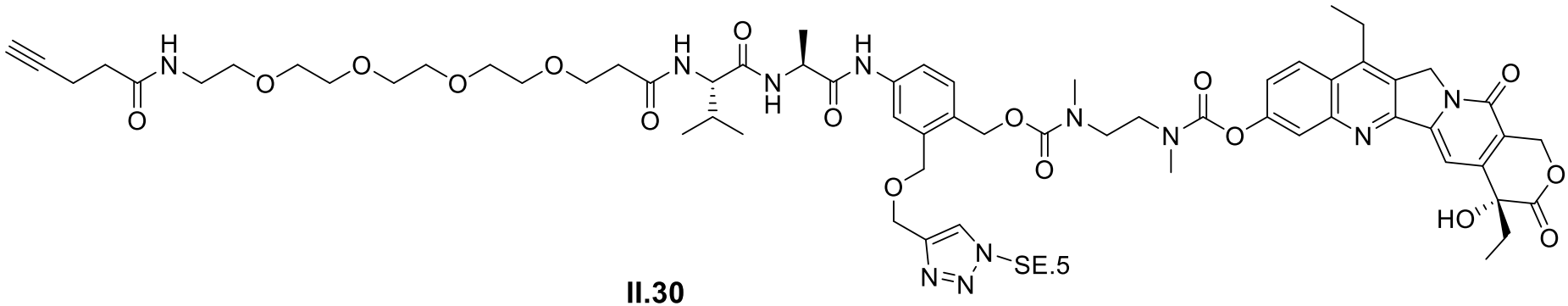
Síntesis de **I.30**



I.30

El intermediario **I.30** se sintetizó de acuerdo con la GP1 utilizando el intermediario 4.3 (59,7 mg, 38 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**17** (42,1 mg, 38 µmol, 1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (4,7 mg, 19 µmol, 0,5 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (20,0 mg, 38 µmol, 1 equiv.) y ascorbato sódico (11,9 mg, 57 µmol, 1,5 equiv.) en DMF/agua (4,05 mL, 20:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.30** (100,4 mg, 99 %) como un sólido amarillento. HPLC (método A): t_R= 10,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1350,3 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1350,0 $[M+2H]^{2+}$

Síntesis de **II.30**

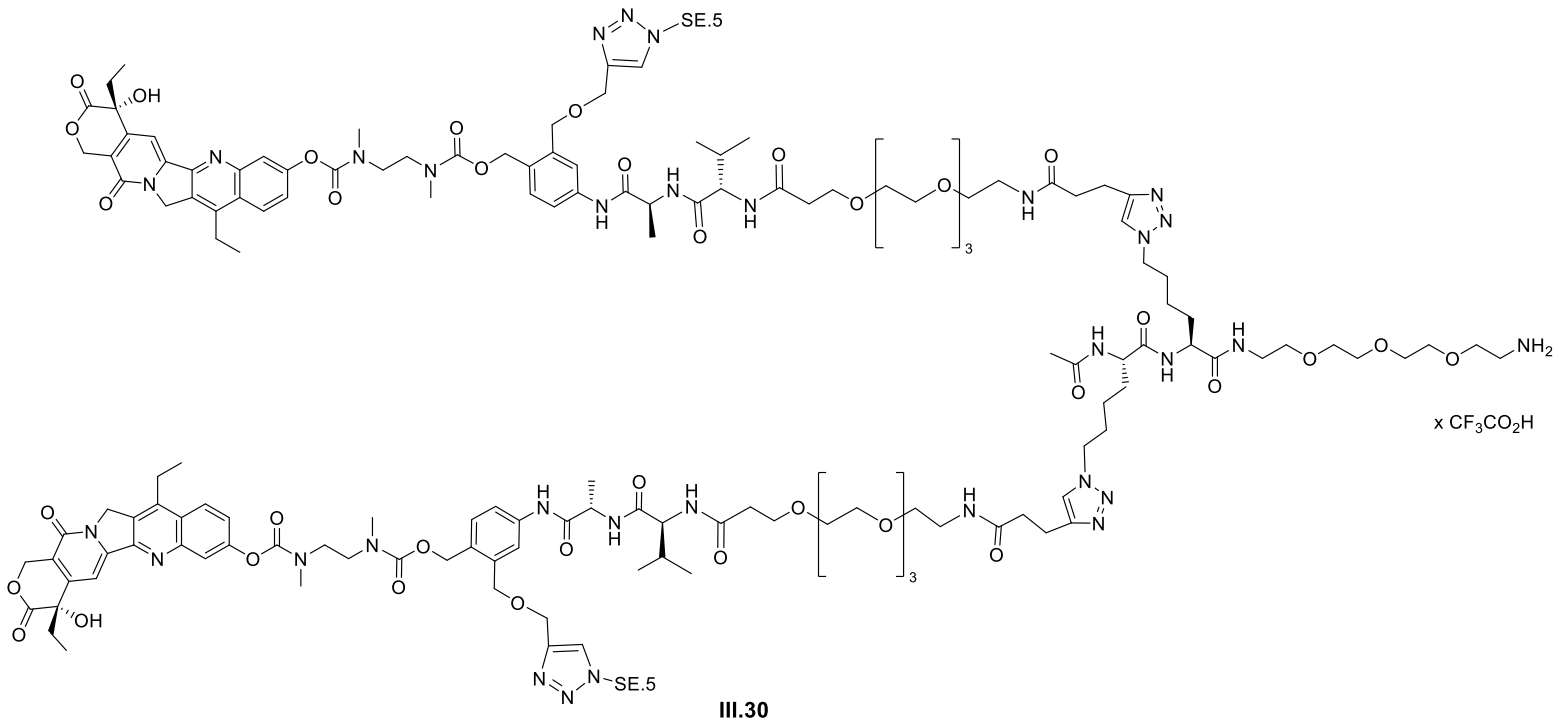


II.30

El intermediario **II.30** se sintetizó según el GP3 usando 15,5 µl de dietilamina (149 µmol, 4 equiv.) en 3,2 mL de DMF para la desprotección por Fmoc del intermediario **I.30** (100,4 mg, 37 µmol, 1 equiv.) y el intermediario 3.**2** (23,7 mg, 48 µmol, 1,3 equiv.), diisopropiletilamina (9,07 µl, 52 µmol, 1,4 equiv.) en DMF para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.30** (63,8 mg, 61 %) como un sólido amarillento. HPLC (método N): t_R= 14,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1424,9 $[M+2Na]^{2+}$, m/z calculado= 1424,6 $[M+2Na]^{2+}$

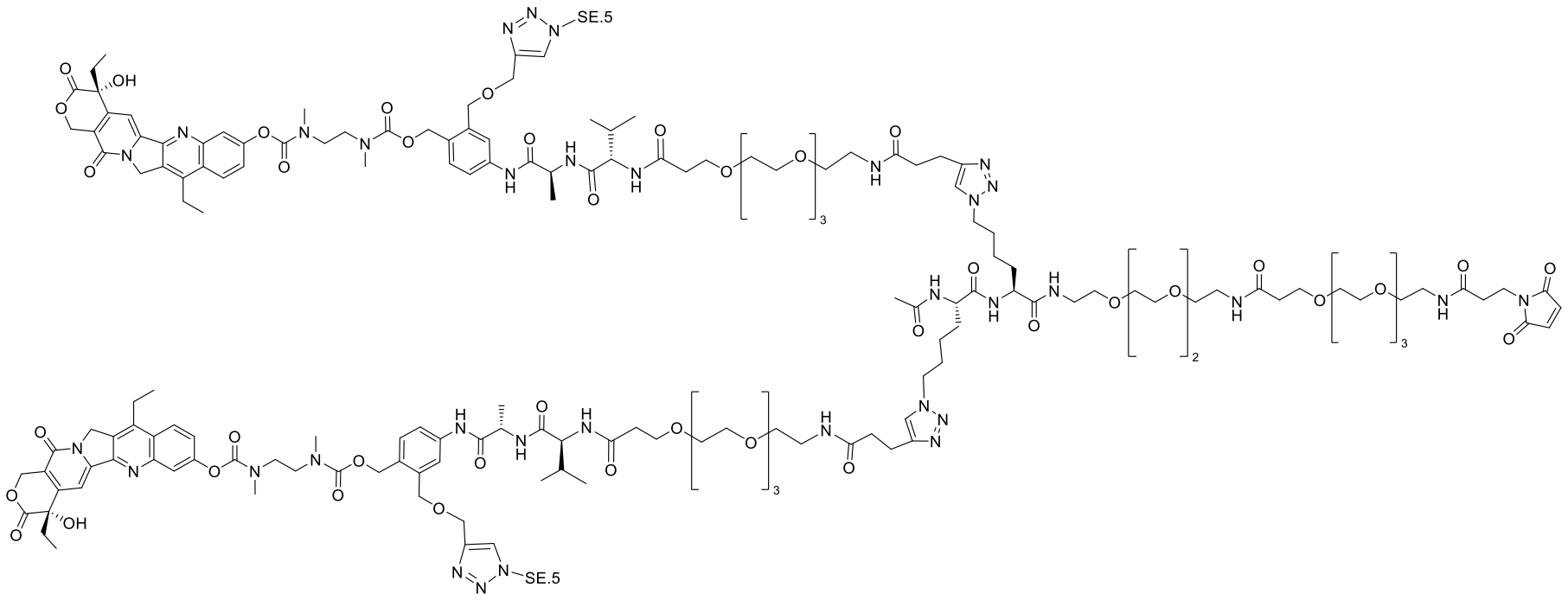
Síntesis de **III.30**

El intermediario **III.30** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermediario 2.1 (6,59 mg, 11 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.30** (63,8 mg, 23 µmol, 2 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (3,41 mg, 14 µmol, 1,2 equiv.), Tris(3- hidroxipropiltriazolilmetil)amina (11,86 mg, 27 µmol, 2,4 equiv.) y ascorbato sódico (8,1 mg, 41 µmol, 3,6 equiv.) en DMF/agua (0,42 mL, 5:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **III.30** (32,2 mg, 45 %) como un sólido amarillento. $C_{270}H_{414}N_{34}O_{126}$. HPLC (método AD): t_R= 20,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1538,9 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1538,2 $[M+4H]^{4+}$



III.30

Síntesis de IV.**30**

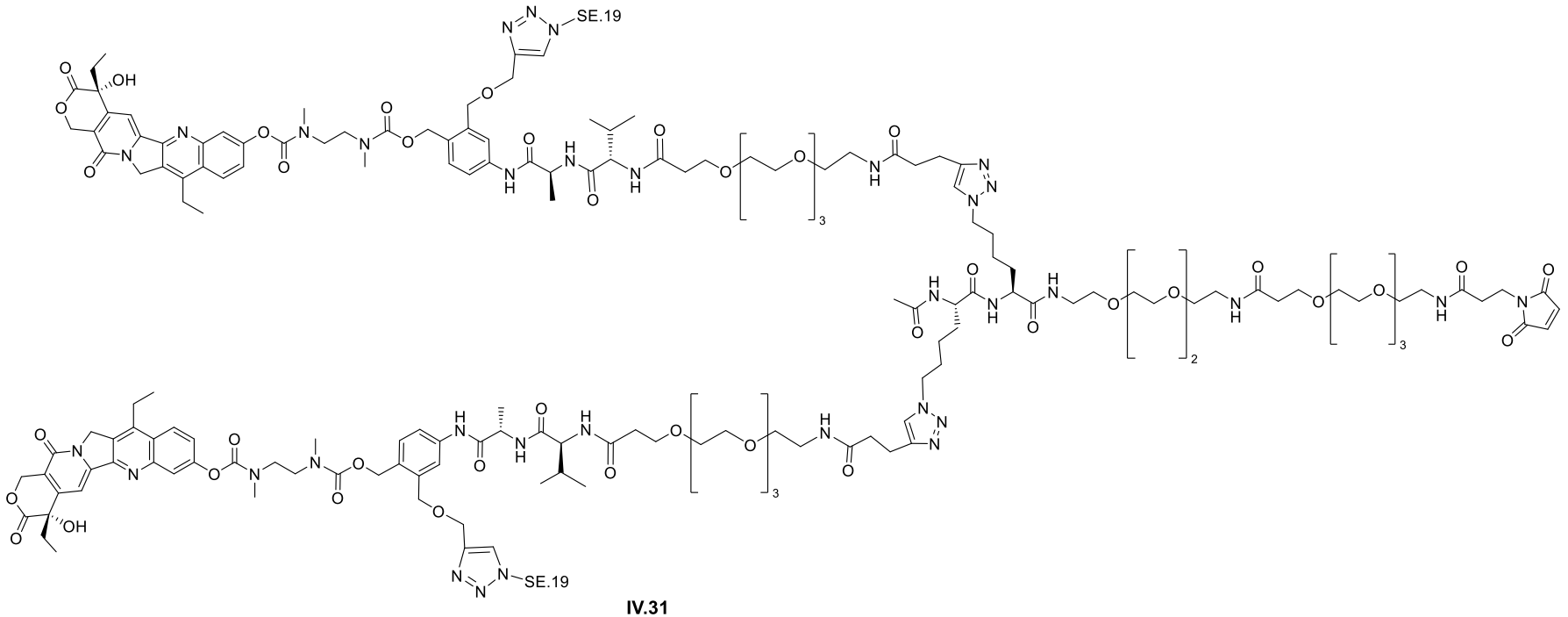


IV.30

El compuesto IV.**30** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermediario **III.30** (31,5 mg, 5 µmol, 1 equiv.), N-[15-[(2,5-Dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1- propanamida= Mal-PEG4-NHS-éster (5,17 mg, 10,1 µmol, 2 equiv.) y DIPEA (1,75 µL, 10,1 µmol, 2 equiv.) en DMF (0,87 mL). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto IV.**30** (24,5 mg, 74 %) como un sólido amarillento. $C_{288}H_{440}N_{36}O_{134}$. HPLC (método J): t_R= 13,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1092,4 $[M+6H]^{6+}$, m/z

calculado= 1092,1 $[M+6H]^{6+}$

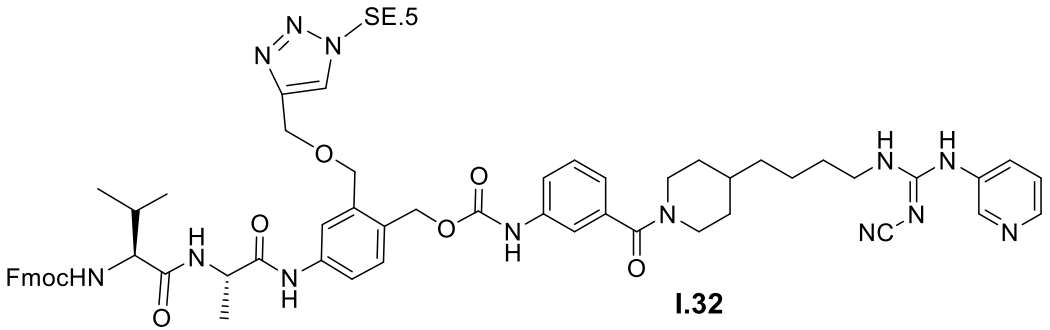
Síntesis de IV.**31**



IV.31

El compuesto IV.**31** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**30** pero utilizando el intermediario 6.4. El compuesto IV.**31** (32,76 mg, 67 %) se obtuvo como un sólido amarillento. $C_{238}H_{368}N_{40}O_{90}$. HPLC (método AD): t_R= 23,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1329,5 $[M+4Na]^{4+}$, m/z calculado= 1329,6 $[M+4Na]^{4+}$

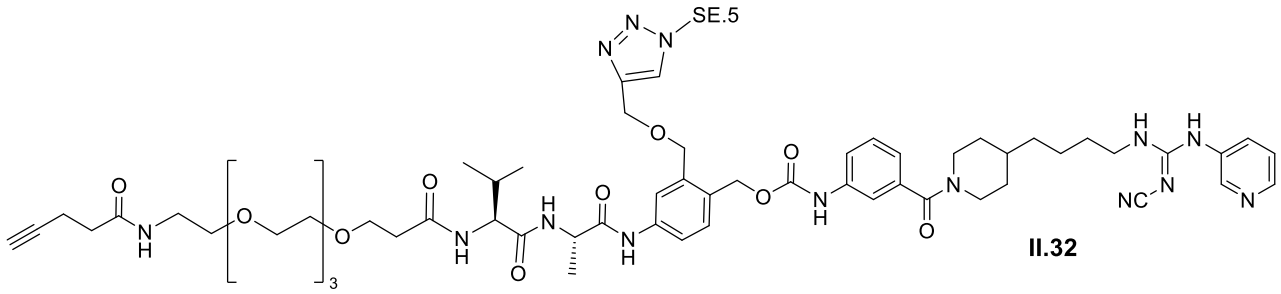
Síntesis de **I.32**



I.32

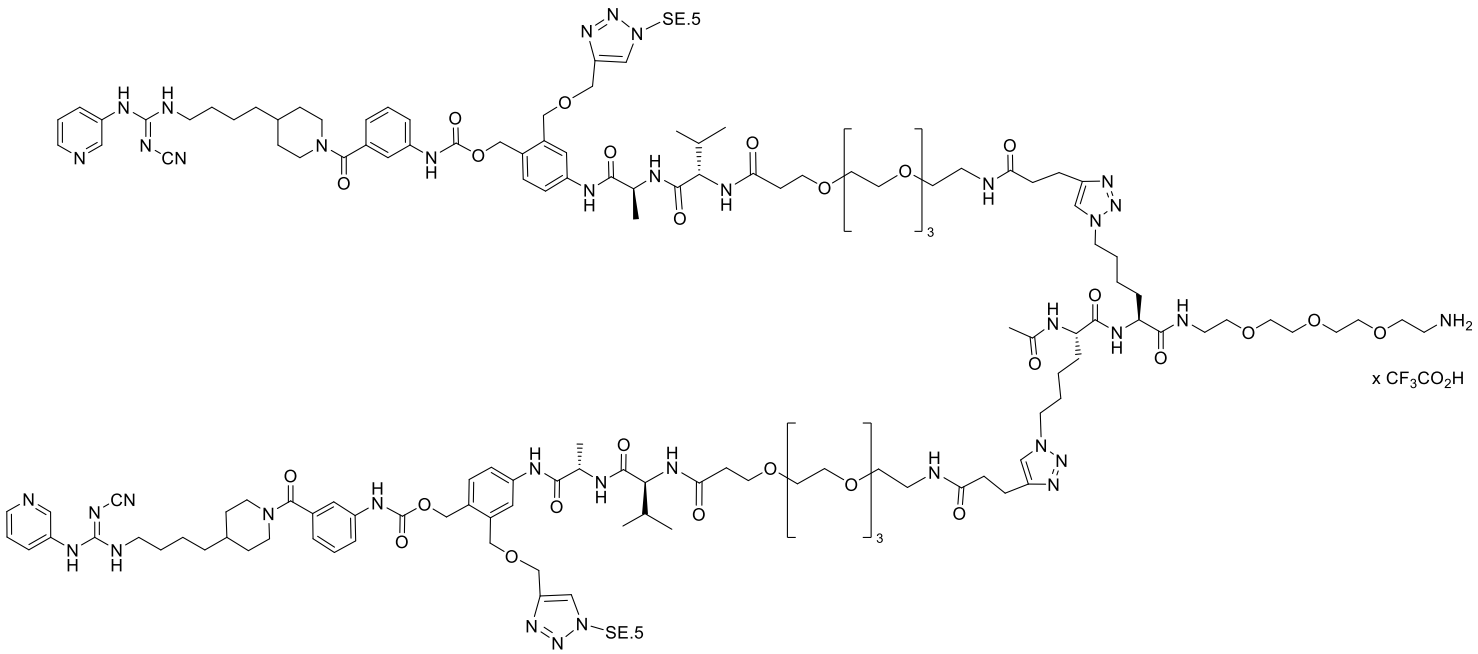
El intermediario **I.32** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermediario 4.3 (76,9 mg, 48,5 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**18** (50 mg, 48,5 µmol, 1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (2,4 mg, 9,7 µmol, 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (6,4 mg, 12,1 µmol, 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (11,5 mg, 58,3 µmol, 1,2 equiv.) en DMF/agua (769 µL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.32** (70 mg, 55 %) como un sólido incoloro. HPLC (método X): t_R= 8,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1306,2 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1306,6 $[M+2H]^{2+}$

Síntesis de **II.32**



El intermediario **II.32** se sintetizó según el GP3 utilizando 66,6 µl de dietilamina (640 µmol, 24 equiv.) en 3,5 mL de DMF para la desprotección por Fmoc del intermediario **I.32** (70 mg, 26,8 µmol, 1 equiv.) y el intermediario 3.2 (14,5 mg, 29,5 µmol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (4,66 µL, 26,8 µmol, 1 equiv.) en DMF (1,75 mL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.32** (55,5 mg, 76 %) como un sólido incoloro. HPLC (método X): t_R= 5,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1359,0 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1359,1 $[M+2H]^{2+}$

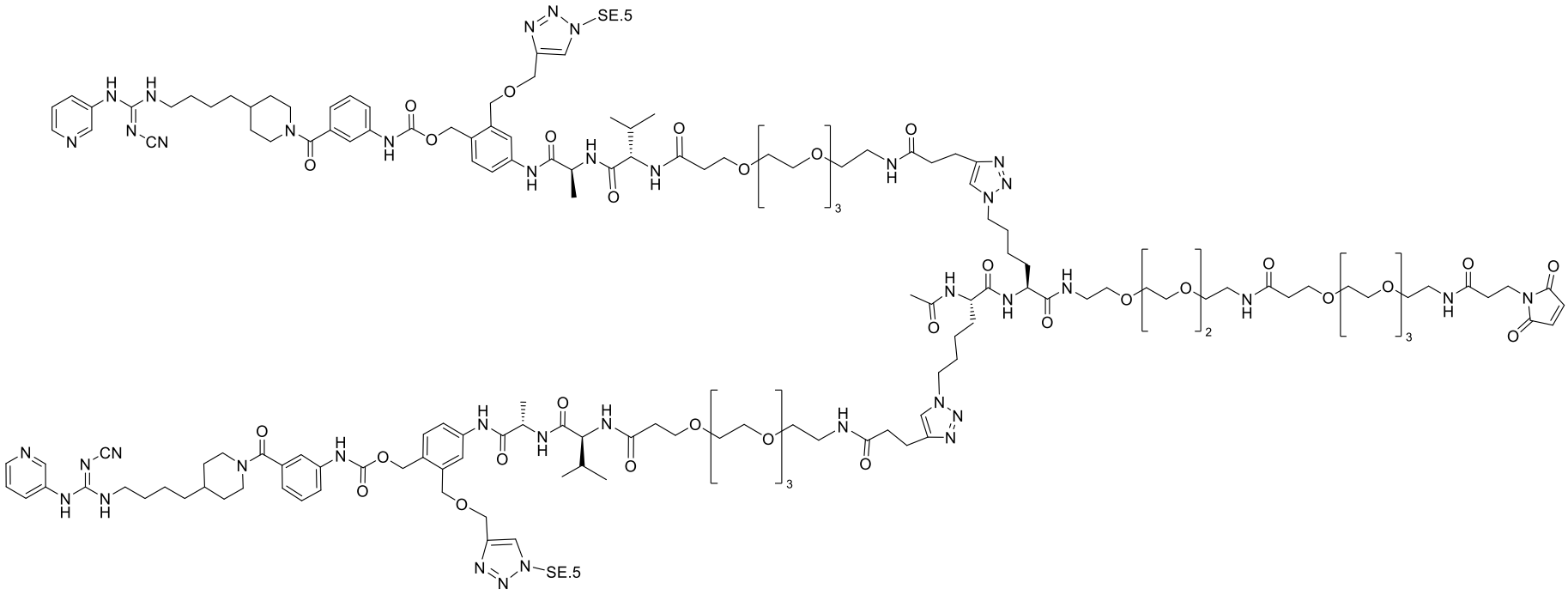
Síntesis de **III.32**



III.32

El intermediario **III.32** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermediario 2.1 (5,14 mg, 8,9 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.32** (55,53 mg, 20,4 µmol, 2,3 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (2,77 mg, 11,1 µmol, 1,25 equiv.), Tris(3- hidroxipropiltriazolilmetil)amina (9,7 mg, 22,3 µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (6,6 mg, 33,2 µmol, 3,75 equiv.) en DMF/agua (141 µL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **III.32** (20,39 mg, 38 %) como un sólido amarillento. $C_{262}H_{412}N_{40}O_{116}$. HPLC (método X): t_R= 10,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1494,6 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1494,7 $[M+4H]^{4+}$

Síntesis de IV.**32**

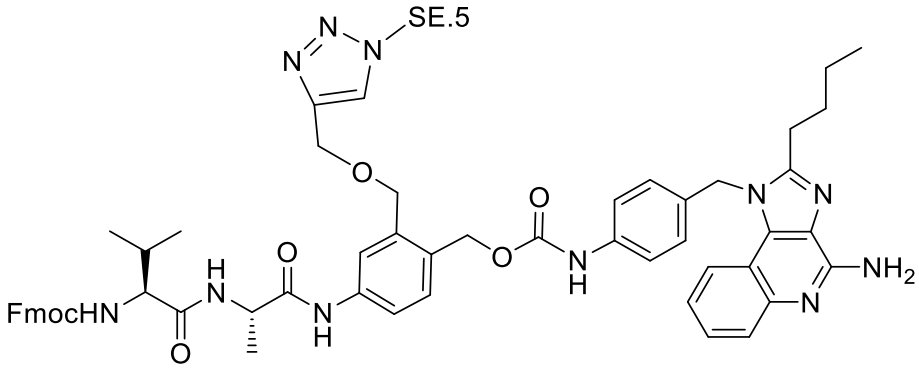


IV.32

El compuesto IV.**32** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA de **III.32** (20,39 mg, 3,4 µmol, 1 equiv.), N-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1- propanamida= Mal-PEG4-NHS-éster (1,1 equiv,95 mg, 3,8 µmol, 1,1 equiv.) y DIPEA (2,1 µL, 10,1 µmol, 3 equiv.) en DMF (0,82 mL). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto IV.**32** (14,96 mg, 70

%) como un sólido incoloro. $C_{280}H_{438}N_{42}O_{124}$. HPLC (método Z): t_R= 8,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1594,6 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1594,2 $[M+4H]^{4+}$

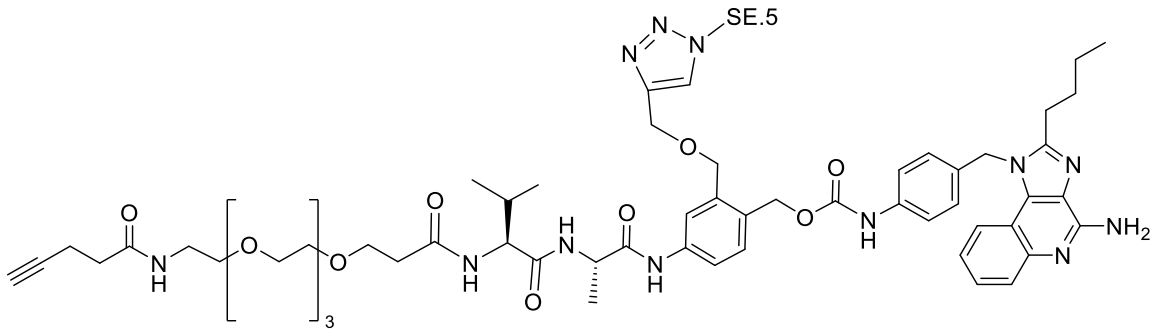
Síntesis de **I.33**



I.33

El intermediario **I.33** se sintetizó según el GP1 utilizando el intermediario 4.3 (60 mg, 37,9 µmol, 1 equiv.), el intermediario 1.**19** (44,3 mg, 41,7 µmol, 1,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,9 mg, 7,6 µmol, 0,2 equiv.), tris(benciltriazolilmetil)amina (5,07 mg, 9,5 µmol, 0,25 equiv.) y ascorbato sódico (3,74 mg, 18,9 µmol, 0,5 equiv.) en DMF/agua (660 µL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó **I.33** (95,5 mg, 91 %) como un sólido incoloro. $C_{117}H_{164}N_{12}O_{50}$. HPLC (método D): t_R= 9,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1269,8 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1269,5 $[M+2H]^{2+}$

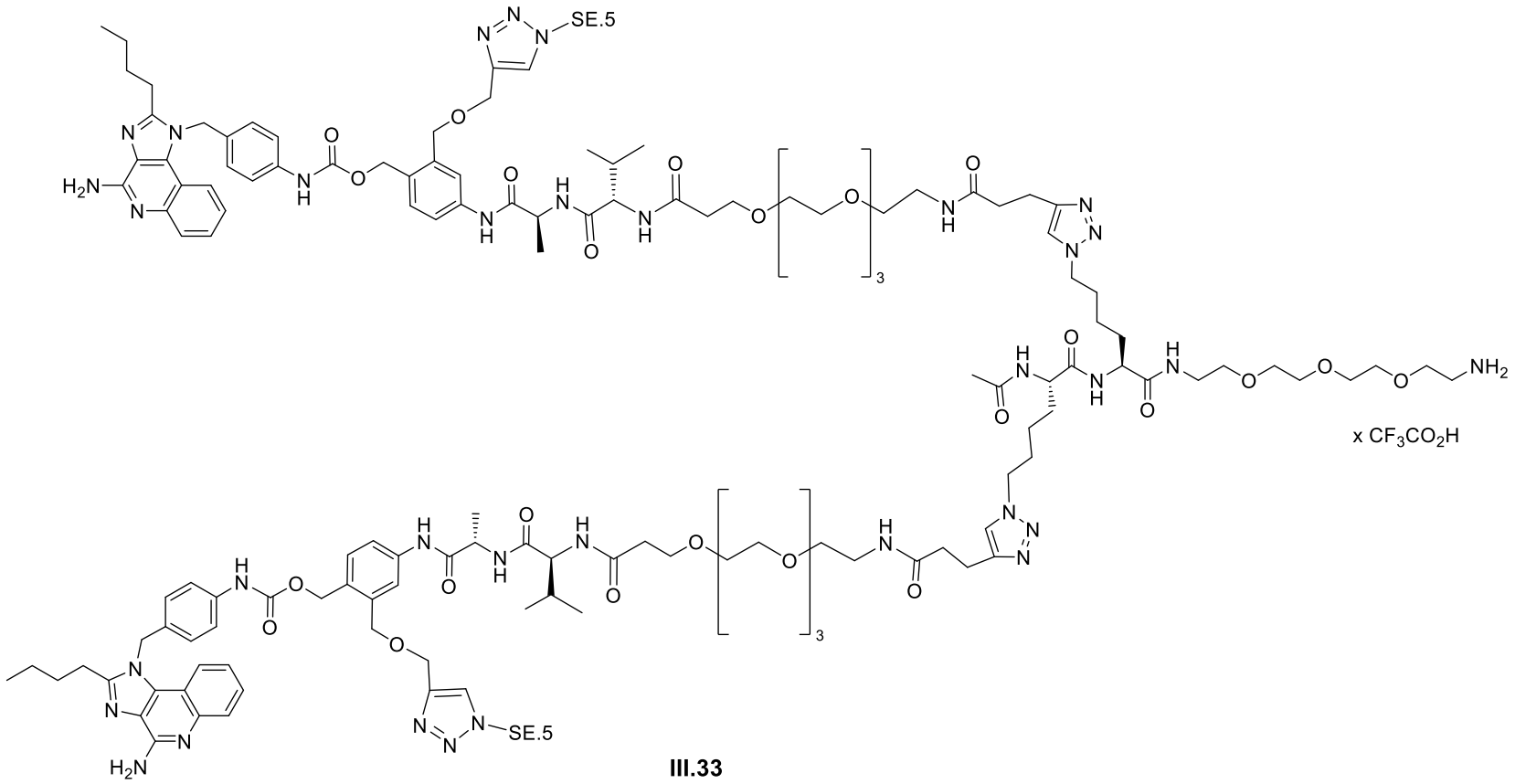
Síntesis de **II.33**



II.33

El intermediario **II.33** se sintetizó según el GP3 utilizando 56 µl de dietilamina (542 µmol, 24 equiv.) en 3 mL de DMF para la desprotección por Fmoc del intermediario **I.33** (60 mg, 22,6 µmol, 1 equiv.) y el intermediario 3.2 (12,2 mg, 24,9 µmol, 1,1 equiv.), diisopropiletilamina (11,5 µL, 67,8 µmol, 3 equiv.) en DMF (1,5 mL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.33** (46,9 mg, 74 %) como un sólido incoloro. $C_{118}H_{179}N_{13}O_{54}$. HPLC (método AB): t_R= 11,0 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1322,6 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1322,1 $[M+2H]^{2+}$

Síntesis de **III.33**

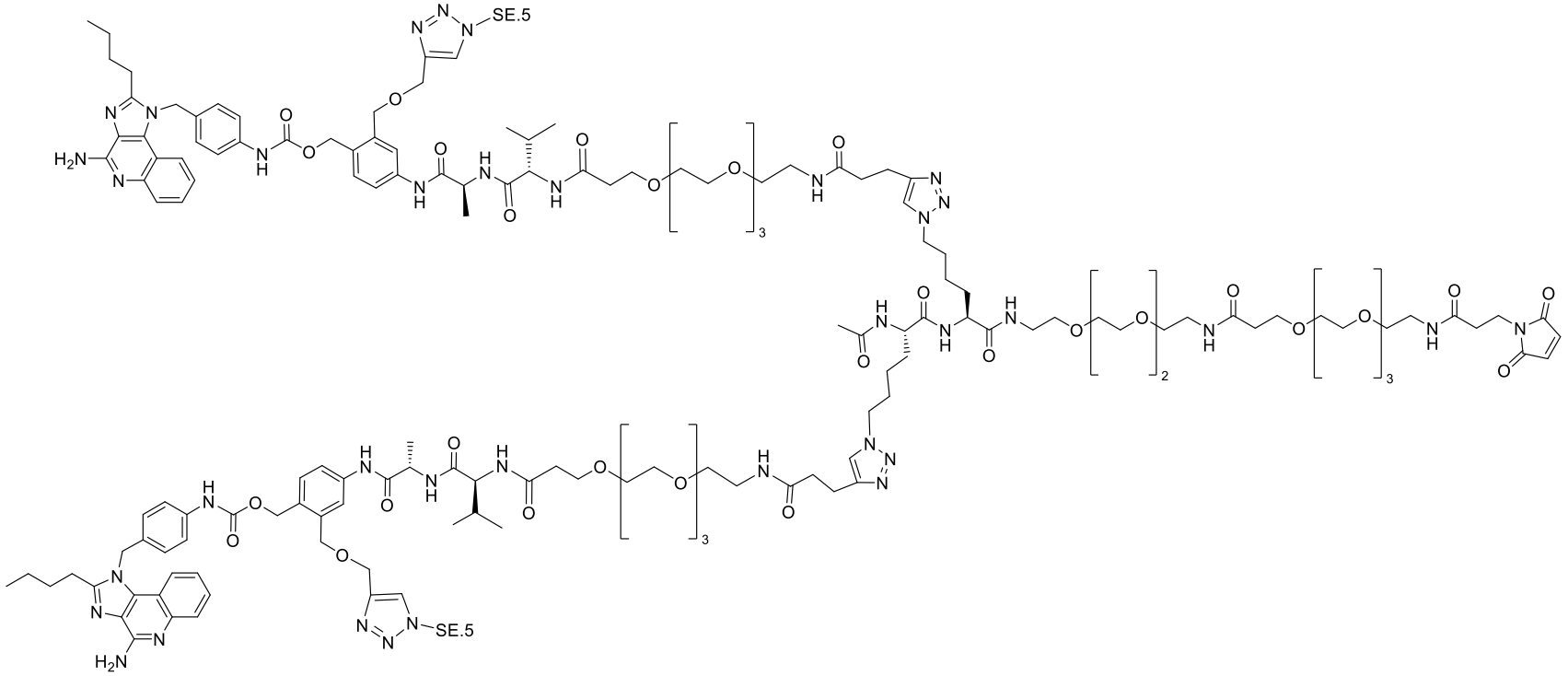


III.33

El intermediario **III.33** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermediario 2.1 (3,62 mg, 6,2 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.33** (42,9 mg, 15,6 µmol, 2,5 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (1,95 mg, 7,8 µmol, 1,25 equiv.), Tris(3- hidroxipropiltriazolilmetil)amina (6,78 mg,

15,6 µmol, 2,5 equiv.) y ascorbato sódico (4,64 mg, 23,4 µmol, 3,75 equiv.) en DMF/agua (990 µL, 10:1). La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **III.33** (19,7 mg, 50 %) como un sólido incoloro. $C_{258}H_{400}N_{36}O_{114}$. HPLC (método L): t_R= 15,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1458,7 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1457,7 $[M+4H]^{4+}$

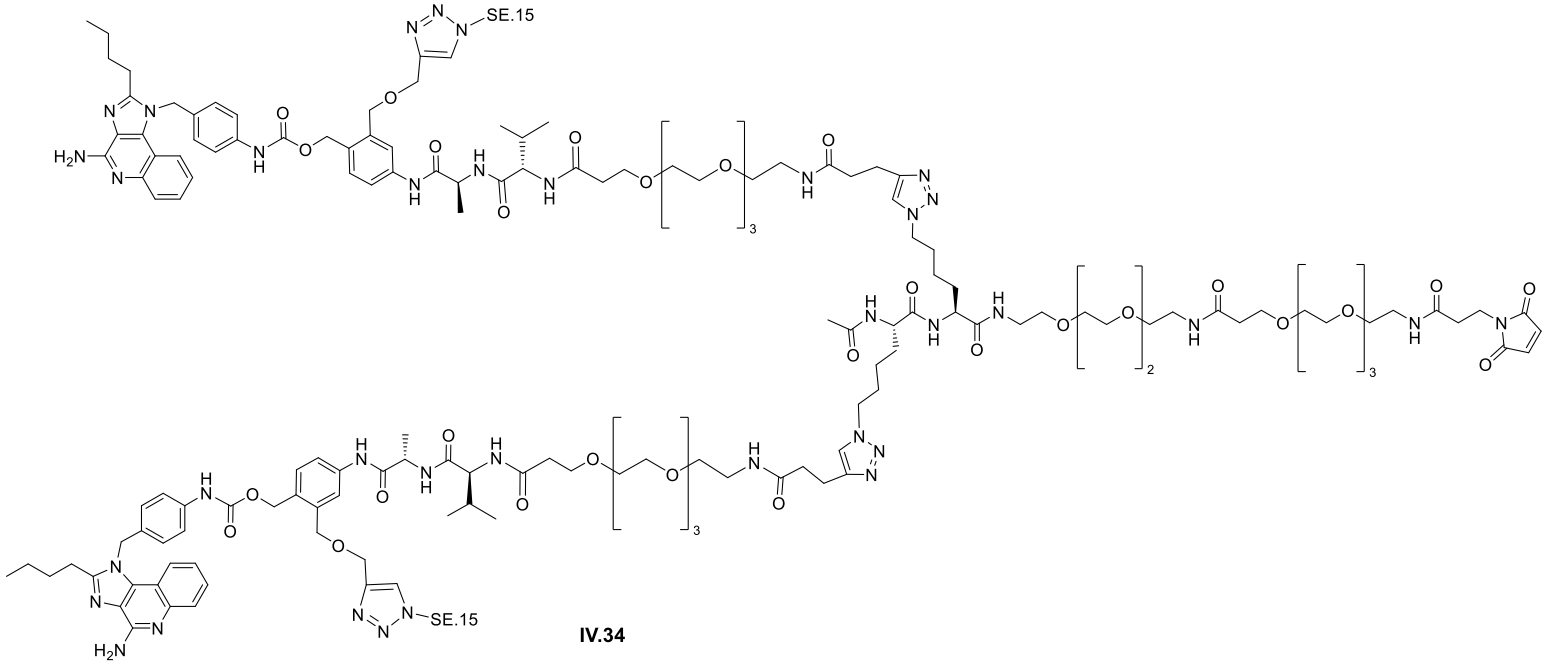
Síntesis de IV.**33**



IV.33

El compuesto IV.**33** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA de **III.33** (19,7 mg, 3,1 µmol, 1 equiv.), N-[15-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-il]-2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1- propanamida= Mal-PEG4-NHS-éster (1,77 mg, 3,4 µmol, 1,1 equiv.) y DIPEA (0,65 µL, 3,8 µmol, 1,2 equiv.) en DMF (0,79 mL). La purificación por RP-HPLC proporcionó el compuesto IV.**33** (17,16 mg, 83 %) como un sólido incoloro. C276H426N38O122. HPLC (método L): t_R= 16,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1558,4 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1557,2 $[M+4H]^{4+}$

Síntesis de IV.**34**

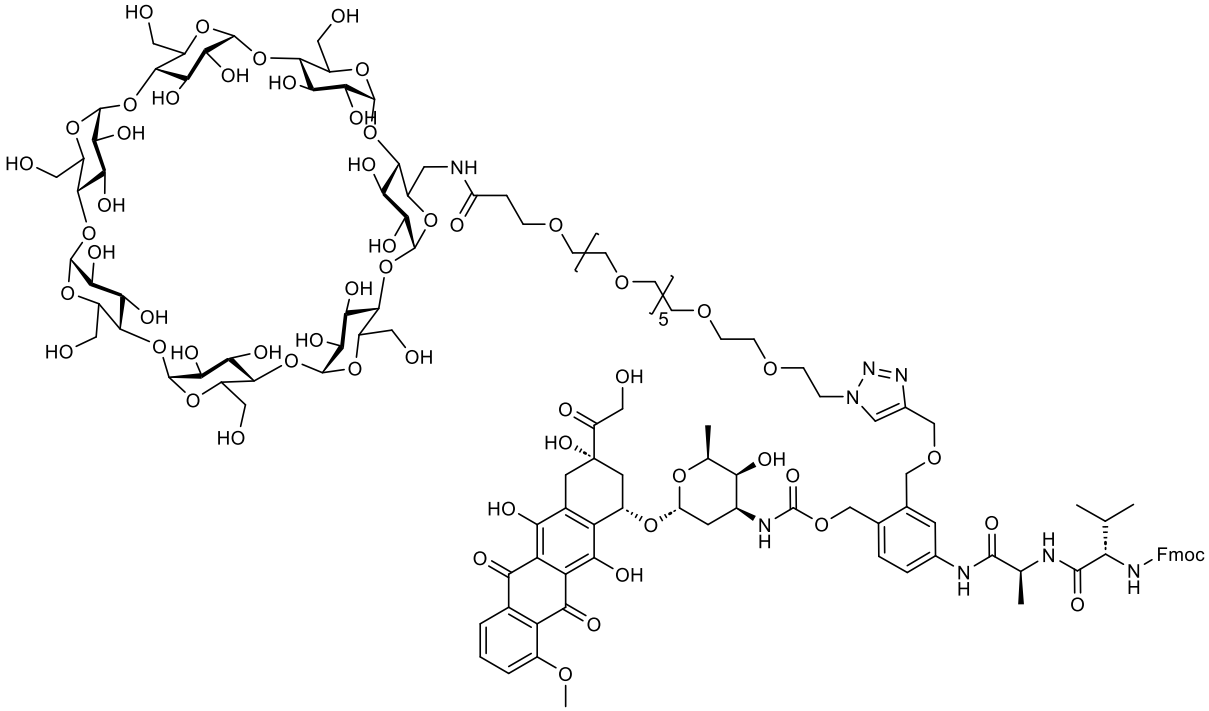


IV.34

El compuesto IV.**34** se sintetizó como se describió para el compuesto IV.**33** pero utilizando el intermediario 5.2. El compuesto IV.**34** (6,34 mg,

65 %) se obtuvo como un sólido incoloro. $C_{218}H_{322}N_{58}O_{58}$. HPLC (método AC): t_R= 13,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1172,6 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1171,1 $[M+4H]^{4+}$

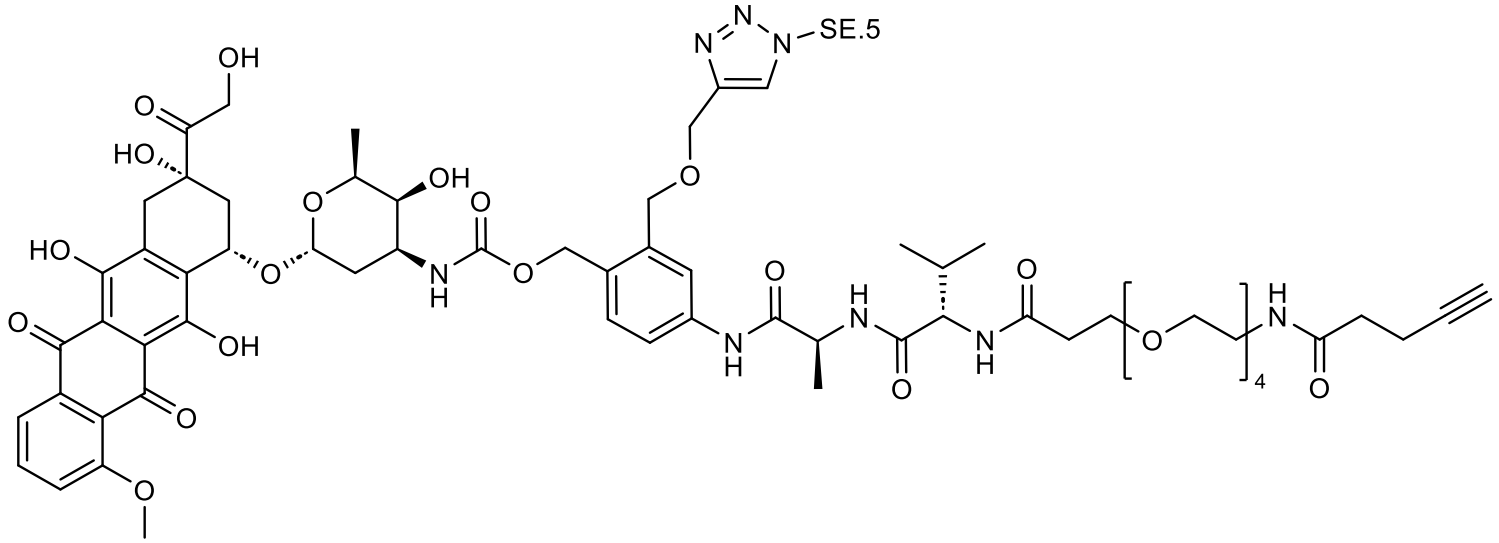
Síntesis de **I.35**



El intermediario **I.35** se sintetizó según el GP1 usando el intermediario 4.**3** (247 mg, 156 µmol, 1,2 equiv.), el intermediario 1.**17** (150 mg, 130 µmol, 1,0 equiv.) en DMF (1300 µL) con 325 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 200 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 240 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 600 mM de ascorbato sódico. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario

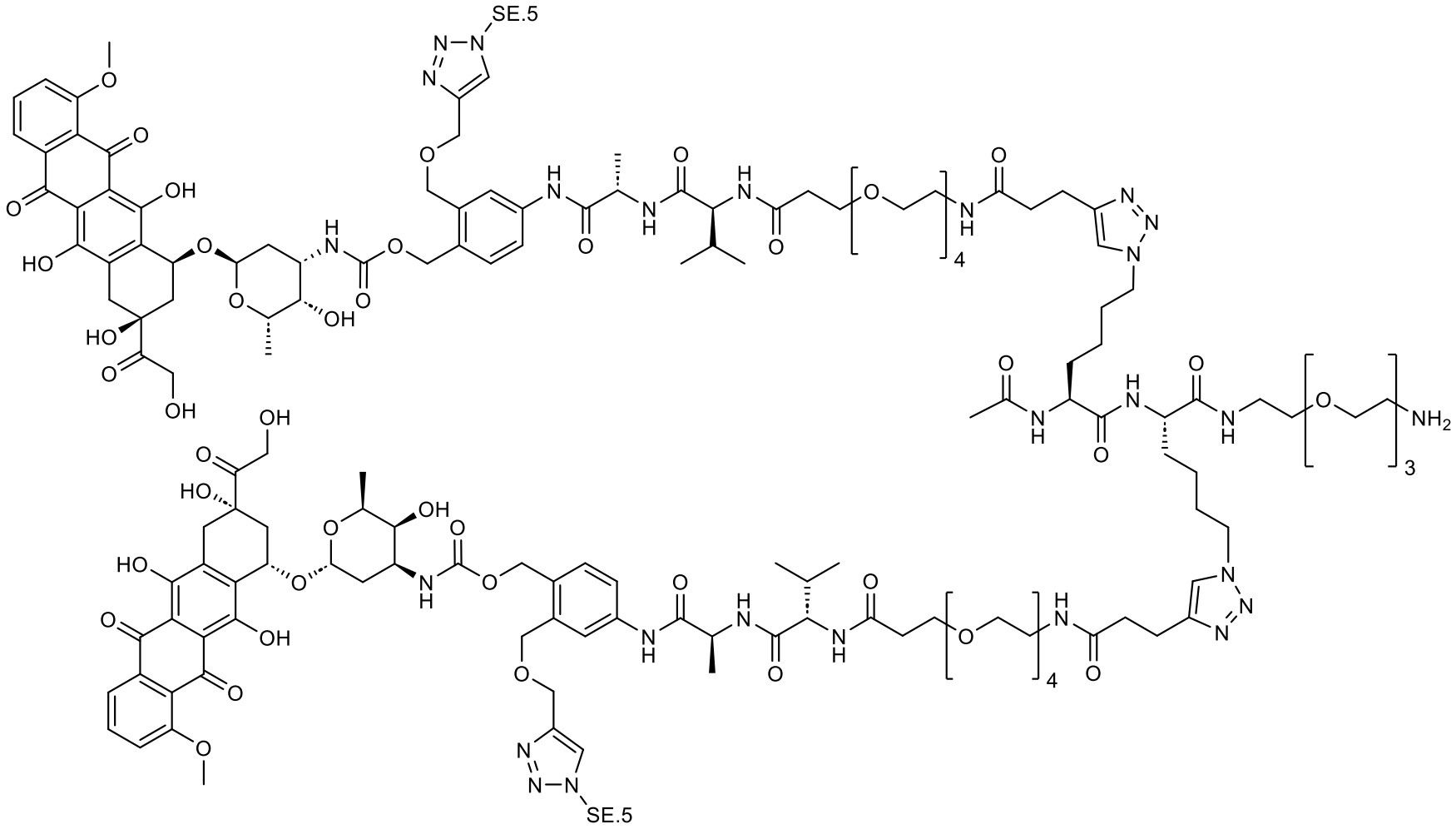
I.35 como un sólido naranja (306,8 mg, 90 %) Método **A** de HPLC **(**480 nm): t_R = 10,1 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1368,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1369,0.

Síntesis de **II.35**



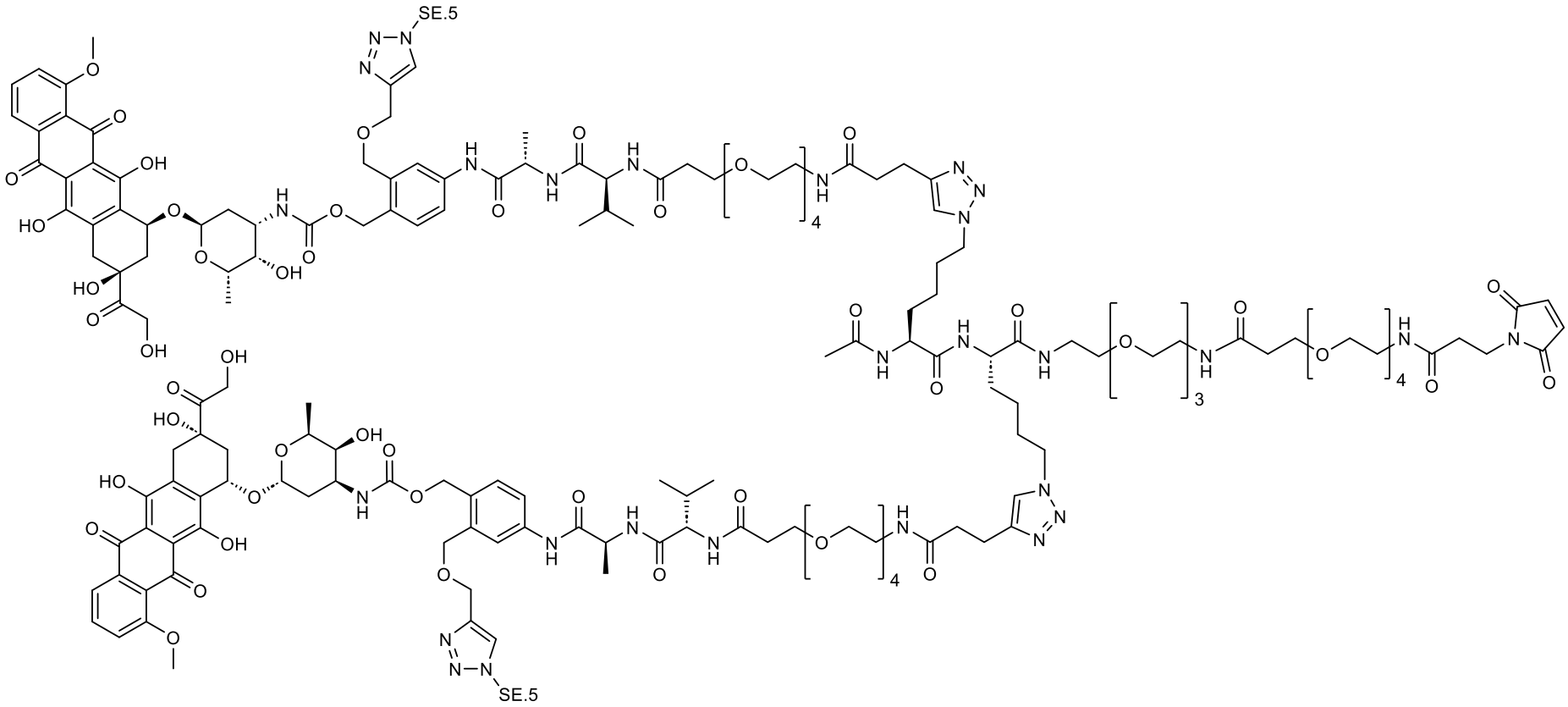
El intermediario **II.35** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.35** (218 mg, 79,7 µmol, 1 equiv.), 164 µL de dietilamina (1,59 mmol, 20 equiv.) en 1,5 mL de DMF para la desprotección por Fmoc y **el intermediario 3.2** (49 mg, 99,6 µmol, 1,25 equiv.), diisopropiletilamina (41,7 µL, 239 µmol, 3 equiv.) en DMF (1600 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.35** (70,0 mg, 31 %) como un sólido rojo. HPLC (método **H**): t_R= 14,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1421,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1421,58.

Síntesis de **III.35**



El intermediario **III.35** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (2,36 mg, 4,1 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.35** (27,8 mg, 9,78 µmol, 2,4 equiv.) en DMF (490 µL) con 49 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II), 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Después de 3 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.35** como un liofilizado rojo claro (17,4 mg, 64 %). HPLC (método N**,** 480 nm): t_R= 12,6 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1556,8 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1557,4

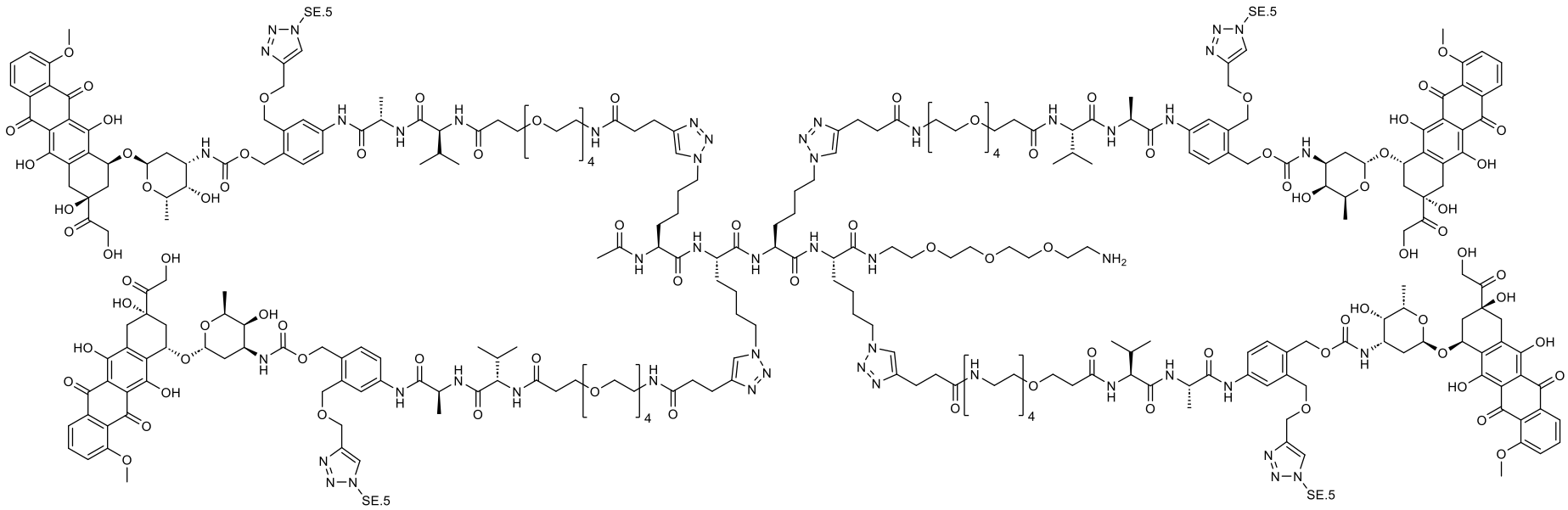
Síntesis de IV.**35**



El compuesto IV.**35** se sintetizó según el GP4 usando la sal de TFA del intermediario **III.35** (17,4 mg, 2,79 µmol, 1 equiv.), éster de Mal-PEG4-NHS (5,75 mg, 11,2 µmol, 4 equiv.) y DIPEA (1,95 µL, 11,2 µmol, 4 equiv.) en DMF (560 µL). Tras completarse después de 0,5 h, la mezcla de reacción se acidificó con TFA (1,7 µl), se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el

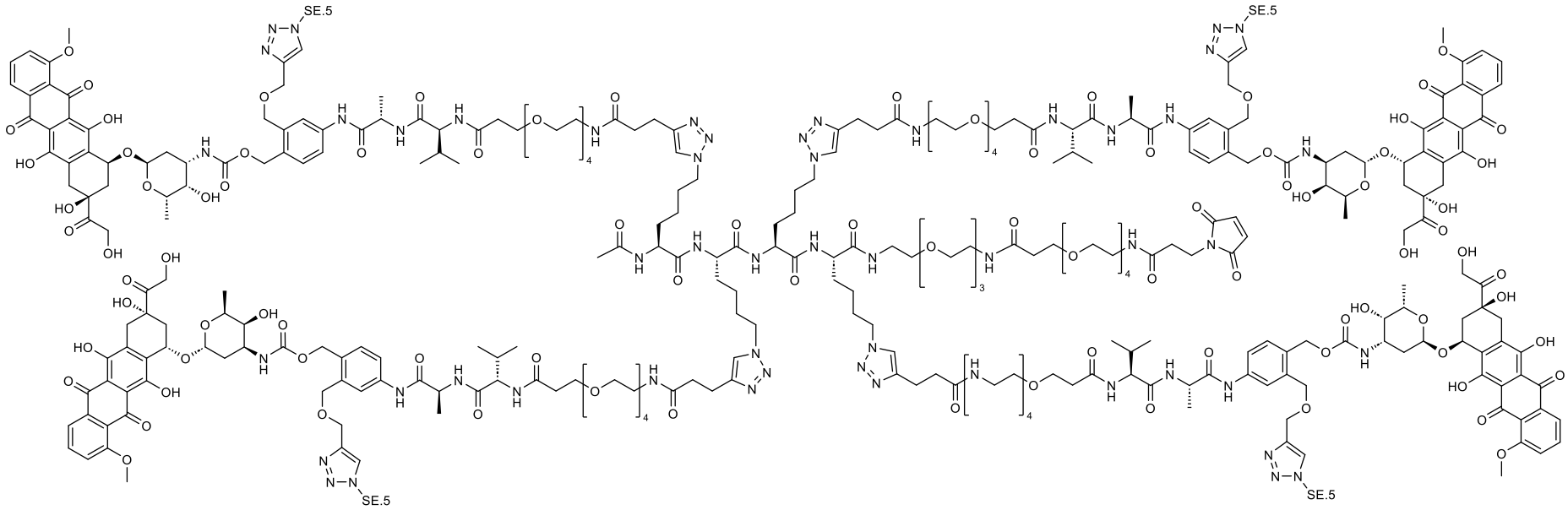
compuesto IV.**35** (15,83 mg, 86 %) como un sólido rojo claro. HPLC (método N): t_R= 13,6 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1656,9521 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1656,9566 $[C_{288}H_{442}N_{30}O_{144}]^{4+}$

Síntesis de **III.36**



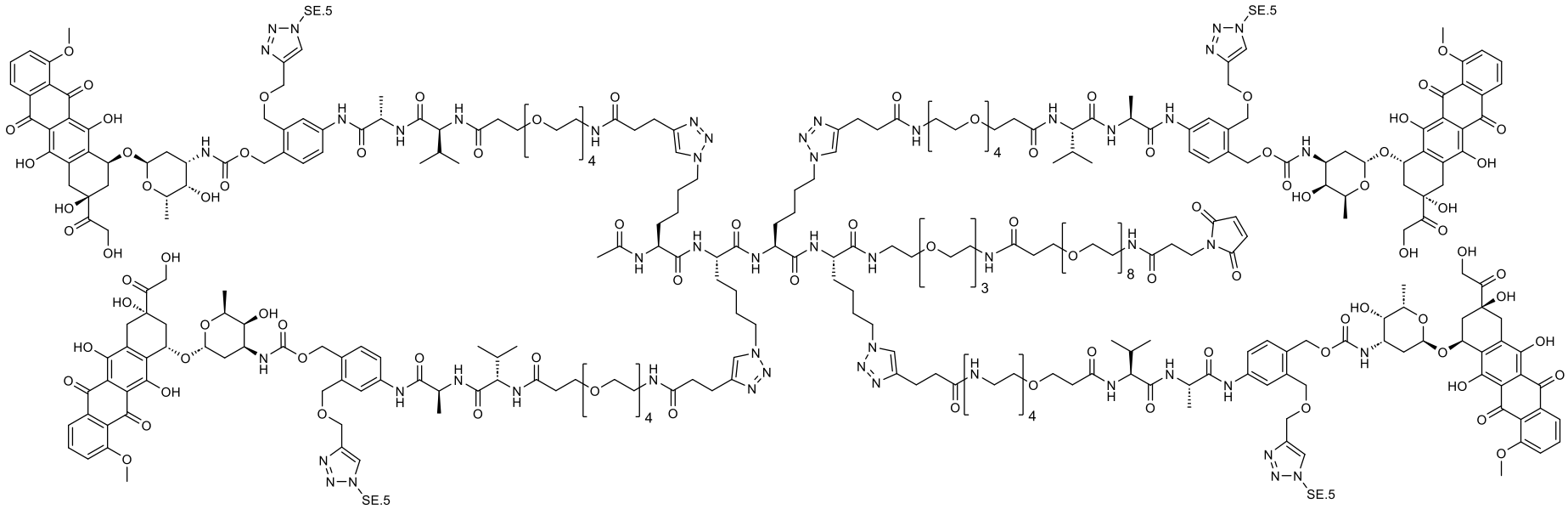
El intermediario **III.36** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.2** (2,94 mg, 3,45 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.35** (40,00 mg, 14,1 µmol, 4,1 equiv.), sulfato de cobre(II) pentahidratado (3,52 mg, 14,1 µmol, 4,1 equiv.), Tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (7,34 mg, 16,9 µmol, 4,9 equiv.) y ascorbato sódico (5,59 mg, 28,2 µmol, 8,2 equiv.) en DMF/agua (1100 µL, 10:1). Tras 1,5 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.36** como un liofilizado rojo claro (27,9 mg, 66 %). HPLC (método H**,** 480 nm): t_R= 12,5 min.

Síntesis de IV.**36**



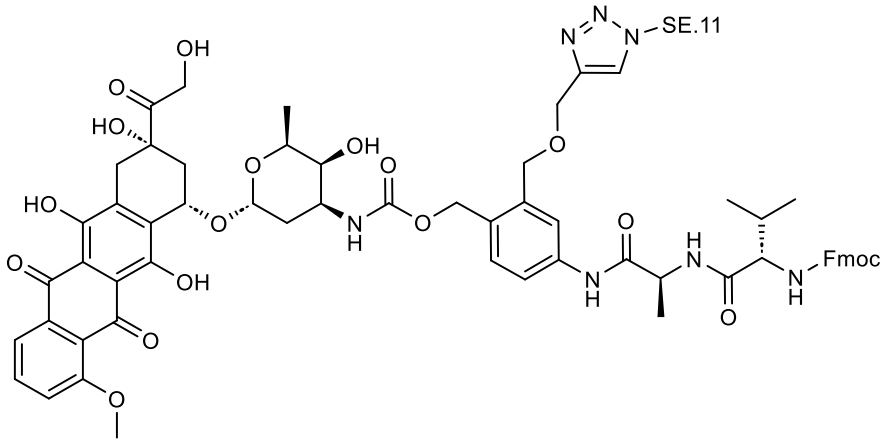
El compuesto IV.**36** se sintetizó según el GP4 usando la sal TFA del intermediario **III.36** (10,0 mg, 0,82 µmol, 1 equiv.), éster Mal-PEG4-NHS (1,68 mg, 3,27 µmol, 4 equiv.) y DIPEA (0,57 µL, 3,27 µmol, 4 equiv.) en DMF (160 µL). Tras completarse después de 0,5 h, la mezcla de reacción se acidificó con TFA (1,0 µl), se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**36** (9,62 mg, 93 %) como un sólido rojo claro. HPLC (método N): t_R= 13,6 min. MS (ESI): m/z encontrado= 2103,7032 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 2103,3847 $[C_{548}H_{834}N_{56}O_{276}]^{6+}$.

Síntesis de IV.**37**



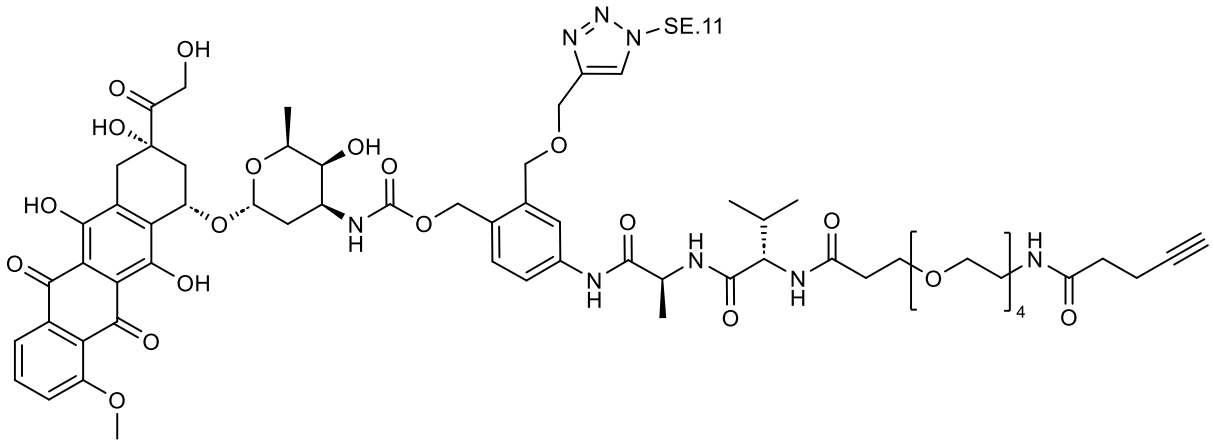
El compuesto IV.**37** se sintetizó según el GP4 usando la sal de TFA del intermediario **III.36** (10,0 mg, 0,82 µmol, 1 equiv.), éster de Mal-PEG_8-NHS (2,26 mg, 3,27 µmol, 4 equiv.) y DIPEA (0,57 µL, 3,27 µmol, 4 equiv.) en DMF (160 µL). Una vez completada después de 45 min, la mezcla de reacción se acidificó con TFA (1,0 µl), se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**36** (8,1 mg, 77 %) como un sólido rojo claro. HPLC (método N): t_R= 12,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 2133,3941 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 2132,7355 $[C_{556}H_{850}N_{56}O_{280}]^{6+}$.

Síntesis de **I.3**8



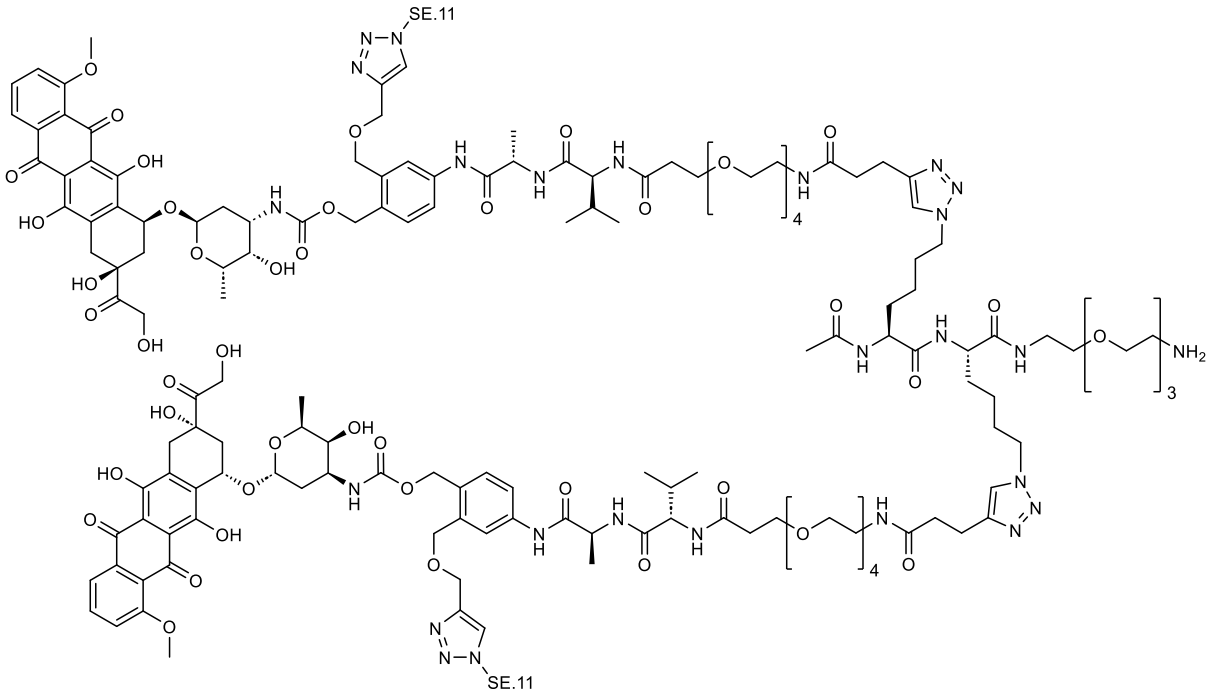
El intermediario **I.38** se sintetizó según el GP1 usando el intermediario 4.**9** (234 mg, 156 µmol, 1,2 equiv.), el intermediario 1.**17** (150 mg, 130 µmol, 1,0 equiv.) en DMF (1300 µL) con 325 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 200 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 240 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 600 mM de ascorbato sódico. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.38** como un sólido naranja (252,9 mg, 74 %) Método **A** de HPLC **(**480 nm): t_R = 9,8 min.

Síntesis de **II.3**8



El intermediario **II.38** se sintetizó según el GP3 utilizando el intermediario **I.38** (252 mg, 95,4 µmol, 1 equiv.), 197 µL de dietilamina (1,91 mmol, 20 equiv.) en 2,5 mL de DMF para desprotección con Fmoc. Después de 30 min El producto crudo se purificó por HPLC prep. para obtener 39 mg (17 %) de la amina libre, HPLC (método **A**): t_R= 7,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1215,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1215,5. La amina libre se hizo reaccionar posteriormente con **el intermediario 3.2** (9,86 mg, 20,1 µmol, 1,25 equiv.), diisopropiletilamina (8,41 µL, 48,3 µmol, 3 equiv.) en DMF (390 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.38** (34,7 mg, 78 %) como un sólido rojo. HPLC (método **A**): t_R= 8,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1379,7 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1379,0.

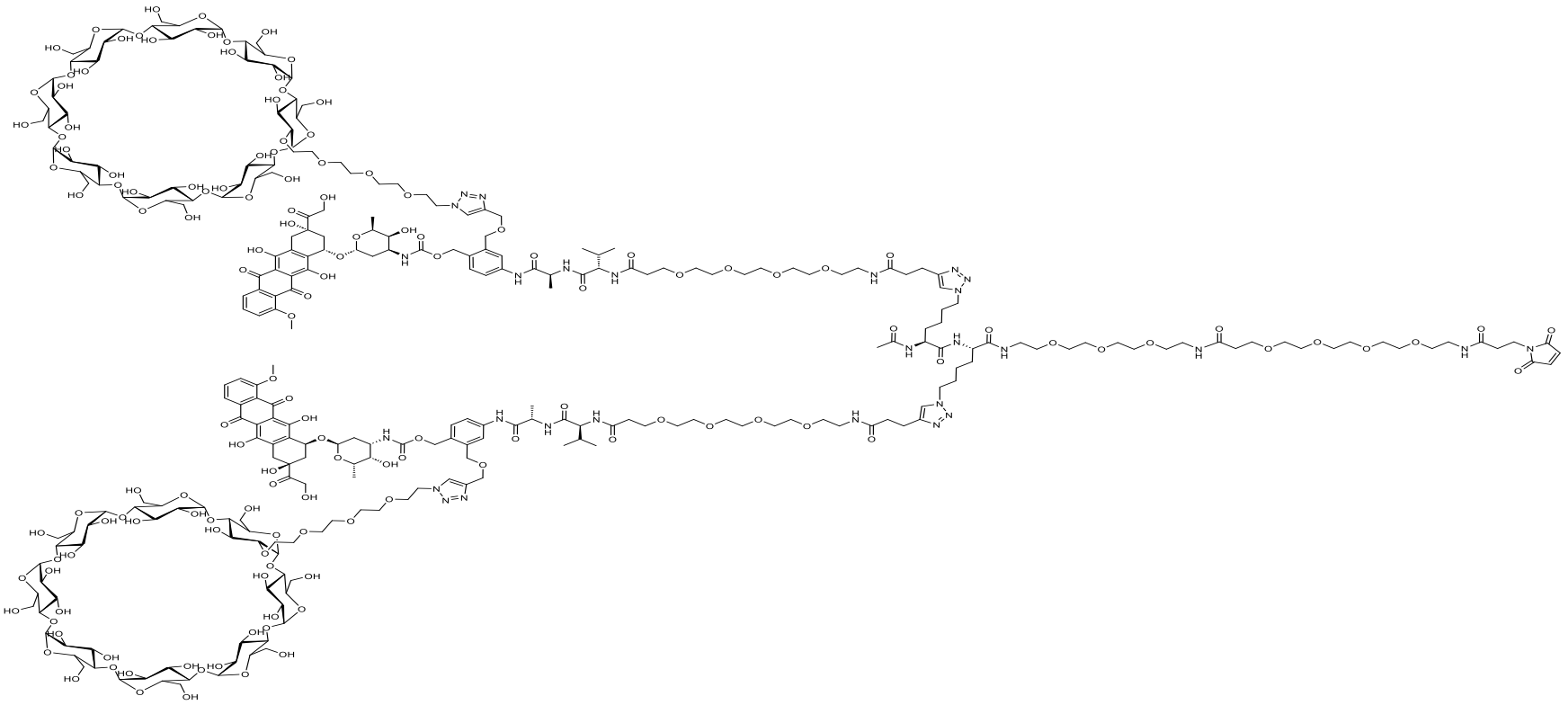
Síntesis de **III.38**



El intermediario **III.38** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (3,3 mg, 5,7 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.38** (34,5 mg, 12,5 µmol, 2,4 equiv.) en DMF 5 (680 µL) con 68 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Después de 1 h, la reacción se completó y la mezcla de reacción se acidificó con 1,95 µl de TFA, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.38** como un liofilizado rojo claro (24,7 mg, 69 %). HPLC (método **N,** 480 nm): t_R= 11,05 min. MS (ESI): m/z encontrado=

1514,9 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1514,9.

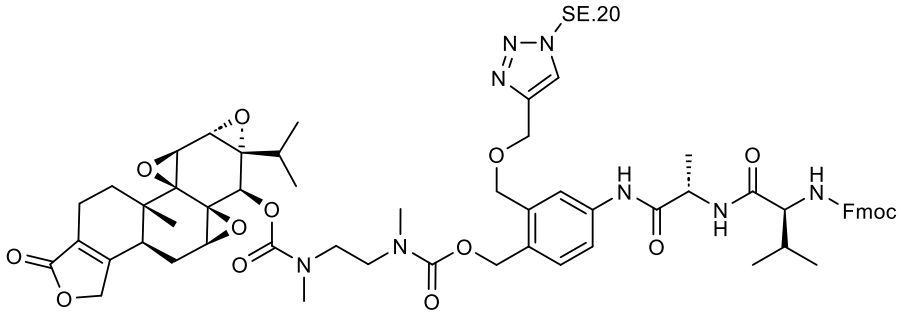
Síntesis de IV.**38**



El compuesto IV.**38** se sintetizó según el GP4 usando la sal TFA del intermediario **III.38** (12,0 mg, 1,98 µmol, 1 equiv.), éster Mal-PEG4-NHS (4,07 mg, 7,92 µmol, 4 equiv.) y DIPEA (1,37 µL, 11,2 µmol, 4 equiv.) en DMF (560 µL). Tras completarse después de 0,5 h, la mezcla de reacción se acidificó con TFA (1,7 µl), se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el

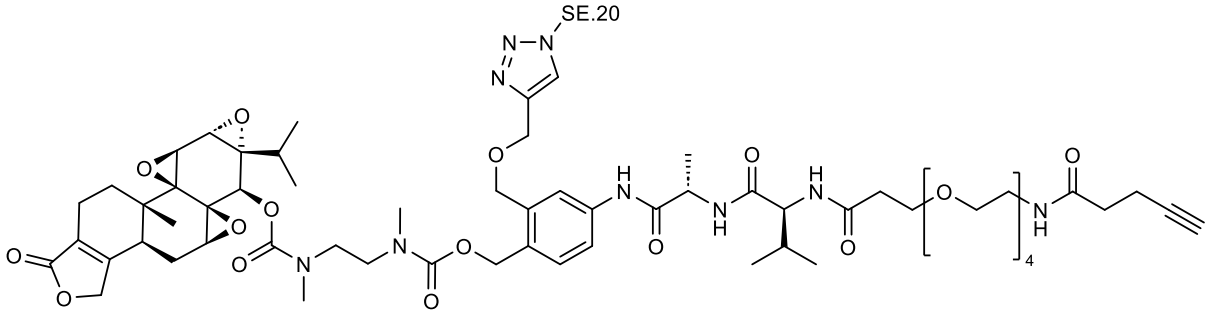
compuesto IV.**38** (8,23 mg, 65 %) como un sólido rojo claro. HPLC (método N): t_R= 12,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1614,3937 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1614,1612 $[C_{278}H_{420}N_{28}O_{144}]^{4+}$.

Síntesis de **I.39**



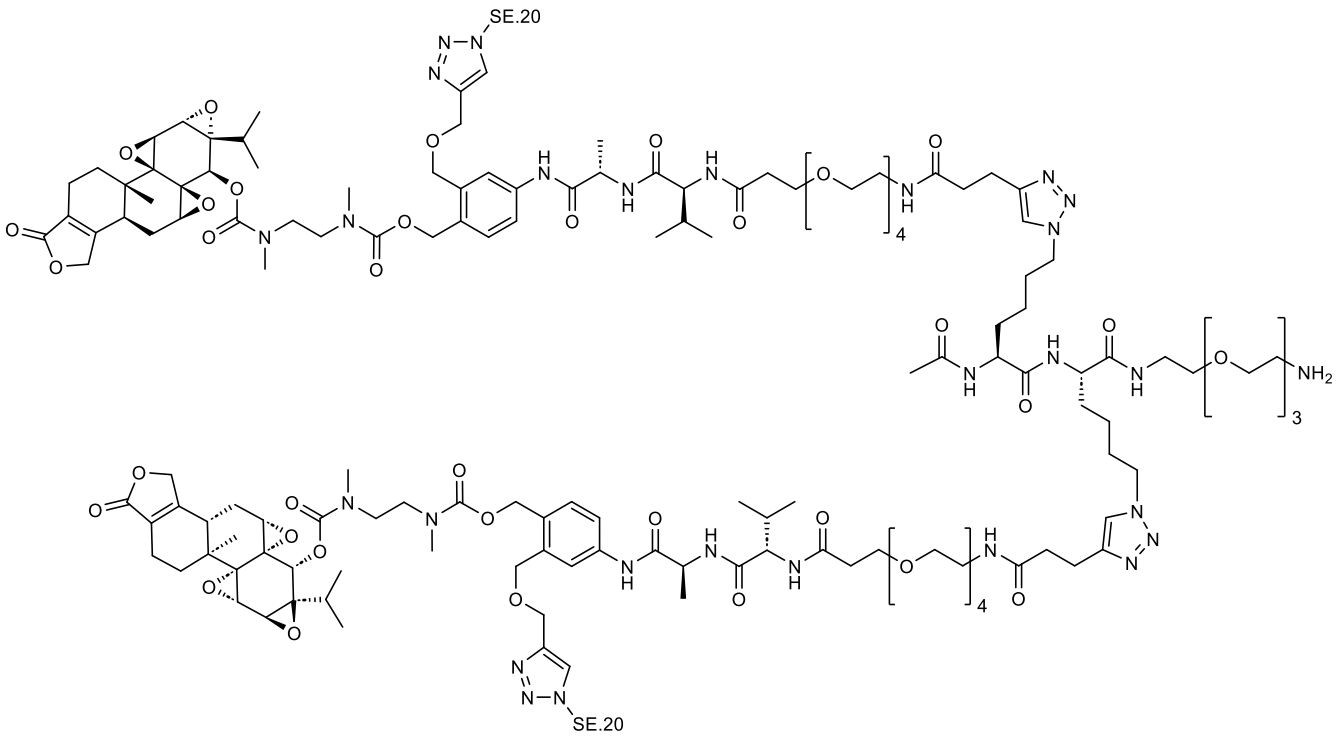
El intermediario **I.39** se sintetizó según el GP1 usando el intermediario 4.**9** (247 mg, 156 µmol, 1,2 equiv.), el intermediario 1.**21** (150 mg, 130 µmol, 1,0 equiv.) en DMF (672 µL) con 336 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.39** como un sólido incoloro (140,19 mg, 81 %) Método **A** de HPLC (260 nm): t_R = 10,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1292,1 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1292,0.

Síntesis de **II.39**



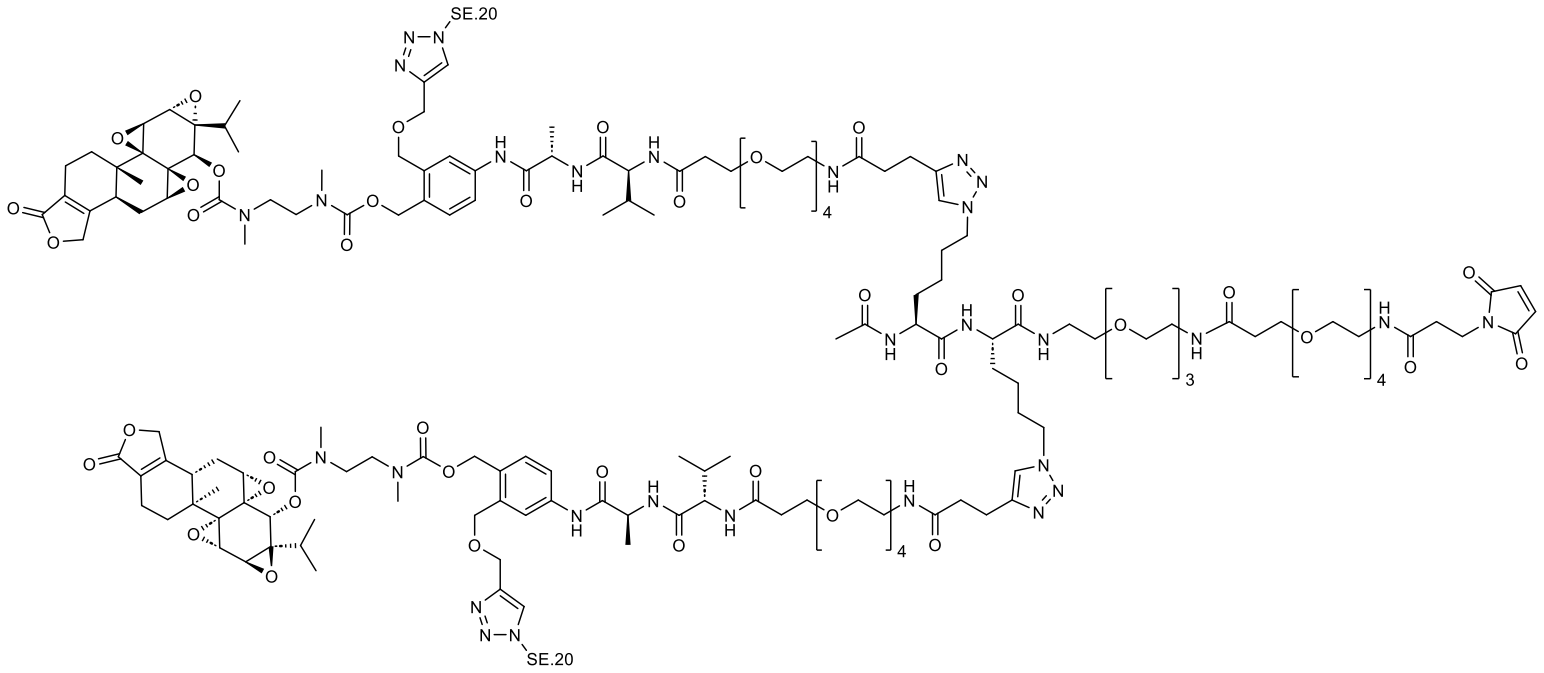
El intermediario **II.39** se sintetizó según GP3 utilizando el intermediario **I.39** (140,19 mg, 54,28 µmol, 1 equiv.), 281 µL de dietilamina (2,71 mmol, 50 equiv.) en 1,6 mL de DMF para desprotección Fmoc a la amina libre, HPLC (método **A**): t_R= 7,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1181,4 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1180,98. La amina bruta se hizo reaccionar posteriormente con **el intermediario 3.2** (34,61 mg, 70,57 µmol, 1,3 equiv.) y diisopropiletilamina (24,0 µL, 141 µmol, 2,6 equiv.) en DMF (1000 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.39** (103,77 mg, 71 %) como un sólido incoloro. HPLC (método **H**): t_R= 13,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1344,8 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1344,6.

Síntesis de **III.39**



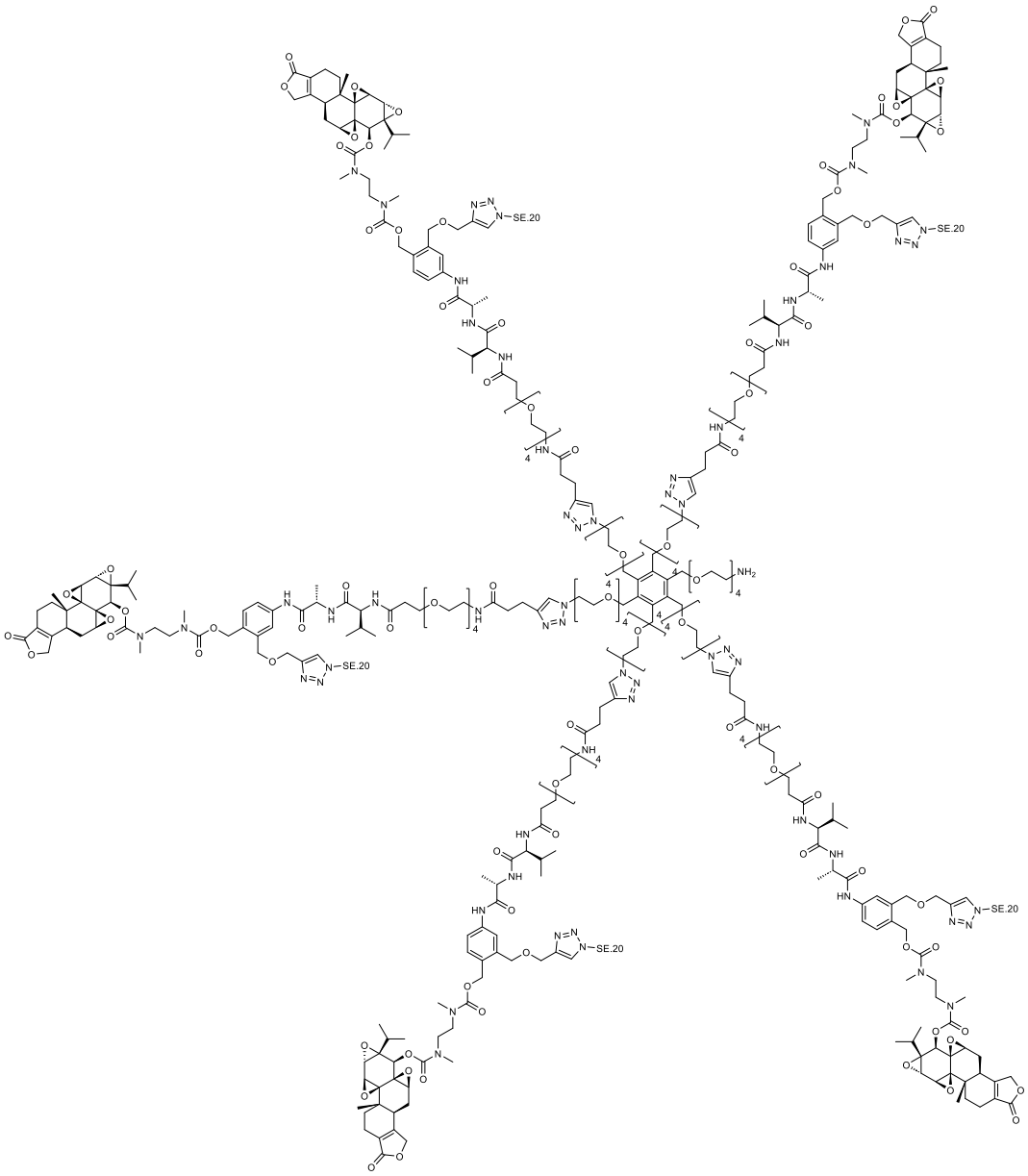
El intermediario **III.39** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (2,41 mg, 4,17 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.30** (26,88 mg, 10 µmol, 2,4 equiv.) en DMF (500 µL) con 50 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Tras 50 min, la reacción se completó y la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.39** como un liofilizado incoloro (16,60 mg, 53 %). HPLC (método N**,** 250 nm): t_R= 12,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1973,7; $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1973,53.

Síntesis de IV.**39**



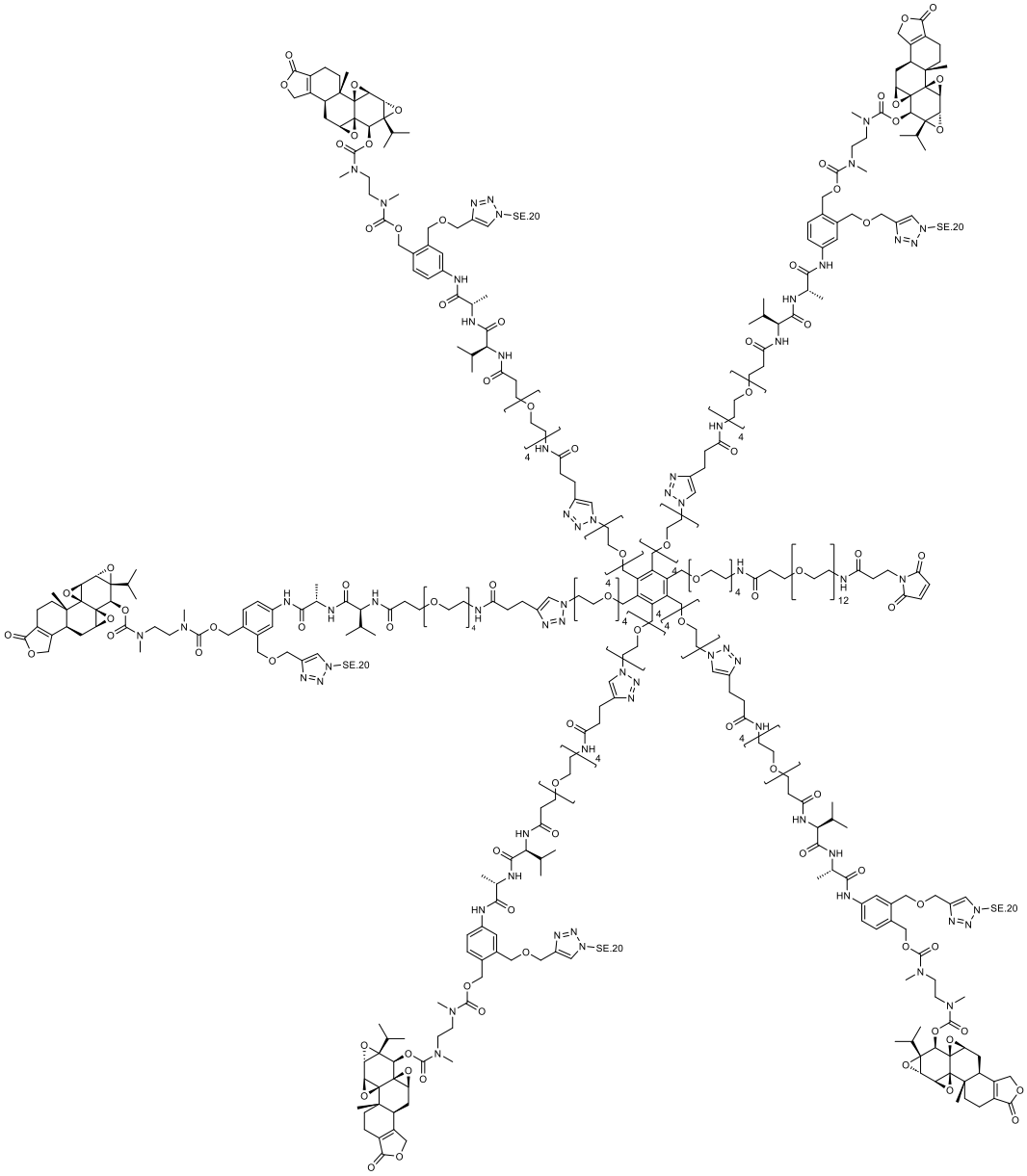
El compuesto IV.**39** se sintetizó según el GP4 usando la sal TFA del intermediario **III.39** (16,06 mg, 2,66 µmol, 1 equiv.), éster de Mal-PEG4-NHS (2,73 mg, 5,32 µmol, 2 equiv.) y DIPEA (0,90 µL, 5,32 µmol, 2 equiv.) en DMF (266 µL). Tras completarse después de 2,5 h, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**39** (13,78 mg, 82 %) como un liofilizado incoloro. HPLC (método J, 250 nm): t_R= 12,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1580,1 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1579,69 $[C_{274}H_{430}N_{30}O_{136}]^{4+}$.

Síntesis de **III.40**



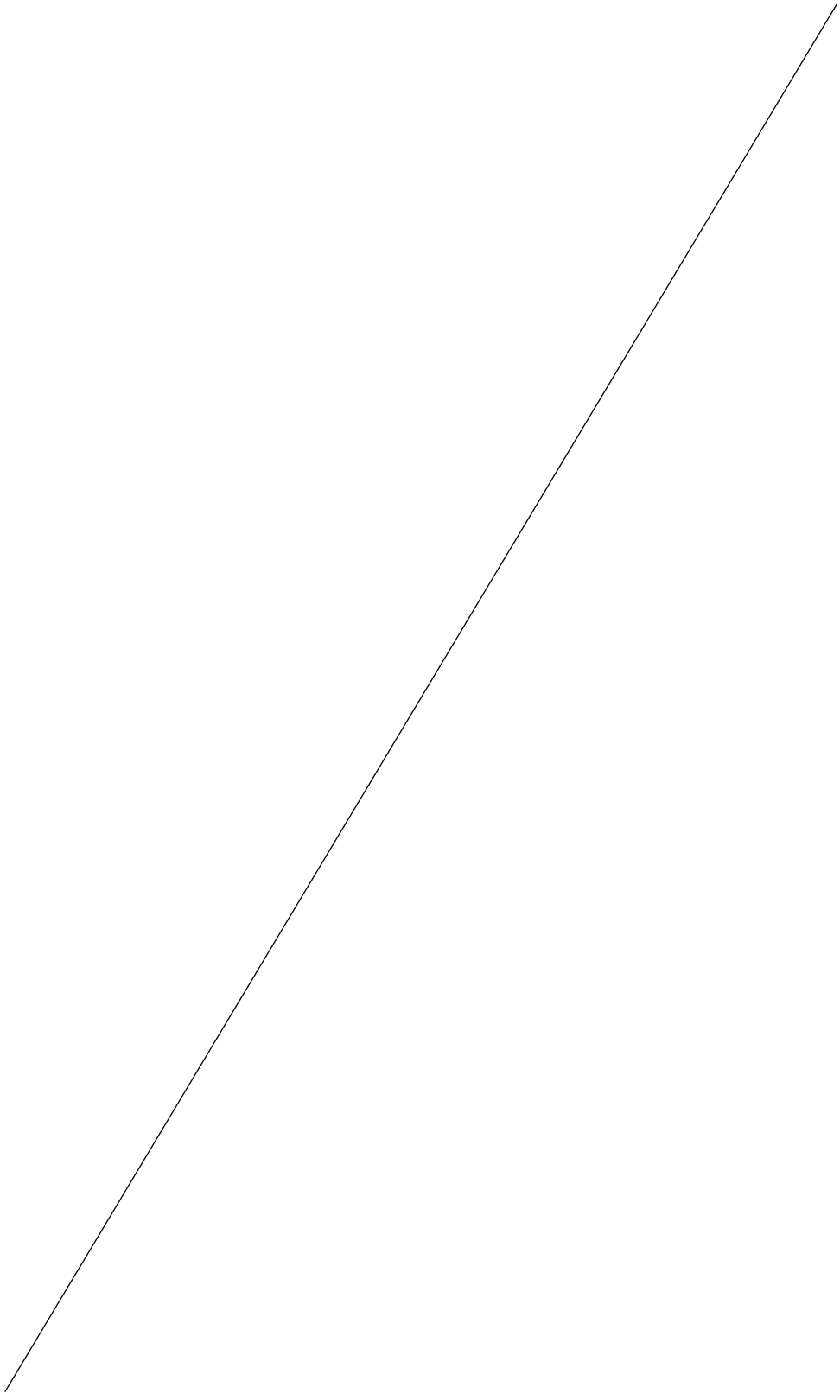
El intermediario **III.40** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.4** (5,18 mg, 3,33 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.39** (53,75 mg, 20,00 µmol, 6,0 equiv.), en DMF (1000 µL) con 100 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Tras 50 min, la reacción se completó y la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para obtener el intermediario **III.40** como un liofilizado incoloro (36,27 mg, 73 %). HPLC (método N**,** 250 nm): t_R= 15,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 2480,73; $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 2479,74.

Síntesis de IV.**40**

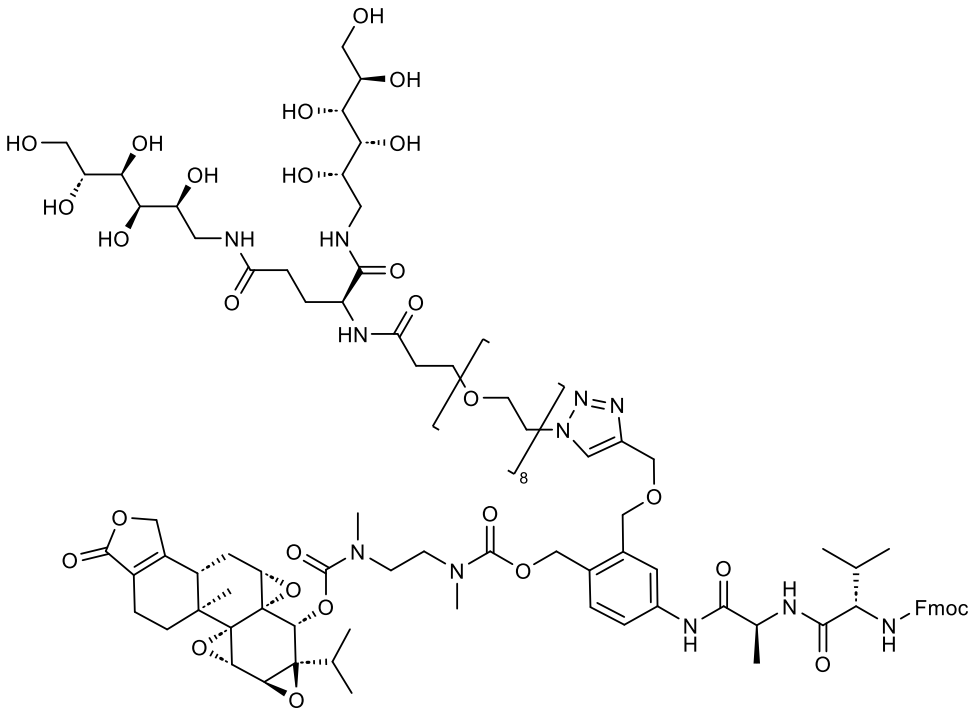


El compuesto IV.**40** se sintetizó según el GP4 usando la sal TFA del intermediario **III.40** (36,27 mg, 2,42 µmol, 1 equiv.), solución de éster de Mal-PEG12-NHS, 100 mM en DMF (48,4 µL, 4,84 µmol, 2 equiv.) y solución de éster de DIPEA, 100 mM en DMF (48,4 µL, 4,84 µmol, 2 equiv.) en DMF (242 µL). Una vez completada después de 4,5 h, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a 10 mL de MTBE enfriado con hielo y el precipitado se recogió por centrifugación (4000 × g, 4 min) y se lavó con 10 mL de MTBE enfriado con hielo. El producto crudo se disolvió en TFA/ACN al 0,05 % 80:20, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**40** (32,75 mg, 87 %) como un liofilizado incoloro. HPLC (método AE): t_R= 15,4 min. $_{679}$MS (ESI):

m/z encontrado= *2*608,65 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 2604,80 $[C_{679}H_{1069}N_{63}O_{345}]^{6+}$.

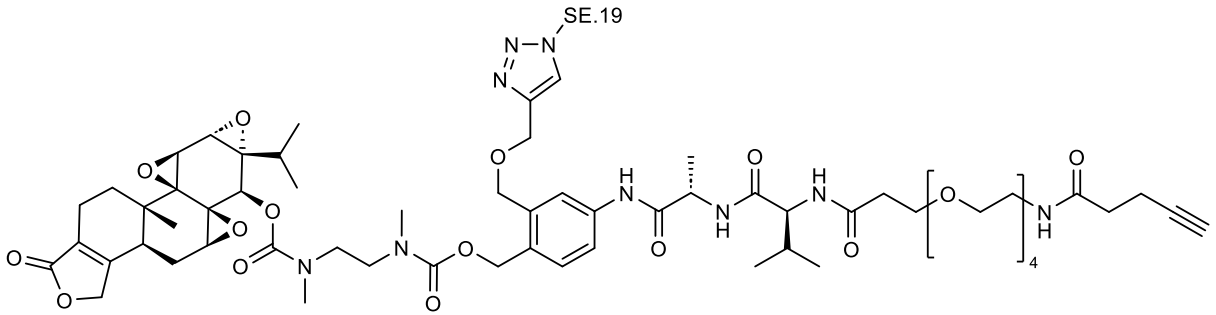


Síntesis de **I.41**



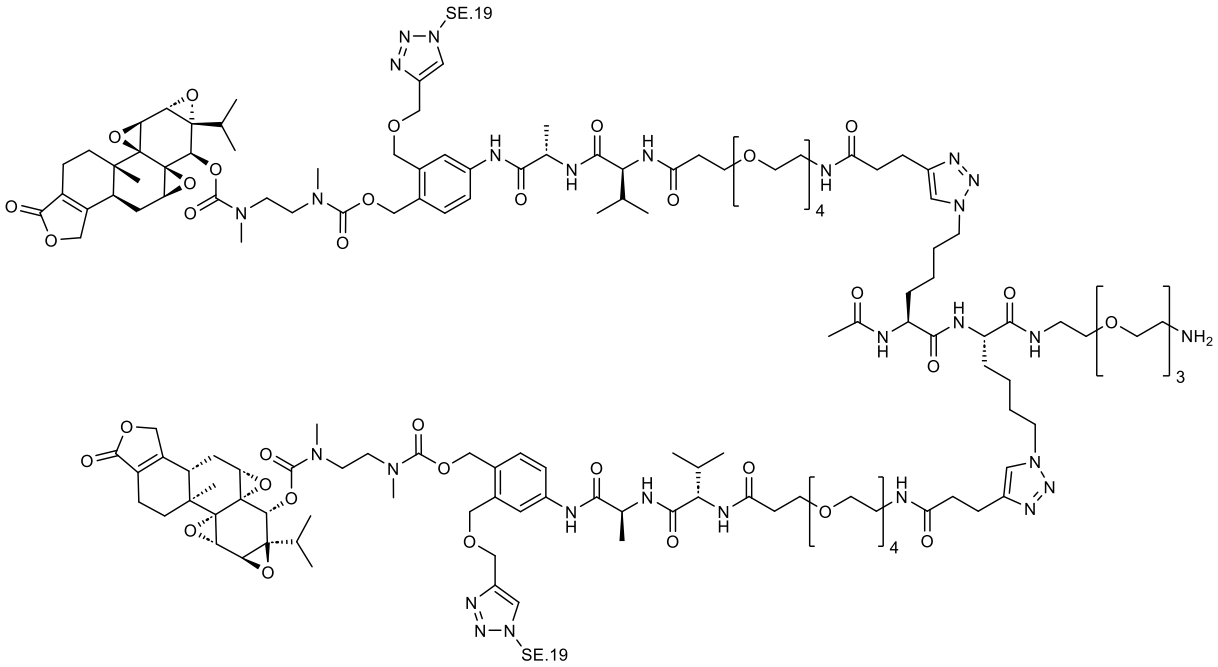
El intermediario **I.41** se sintetizó según GP1 agitando el intermediario 6.**4** (72,97 mg, 79,06 µmol, 1,2 equiv.) y el intermediario 1.**21** (71,43 mg, 65,88 µmol, 1,0 equiv.) en DMF (659 µL) con 329 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico durante 50 min. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **I.41** como un sólido incoloro (100,71 mg, 76 %) Método **A** de HPLC **(**260 nm): t_R = 10,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1004,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1004,5 $[C_{96}H_{141}N_{11}O_{35}]^{2+}$.

Síntesis de **II.41**



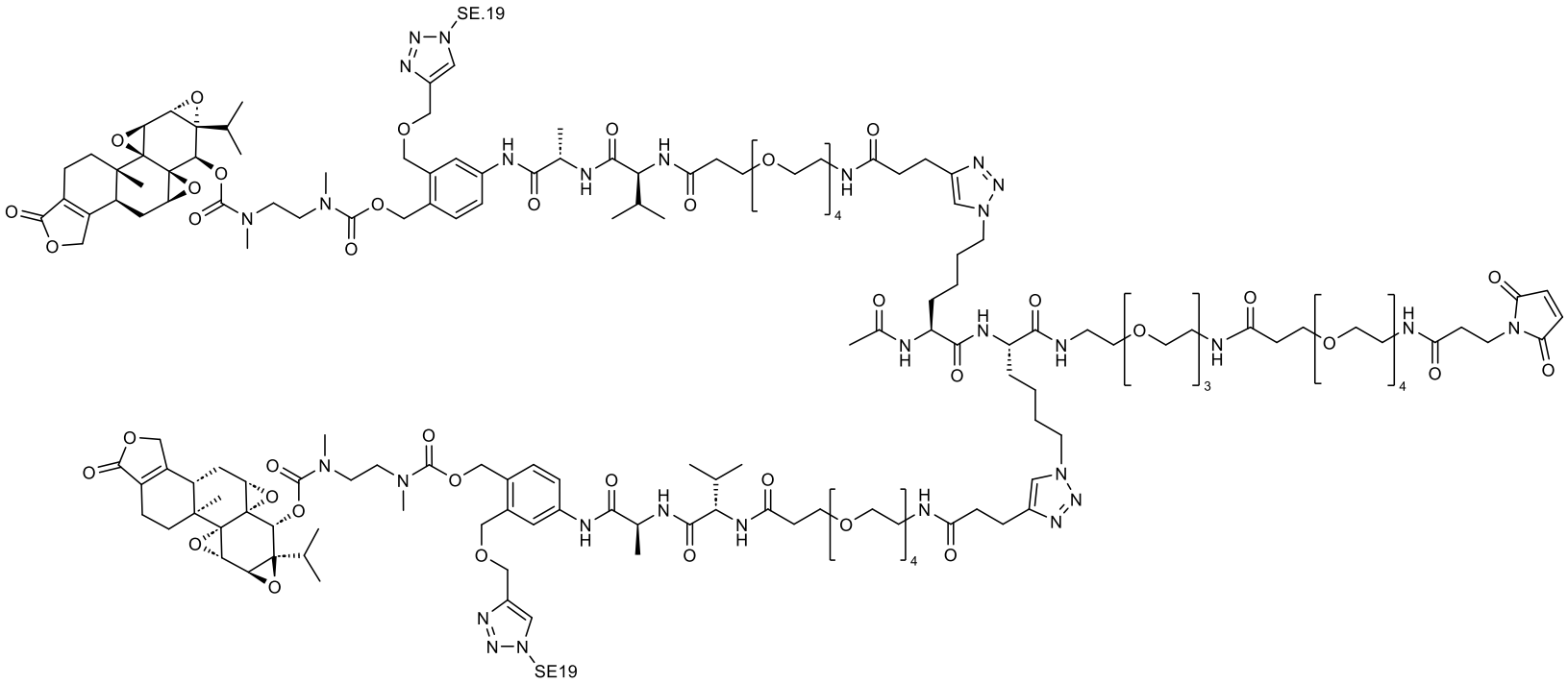
El intermediario **II.41** se sintetizó según GP3 usando el intermediario **I.41** (140,19 mg, 54,28 µmol, 1 equiv.), 281 µL de dietilamina (2,71 mmol, 50 equiv.) en 1,6 mL de DMF para desprotección Fmoc a la amina libre, HPLC (método **A**): t_R= 7,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 893,4 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 892,9. La amina bruta se hizo reaccionar posteriormente con **el intermediario 3.2** (31,99 mg, 65,23 µmol, 1,3 equiv.) y diisopropiletilamina (22,2 µL, 130,45 µmol, 2,6 equiv.) en DMF (1000 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.41** (71,32 mg, 67 %) como un sólido incoloro. HPLC (método **H**): t_R= 13,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1057,0 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1057,0 $[C_{97}H_{156}N_{12}O_{39}]^{2+}$. ----------

Síntesis de **III.41**



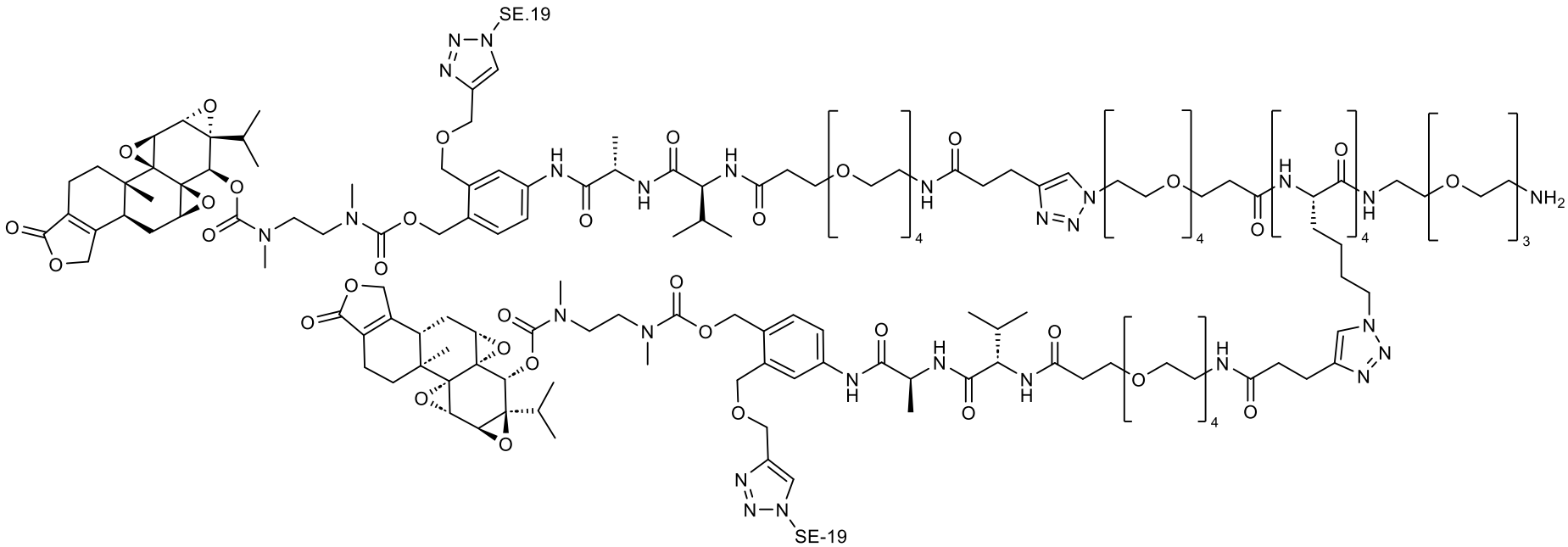
El intermediario **III.41** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.1** (2,41 mg, 4,17 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.41** (21,12 mg, 10,00 µmol, 2,4 equiv.) en DMF (500 µL) con 50 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Tras 50 min, la reacción se completó y la mezcla de reacción se acidificó con 43,9 µl de 5proz. TFA, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.41** como un liofilizado incoloro (14,30 mg, 59 %). HPLC (método **N,** 250 nm): t_R= 15,9 min. MS (ESI): m/z encontrado= 954,5 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 954,3 $[C_{216}H_{355}N_{34}O_{84}]^{5+}$.

Síntesis de IV.**41**



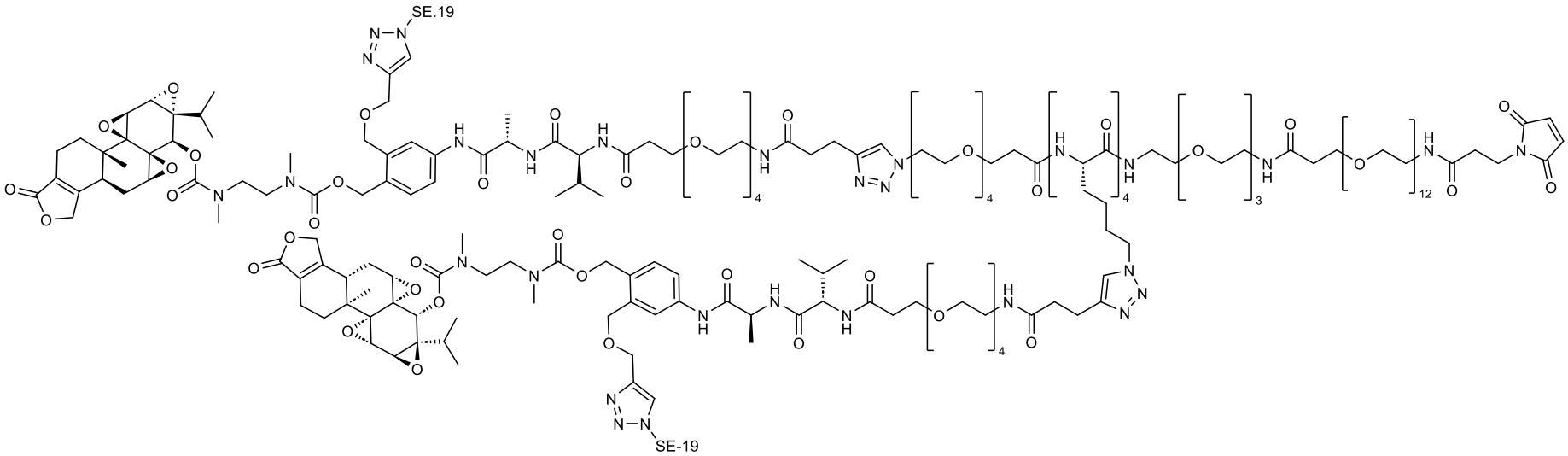
El compuesto IV.**41** se sintetizó según el GP4 usando la sal TFA del intermediario **III.41** (14,06 mg, 2,88 µmol, 1 equiv.), solución de éster de Mal-PEG4-NHS, 100mM en DMF (57,6 µL, 5,76 µmol, 2 equiv.) y solución de DIPEA, 100mM en DMF (57,6 µL, 5,76 µmol, 2 equiv.) en DMF (288 µL). Tras completarse después de 3 h, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**41** (12,52 mg, 84 %) como un liofilizado incoloro. HPLC (método J, 250 nm): t_R= 13,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1292,3 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1292,2 $[C_{234}H_{380}N_{36}O_{92}]^{4+}$.

Síntesis de **III.42**



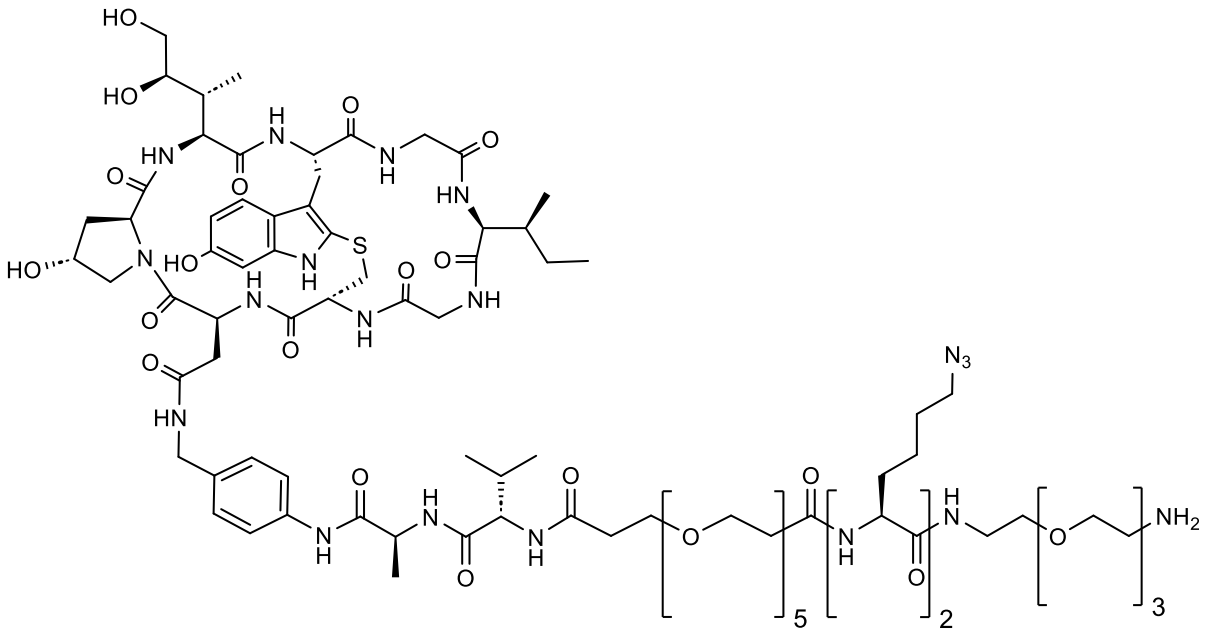
El intermediario **III.42** se sintetizó según el GP2 utilizando **el intermediario 2.3** (3,99 mg, 3,33 µmol, 1 equiv.), el intermediario **II.41** (42,25 mg, 20,00 µmol, 6,0 equiv.) en DMF (1000 µL) con 100 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Tras 50 min, la reacción se completó y la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para obtener el intermediario **III.42** como un liofilizado incoloro (23,57 mg, 60 %). HPLC (método **N** 250 nm): t_R= 18,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1941,3 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 1941,0.

Síntesis de IV.**42**



El compuesto IV.**42** se sintetizó según el GP4 usando la sal TFA del intermediario **III.42** (23,57 mg, 2,00 µmol, 1 equiv.), solución de éster de Mal-PEG12-NHS, 100 mM en DMF (40,1 µL, 4,01 µmol, 2 equiv.) y solución de DIPEA, 100 mM en DMF (40,1 µL, 4,01 µmol, 2 equiv.) en DMF (200 µL). Una vez completada después de 4,5 h, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a 10 mL de MTBE enfriado con hielo y el precipitado se recogió por centrifugación (4000 × g, 4 min) y se lavó con 10 mL de MTBE enfriado con hielo. El producto crudo se disolvió en TFA/ACN al 0,05 % 80:20, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**42** (20,98 mg, 84 %) como un liofilizado incoloro. HPLC (método AE): t_R= 18,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1771,8 $[M+7H]^{7+}$, m/z calculado= 1771,04 $[C_{562}H_{914}N_{83}O_{223}]^{7+}$.

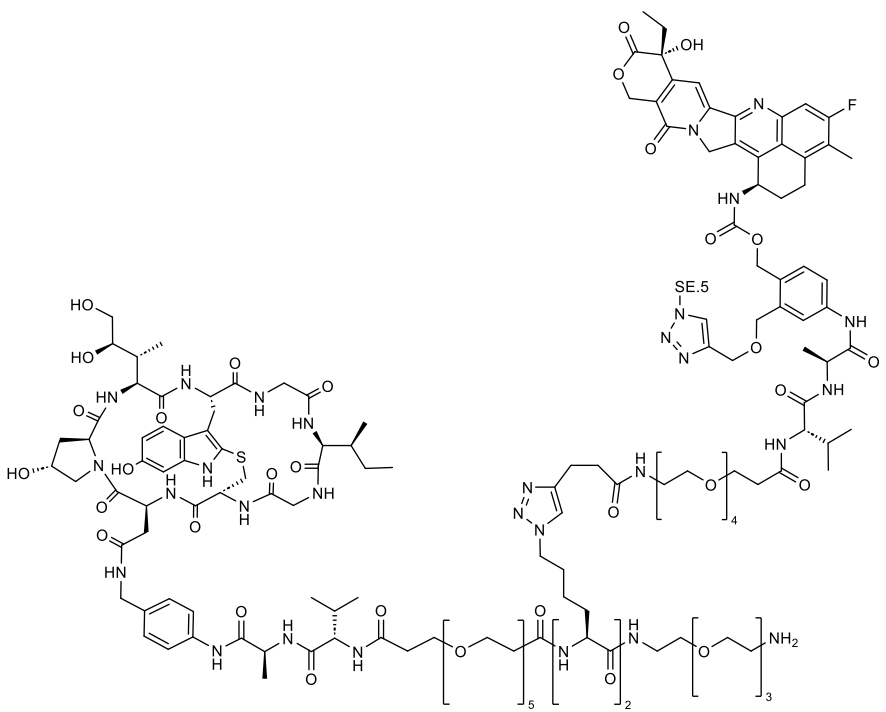
Síntesis de **II.43**



Se hincharon 200 mg (aprox. 40 µmol, 4 equiv.) de intermedio **2,5** cargado en resina durante 10 min en abs. Se filtró y se añadió a la resina una solución de desprotección Fmoc (1 mL) de piperidina al 20 % en DMF. La suspensión se incubó durante 20 min, se filtró y el procedimiento de desprotección se repitió una vez. A continuación, se lavó la resina con DMF (3 x 1 min) y se añadió una solución de éster Bis-PEG5-NHS (CAS: 756526-03-1, 85,2 mg, 160 µmol, 16 equiv.) y DIPEA (27,2 µL, 160 µmol, 16 equiv.) en 1 mL de DMF y se agitó durante toda la noche. A continuación se lavó la resina con 5 x DMF, 3x DCM y 3x DMF. A continuación, se añadieron el intermediario 1.**22** (12,92 mg, 10 µmol, 1,0 equiv.) y DIPEA (3,40 µL, 20 µmol, 2 equiv.) disueltos en 1 mL de DMF y la resina se agitó a temperatura ambiente durante 23 h. Después de

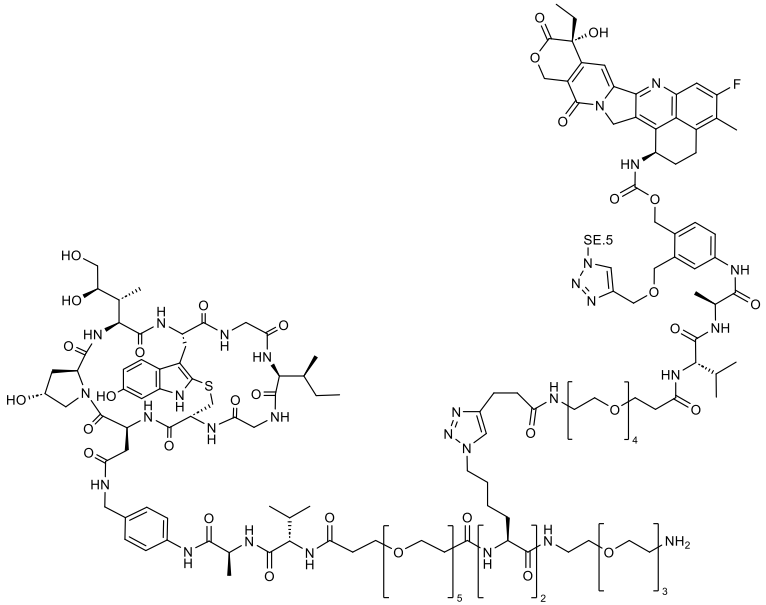
filtrar, la resina se lavó con 3 x DMF y 3x DCM y se añadió el cóctel de escisión DCM/TFA 1:1 (1 mL) y se agitó durante 15 min. La resina se filtró, se lavó con 1 mL de DCM y el filtrado combinado se añadió a 10 mL de una mezcla enfriada con hielo de MTBE y n-hexano (1:1). La resina se trató dos veces más con cóctel de escisión y cada filtrado individual se dejó caer en 10 mL de MTBE/hexano. Los precipitados se aislaron por centrifugación. Los precipitados combinados se resuspendieron en 10 mL de MTBE y se aislaron de nuevo por centrifugación, secándose posteriormente al vacío. Purificación por HPLC prep. dando como resultado 6,78 mg (32 % basado en el intermediario 1.**22**) del intermediario **II.43** como un liofilizado incoloro. HPLC (método AF): t_R= 15,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 991,4 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 991,0 $[C_{88}H_{139}N_{23}O_{27}S]^{2+}$.

Síntesis de **III.43**



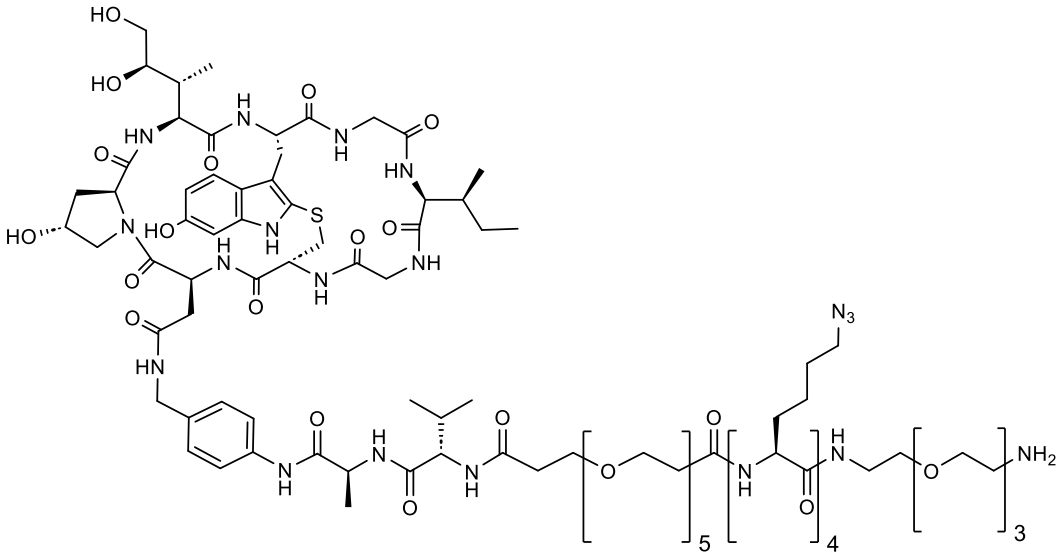
El intermediario **III.43** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermediario **II.43** (5,43 mg, 2,59 µmol, 1,0 equiv.) y el intermediario 4.**3** (17,00 mg, 6,22 µmol, 2,4 equiv.) en DMF (342 µL) con 31 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Tras 1 h se completó la reacción, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.43** como un liofilizado amarillento tenue (6,23 mg, 32 %). HPLC (método **AG,** 380 nm): t_R= 19,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1863,5 $[M+4H]^{4+}$, m/z calculado= 1862,8 $[C_{330}H_{497}F_2N_{45}O_{143}S]^{4+}$.

Síntesis de IV.**43**



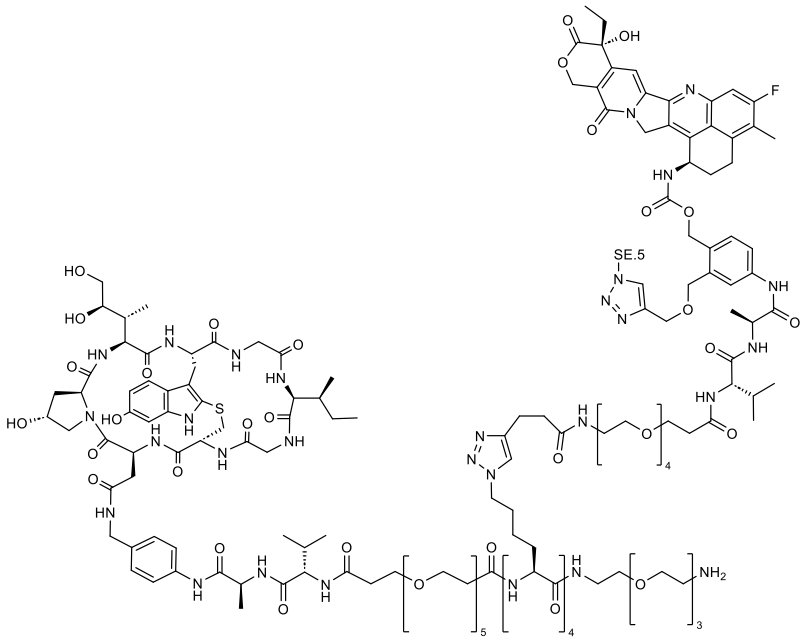
El compuesto IV.**43** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermediario **III.43** (6,23 mg, 0,82 µmol, 1 equiv.), solución de éster de Mal-PEG4-NHS, 100 mM en DMF (16,5 µL, 1,65 µmol, 2 equiv.) y solución de DIPEA, 100 mM en DMF (16,5 µL, 1,65 µmol, 2 equiv.) en DMF (82 µL). Tras 5,5 h, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a 5 mL de MTBE enfriado con hielo y el precipitado se recogió por centrifugación (4000 × g, 4 min) y se lavó con 5 mL de MTBE enfriado con hielo. El producto crudo se disolvió en 400 µl de DMF, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**43** (4,28 mg, 66 %) como un liofilizado amarillento tenue. HPLC (método J): t_R= 12,96 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1570,47581 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1570,0906 $[C_{348}H_{524}F_2N_{47}O_{151}S]^{5+}$.

Síntesis de **II.44**



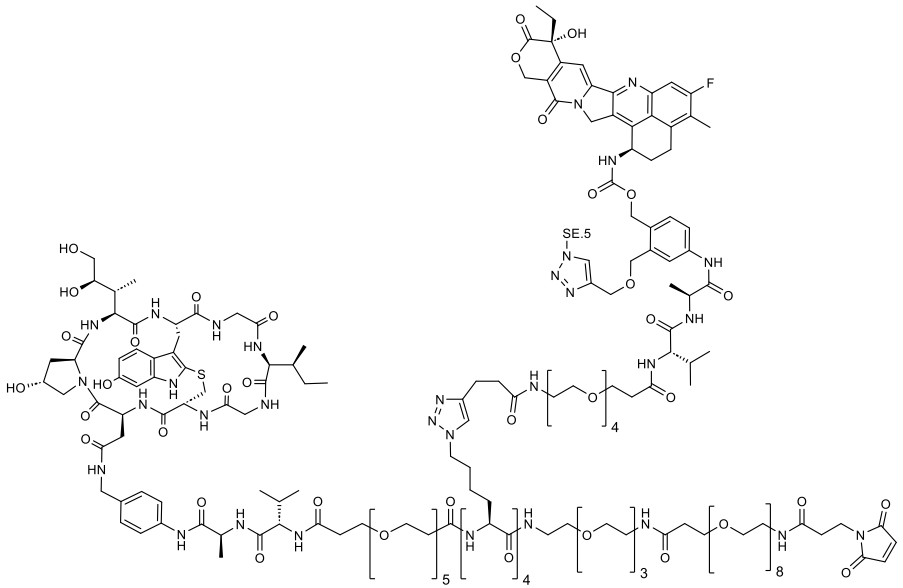
Se trataron 200 mg (aprox. 40 µmol, 4 equiv.) del intermediario 2.**6** cargado en resina con el mismo procedimiento descrito para el intermediario 4368 para obtener 11,60 mg (49 % basado en el intermediario 1.**22**) del intermediario **II.44** como un liofilizado incoloro. HPLC (método AF): t_R= 18,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1145,5 $[M+2H]^{2+}$, m/z calculado= 1145,6 $[C_{100}H_{159}N_{31}O_{29}S]^{2+}$.

Síntesis de **III.44**



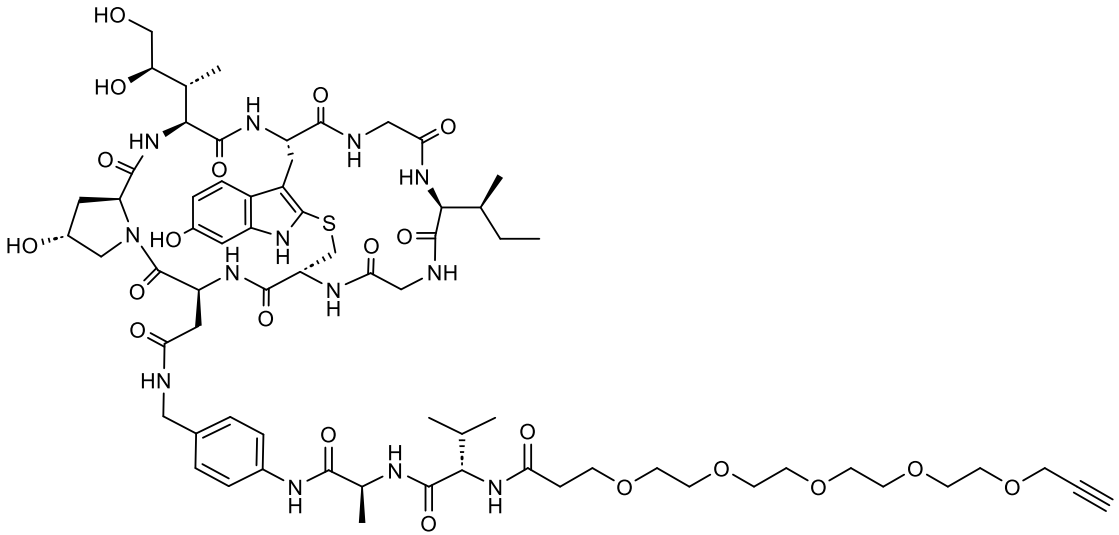
El intermediario **III.44** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermediario **II.44** (5,50 mg, 2,29 µmol, 1,0 equiv.) y el intermediario 4.**3** (30,00 mg, 10,97 µmol, 4,8 equiv.) en DMF (548 µL) con 54,9 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Tras 1 h se completó la reacción, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.44** como un liofilizado amarillento tenue (12,87 mg, 42 %). HPLC (método **AG,** 380 nm): t_R= 21,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1890,8 $[M+7H]^{7+}$, m/z calculado= 1889,8 $[C_{584}H_{876}F_4N_{75}O_{261}S]^{7+}$.

Síntesis de IV.**44**



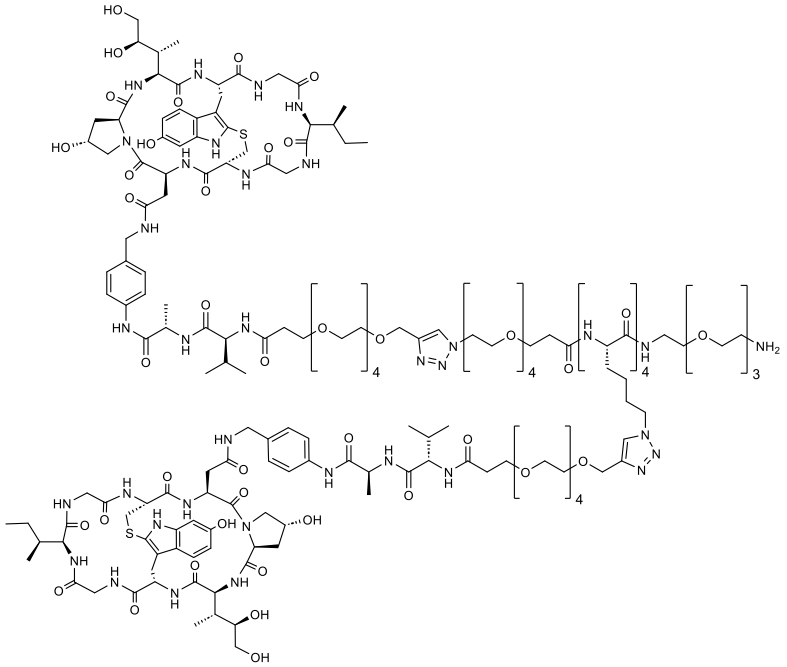
El compuesto IV.**44 se** sintetizó según el GP4 usando la sal TFA del intermediario **III.44** (12,87 mg, 0,96 µmol, 1 equiv.), solución de éster de Mal-PEG$_8$-NHS, 100 mM en DMF (19,3 µL, 1,93 µmol, 2 equiv.) y solución de DIPEA, 100 mM en DMF (19,3 µL, 1,93 µmol, 2 equiv.) en DMF (192 µL). Tras 5,5 h, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a 5 mL de MTBE enfriado con hielo y el precipitado se recogió por centrifugación (4000 × g, 4 min) y se lavó con 5 mL de MTBE enfriado con hielo. El producto crudo se disolvió en 400 µl de DMF, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**44** (10,03 mg, 75 %) como un liofilizado amarillento tenue. HPLC (método J): t_R= 13,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 2300,99 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 2300,33 $[C_{610}H_{917}F_4N_{77}O_{273}S]^{6+}$.

Síntesis de **II.45**



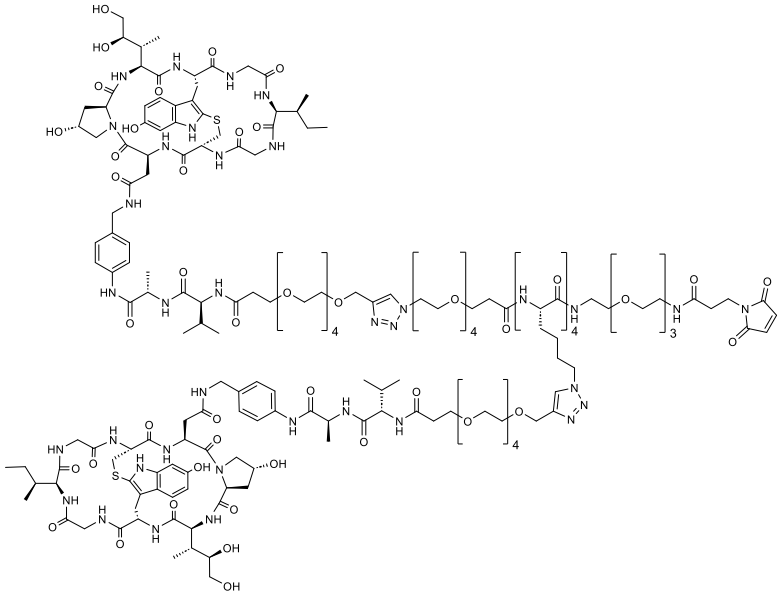
El intermediario **II.45** se sintetizó según el GP3 usando el intermediario crudo **I.22** (48 µmol, 1 equiv.), el intermediario 3.**1** (43 mg, 96 µmol, 2,0 equiv.) y diisopropiletilamina (16,3 µL, 96 µmol, 2,0 equiv.) en DMF (2000 µL) para la reacción de acoplamiento. La purificación por RP-HPLC proporcionó el intermediario **II.41** (52 mg, 74 %) como un sólido incoloro. HPLC (método **H**): t_R= 12,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1464,58 $[MH]^+$, m/z calculado= 1464,67 $[C_{68}H_{98}N_{13}O_{21}S]^{2+}$.

Síntesis de **III.45**



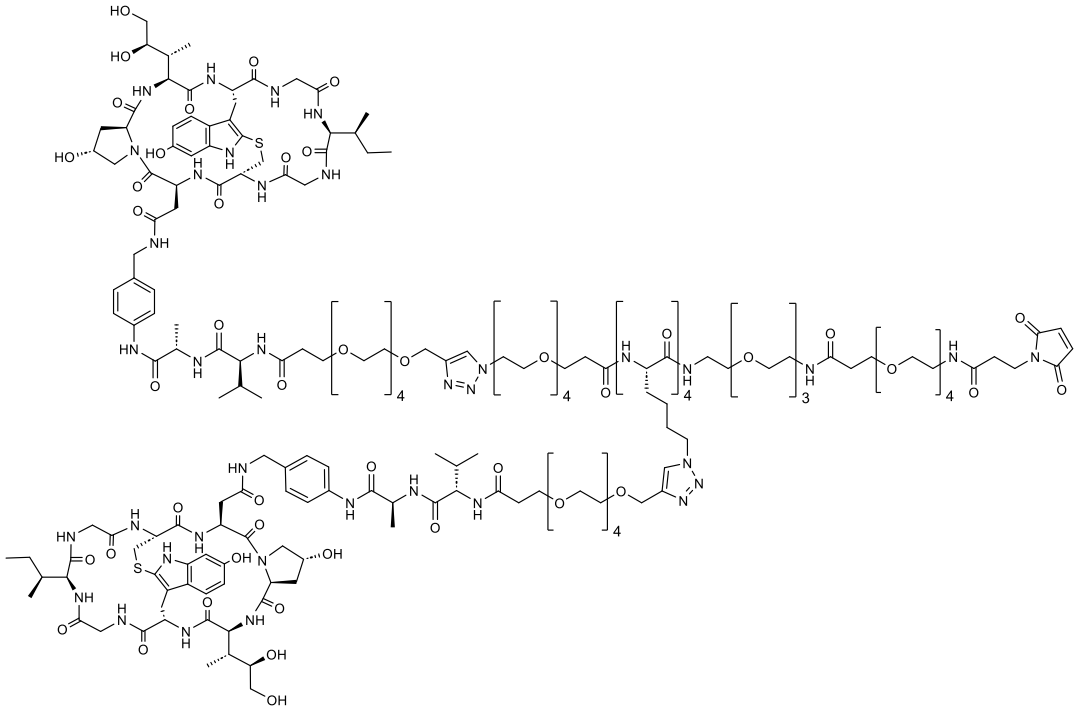
El intermediario **III.45** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermediario **II.45** (26 mg, 17,8 µmol, 6,0 equiv.) y el intermediario 2.**3** (3,2 mg, 2,96 µmol, 1,0 equiv.) en DMF (444 µL) con 88,8 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Tras 2 h se completó la reacción, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.44** como un liofilizado amarillento tenue (15,9 mg, 63 %). HPLC (método **J,** 305 nm): t_R= 12,8 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1682,2 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1681,8 $[C_{383}H_{569}N_{86}O_{117}S_5]^{7+}$.

Síntesis de IV.**45**



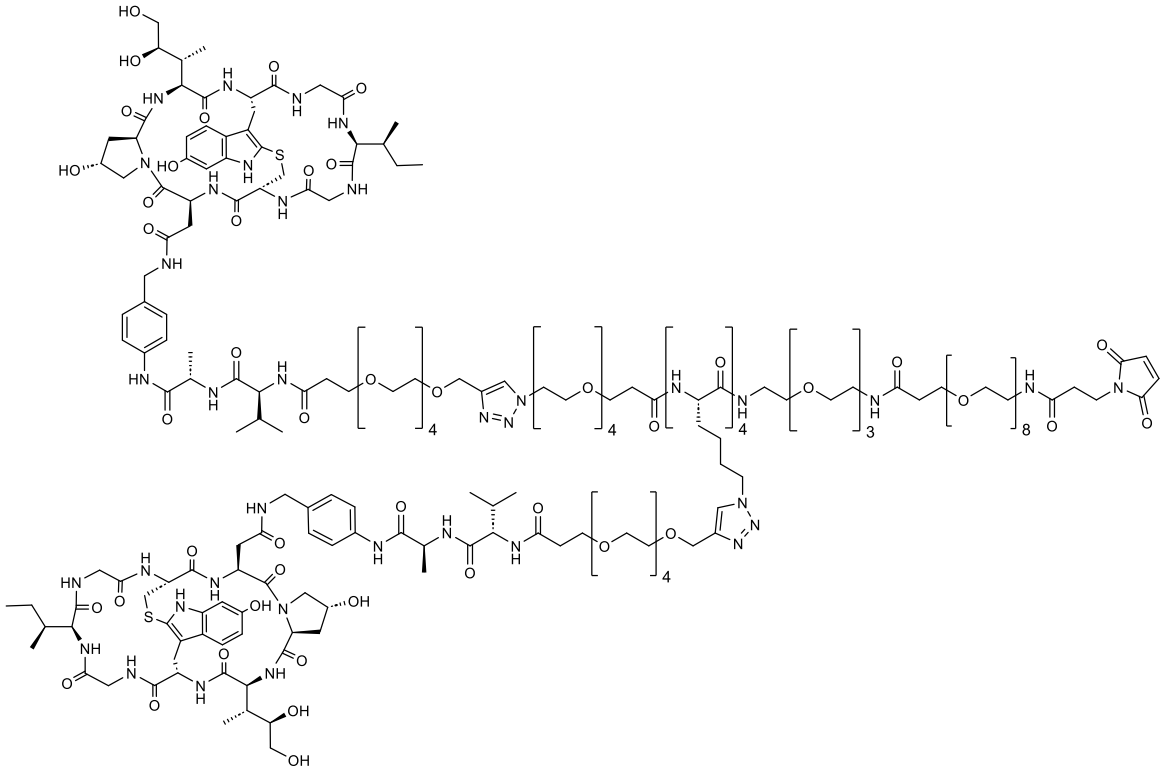
El compuesto IV.**45** se sintetizó según el GP4 utilizando la sal TFA del intermediario **III.45** (9,03 mg, 1,06 µmol, 1 equiv.), disuelto en 500 µl de DMF, BMPS (CAS: 55750-62-4, 1,13 mg, 4,24 µmol, 4 equiv.) disuelto en 100 µl y DIPEA (0,72 µl, 4,24 µmol, 4 equiv.). Una vez completada después de 5 h, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a 5 mL de MTBE enfriado con hielo y el precipitado se recogió por centrifugación (4000 × g, 4 min) y se lavó con 5 mL de MTBE enfriado con hielo. El producto crudo se secó al vacío, se disolvió en 400 µl de DMF/agua 1:1, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**45** (4,94 mg, 54 %) como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1712,7 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1712,0 $[C_{390}H_{574}N_{87}O_{120}S_5]^{5+}$.

Síntesis de IV.**46**



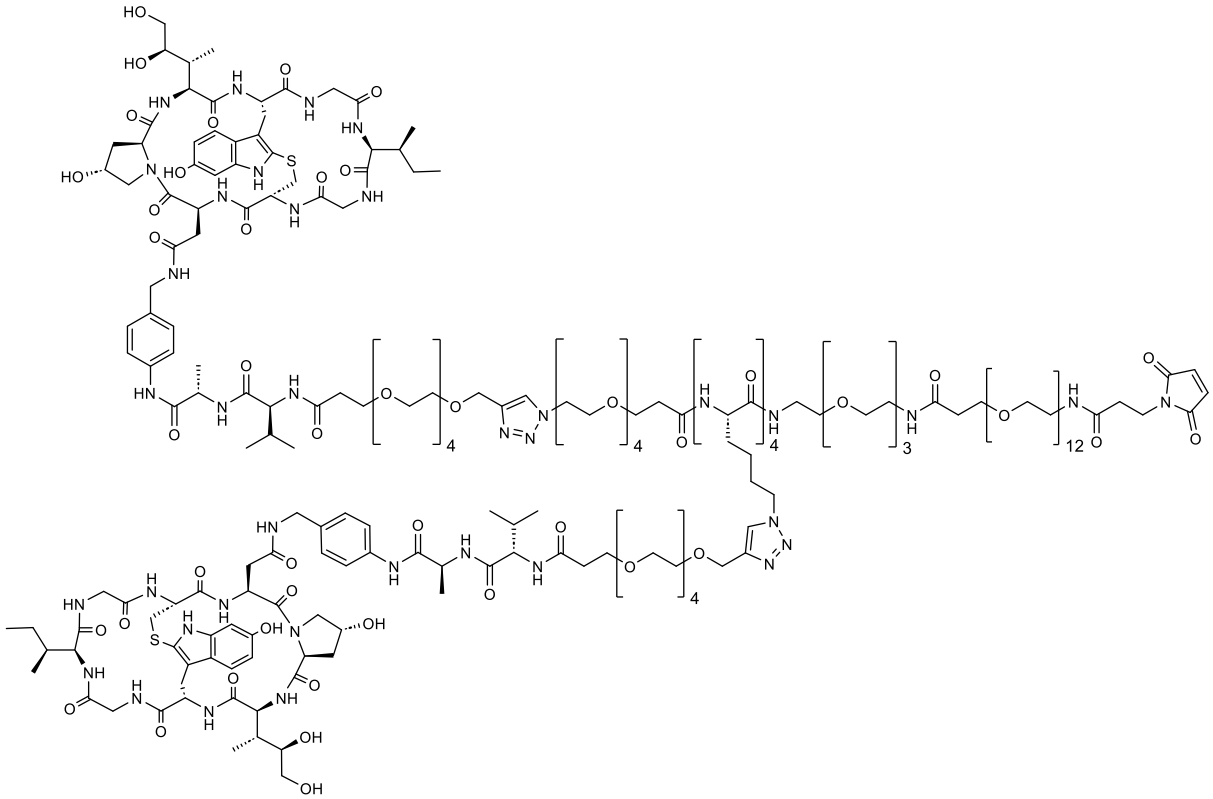
Repitiendo el procedimiento del intermediario IV.**45** pero con Mal-PEG$_4$-NHS-ester (CAS: 756525-99-2) en lugar de BMPS se obtuvo el compuesto IV.**46** en un 59 % de rendimiento como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1761,8 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1761,4 $[C_{401}H_{595}N_{88}O_{125}S_5]^{5+}$.

Síntesis de IV.**47**



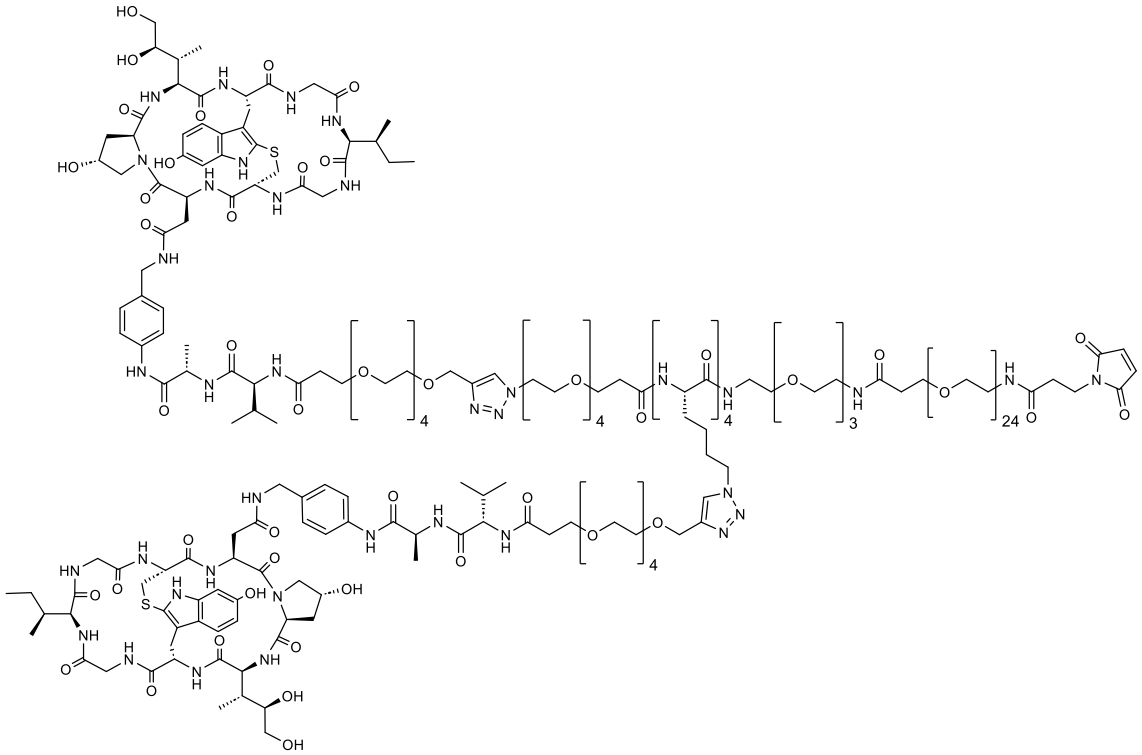
Repitiendo el procedimiento del compuesto IV.**45** pero con Mal-PEG$_8$-NHS-ester (CAS: 756525-93-6) en lugar de BMPS se obtuvo el compuesto IV.**47** en un 44 % de rendimiento como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1797,0 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1796,7 $[C_{409}H_{611}N_{88}O_{129}S_5]^{5+}$.

Síntesis de IV.**48**



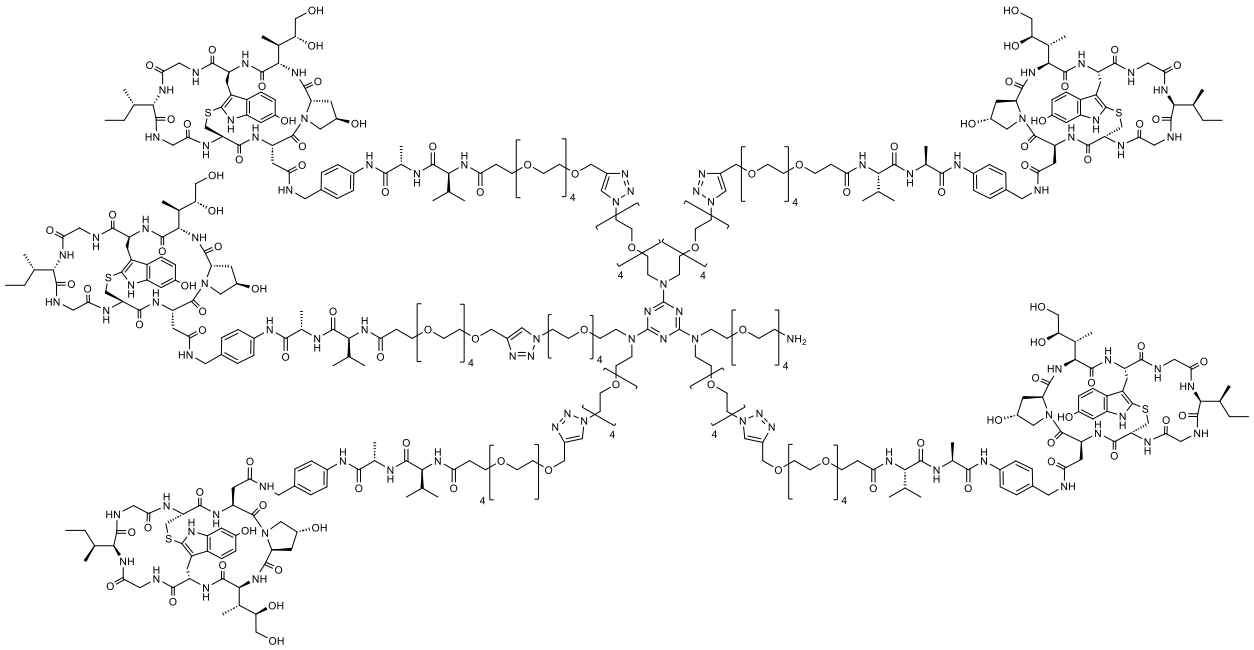
Repitiendo el procedimiento del compuesto IV.**45** pero con Mal-PEG_{12}-NHS-ester (CAS: 2101722-60-3) en lugar de BMPS se obtuvo el compuesto IV.**48** en un 64 % de rendimiento como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1832,0 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1831,9 $[C_{417}H_{627}N_{88}O_{133}S_5]^{5+}$.

Síntesis de IV.**49**



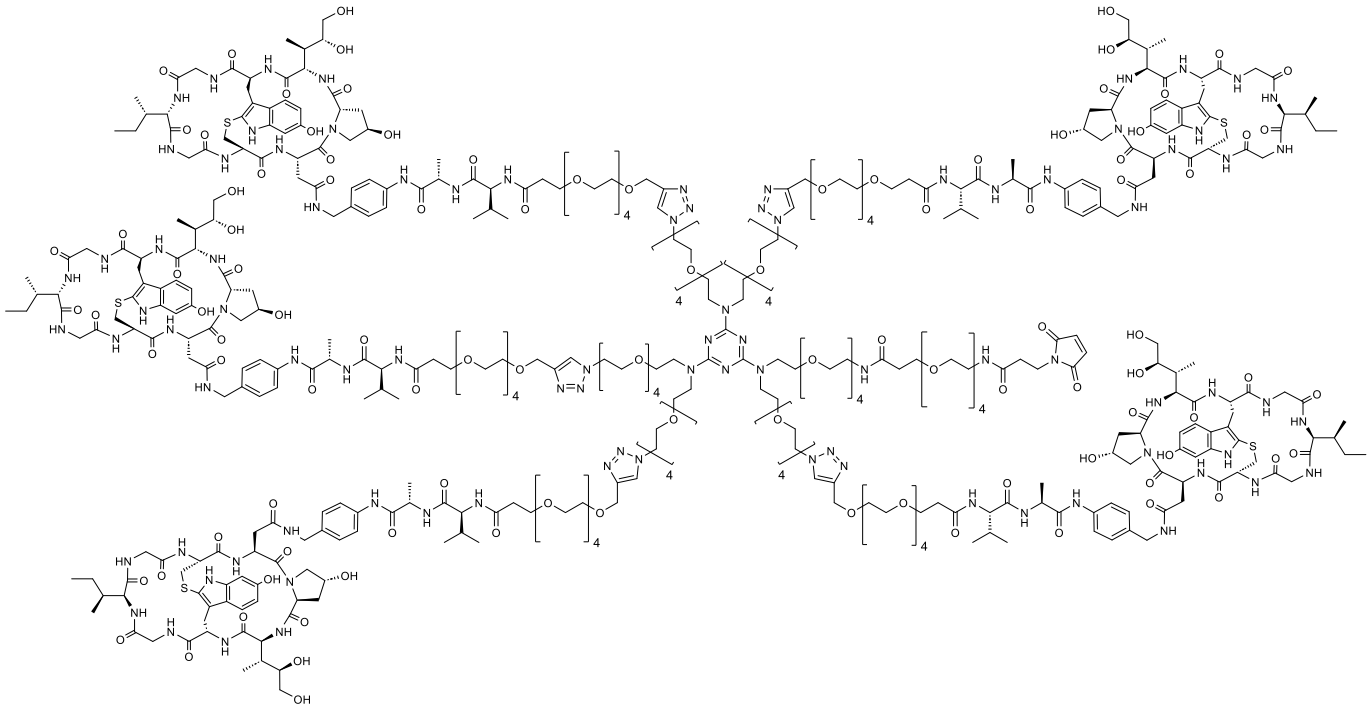
Repitiendo el procedimiento del compuesto IV.**45** pero con Mal-PEG_{24}-NHS-ester (CAS: 2226733-37-3) en lugar de BMPS se obtuvo el compuesto IV.**49** en un 64 % de rendimiento como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,5 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1937,8 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1937,7 $[C_{441}H_{675}N_{88}O_{145}S_5]^{5+}$.

Síntesis de **III.50**



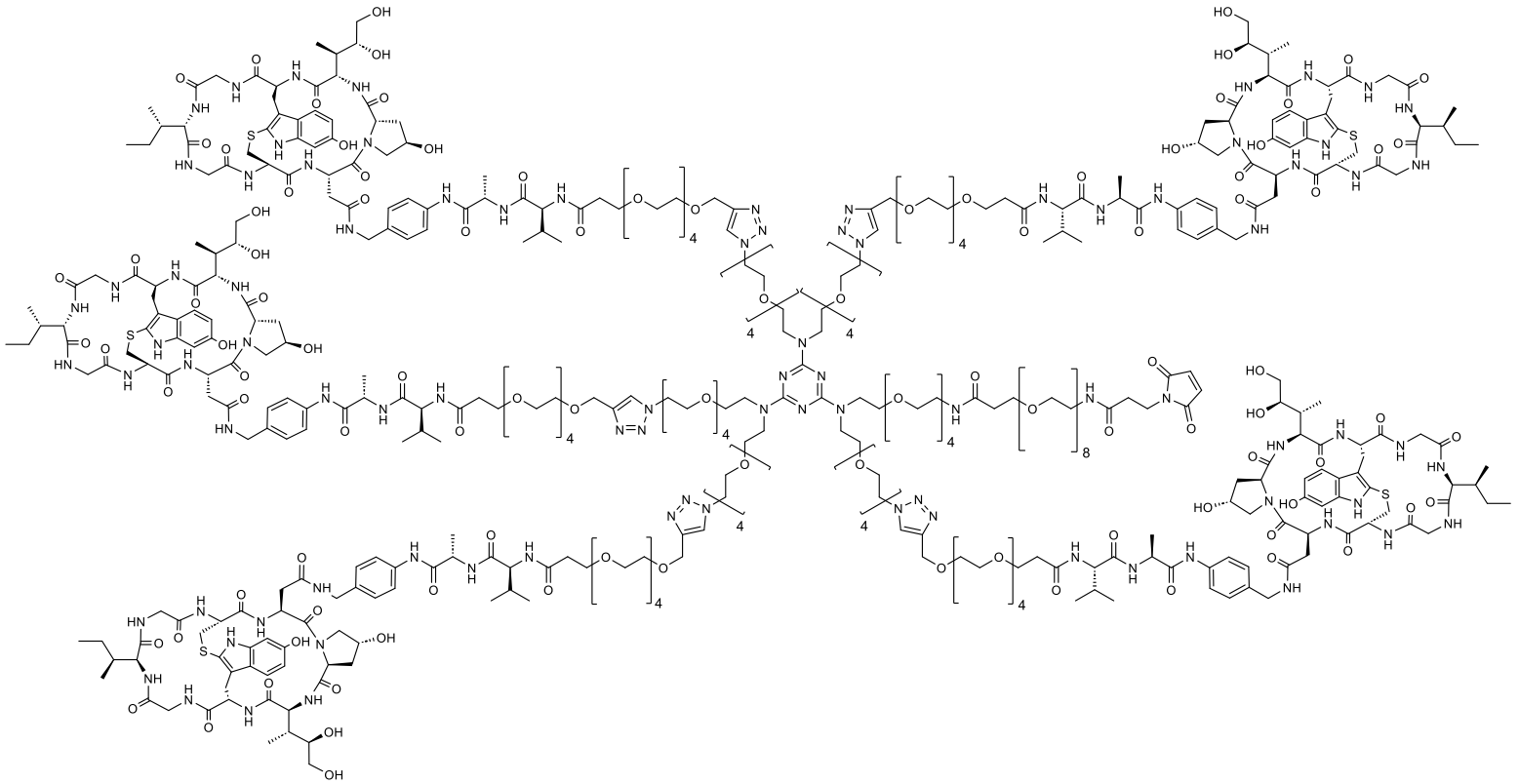
El intermediario **III.50** se sintetizó según el GP2 utilizando el intermediario **II.45** (26,0 mg, 17,8 µmol, 6,0 equiv.) y el intermediario 2.**7** (4,65 mg, 2,96 µmol, 1,0 equiv.) en DMF (444 µL) con 88,8 µL de solución catalizadora acuosa que contenía 100 mM de sulfato de cobre(II) pentahidratado, 120 mM de tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina y 300 mM de ascorbato sódico. Tras 2 h se completó la reacción, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se purificó por HPLC prep. para producir el intermediario **III.50** como un liofilizado incoloro (16,9 mg, 63 %). HPLC (método **J,** 305 nm): t_R= 12,7 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1780,2 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1779,7 $[C_{403}H_{612}N_{87}O_{129}S_5]^{5+}$.

Síntesis de IV.**50**



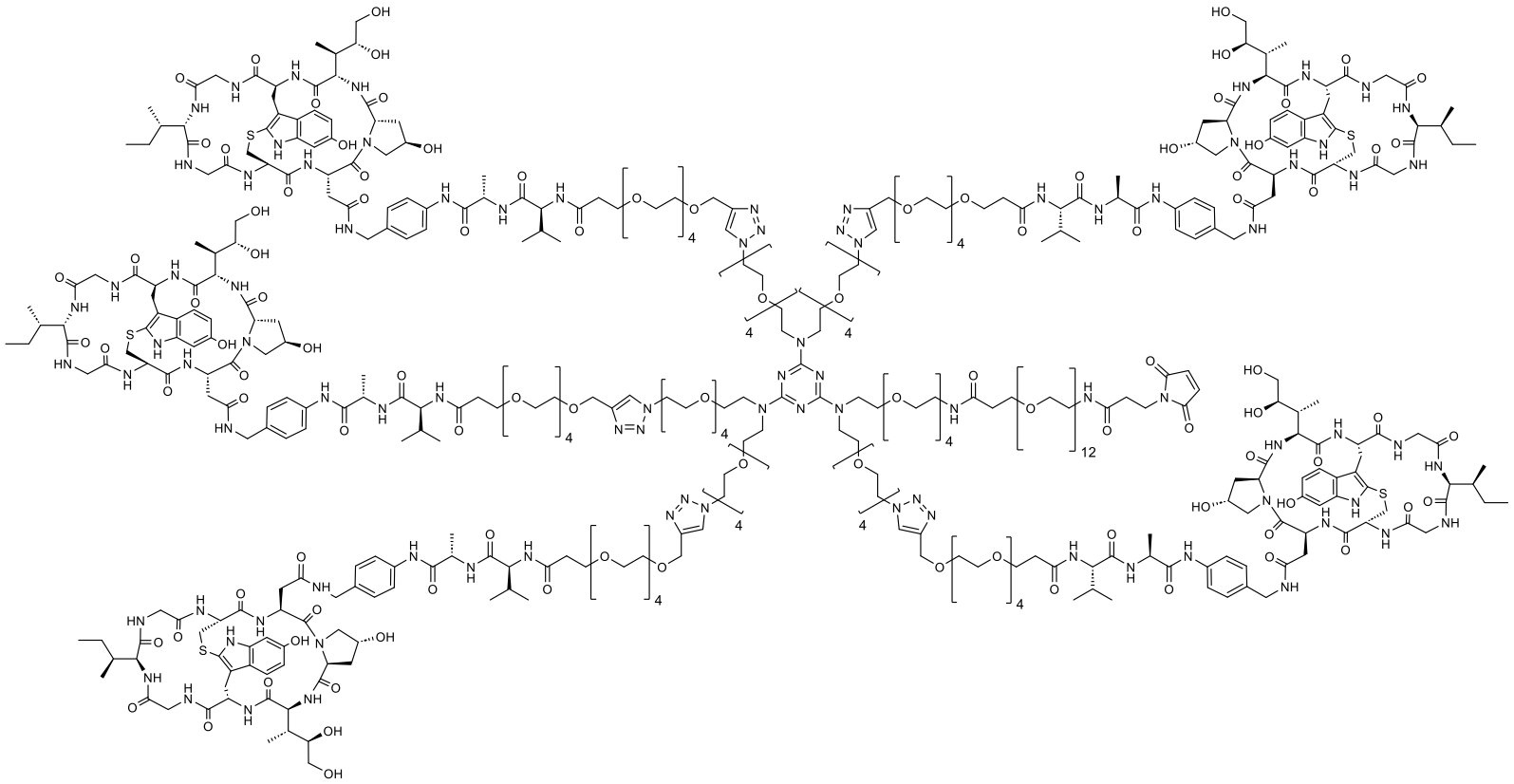
El compuesto IV.**50 se** sintetizó según el GP4 usando la sal TFA del intermediario **III.50** (4,22 mg, 0,47 µmol, 1 equiv.), disuelto en 500 µl de DMF, éster Mal-PEG$_4$-NHS (CAS: 756525-99-2), 0,96 mg, 1,87 µmol, 4 equiv.) disuelto en 100 µl y DIPEA (0,32 µl, 1,87 µmol, 4 equiv.). Una vez completada después de 4 h, la mezcla de reacción se diluyó con 100 µl de TFA al 0,05%, se acidificó con 5 µl de TFA al 5%, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm (Nylon) y se purificó por RP-HPLC para obtener el compuesto IV.**50** (3,50 mg, 80%) como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1863,1 $[M+4H+Na]^{5+}$, m/z calculado= 1863,7 $[C_{421}H_{637}N_{89}O_{137}S_5]^{5+}$.

Síntesis de IV.**51**



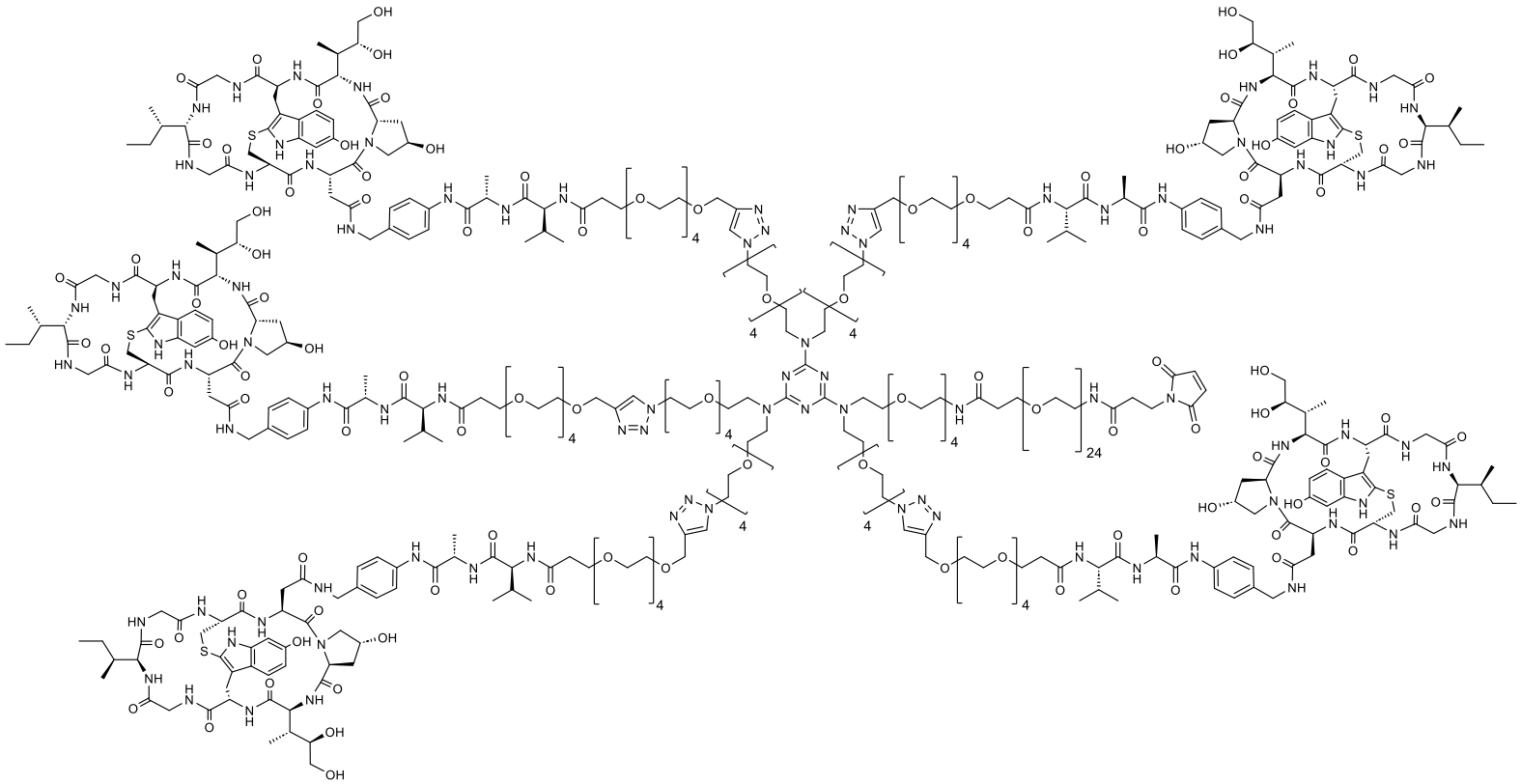
Repitiendo el procedimiento del intermediario IV.**50** pero con Mal-PEG$_8$-NHS-éster (CAS: 756525-93-6) en lugar de Mal-PEG$_4$-NHS-éster se obtuvo el intermediario **IV51** en un 72 % de rendimiento como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,2 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1894,8 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1894,7 $[C_{429}H_{654}N_{89}O_{141}S_5]^{5+}$.

Síntesis de IV.**52**



Repitiendo el procedimiento del intermediario IV.**50** pero con Mal-PEG$_{12}$-NHS-éster (CAS: 2101722-60-3) en lugar de Mal-PEG$_4$-NHS-éster se obtuvo el intermediario IV.**52** en un 76 % de rendimiento como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,3 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1930,3 $[M+5H]^{5+}$, m/z calculado= 1929,5 $[C_{437}H_{670}N_{89}O_{145}S_5]^{5+}$.

Síntesis de IV.**53**



Repitiendo el procedimiento del intermediario IV.**50** pero con Mal-PEG$_{24}$-NHS-éster (CAS: 2226733-37-3) en lugar de Mal-PEG$_4$-NHS-éster se obtuvo el intermediario **IV53** en un 82 % de rendimiento como un liofilizado incoloro. HPLC (método J): t_R= 13,4 min. MS (ESI): m/z encontrado= 1696,7 $[M+6H]^{6+}$, m/z calculado= 1696,5 $[C_{461}H_{719}N_{89}O_{157}S_5]^{6+}$.

Ejemplo 50 - Ensayos de citotoxicidad in vitro utilizando cultivos celulares 2D y 3D

La citotoxicidad de los ADCs anti-GUCY2C con compuestos enlazadores modulares de la invención se evaluó mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro* con células HEK293-GUCY2C diana-positivas y células HEKwt diana-negativas basado en cultivos celulares 2D y 3D.

Al inicio del ensayo de citotoxicidad 2D, se sembraron $2x10^3$ células diana-positivas o diana-negativas por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2. Los ADCs indicados se añadieron 24h más tarde a varias concentraciones que oscilaban entre $1x10^{-6}$ M y $1{,}28x10^{-12}$ M a las células adherentes antes de incubar las placas durante 4 días adicionales a 37°C y 5% de CO_2. La citotoxicidad se evaluó mediante el ELISA de proliferación celular, BrdU (colorimétrico) de Roche.

Al inicio del ensayo de citotoxicidad 3D, se sembraron $2x10^3$ células diana-positivas o diana-negativas por pozo en placas de 96 pozos de adhesión ultrabaja (ULA) y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2. Los esferoides se trataron después de 48 h con los ADC indicados a diversas concentraciones que oscilaban entre $1x10^{-6}$ M y $1{,}28x10^{-12}$ M antes de incubar las placas durante 5 días adicionales a 37 °C y 5% de CO_2. La citotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo® 2,0 de Promega.

Ejemplo 51 - Diseño de estudios en modelos animales in vivo

Se inocularon ratones NOD SCID hembra por vía subcutánea con 5×10^6 células HEK293-GUCY2C-(HDP)-2B3 de riñón embrionario humano con sobreexpresión de GCC en 200 µl de medio RPMI que contenía 50% de Matrigel sin rojo de fenol por animal en sus flancos derechos. Una vez alcanzado un volumen tumoral medio de aproximadamente 150 mm^3, los animales se asignaron a los grupos de control o de tratamiento según el tamaño del tumor. El mismo día (día 0) o al día siguiente (día 1), se trató a los animales con una dosis intravenosa única de vehículo control o de ADC anti-GCC conjugado con el respectivo compuesto enlazador modular de la invención, indicado como ("IV.x"), o una vez por semana durante tres semanas. El volumen tumoral se midió dos veces por semana mediante un calibrador y se determinó paralelamente el peso corporal. Se controlaron diariamente los signos clínicos y la supervivencia. Los animales fueron sacrificados y se les practicó la necropsia cuando surgieron uno o varios criterios de terminación o al finalizar el estudio. La dosificación indicada de los respectivos ADC corresponde a la dosis de ADC total en mg/kg indicada en

cada caso.

Muchas modificaciones y otras modalidades de la invención expuestas en el presente documento vendrán a la mente del experto en la materia a la que pertenece la invención teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en la descripción anterior y los dibujos asociados. Por lo tanto, debe entenderse que la invención no debe limitarse a las modalidades específicas divulgadas y que las modificaciones y otras modalidades deben incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, se utilizan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines limitativos.

Ejemplo 52 - Citotoxicidad contra diferentes líneas celulares

Citotoxicidad contra NCI-N87

T-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.35	$3{,}632 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.25	$3{,}279 \times 10^{-12}$
Compuesto IV.26	$4{,}626 \times 10^{-12}$
Compuesto IV.27	$1{,}749 \times 10^{-11}$
Compuesto IV.30	$5{,}202 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.23	$1{,}705 \times 10^{-9}$
Compuesto IV.43	$4{,}388 \times 10^{-11}$
Compuesto IV.44	$4{,}383 \times 10^{-11}$
Compuesto IV.39	$4{,}335 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.41	$4{,}273 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.40	$8{,}659 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.42	$1{,}056 \times 10^{-9}$
Compuesto IV.28	$7{,}702 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.29	$2{,}937 \times 10^{-10}$

hRS7-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.24	9.16×10^{-12}

Tabla 1: En 96h BrdU ELISA en células NCI-N87 que expresan Her2 y Trop2, los ADCs anti-Her2 y ADCs anti-Trop2 mostraron citotoxicidad con valores EC50 entre $1,705x10^{-9}$ M y $3,279x10^{-12}$ M.

Citotoxicidad contra BxPC-3

hRS7-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.25	$1,558 \times 10^{-12}$
Compuesto IV.26	$2,351 \times 10^{-17}$
Compuesto IV.27	$5,418 \times 10^{-12}$
Compuesto IV.30	$1,749 \times 10^{-9}$
Compuesto IV.31	$3,243 \times 10^{-9}$
Compuesto IV.23	$3,667 \times 10^{-9}$ (34% viabilidad en reposo)
Compuesto IV.24	$2,233x\ 10^{-11}$

Tabla 2: En 96h BrdU ELISA en células BxPC-3 que expresan Trop2, anti-Trop2 mostró citotoxicidad con valores EC50 entre $3,667x10^{-9}$ M y $1,558x10^{-12}$ M.

Citotoxicidad contra SKBR-3

T-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.25	$8,363 \times 10^{-12}$
Compuesto IV.26	$1,388 \times 10^{-11}$
Compuesto IV.27	$1,018 \times 10^{-11}$
Compuesto IV.43	$1,178 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.44	$4,154 \times 10^{-11}$

hRS7-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.25	1.148×10^{-11}
Compuesto IV.26	3.687×10^{-11}
Compuesto IV.27	9.177×10^{-11}
Compuesto IV.24	4.662×10^{-11}

Tabla 3: En 96h BrdU ELISA en células SKBR-3 que expresan Her2 y Trop2, los ADCs anti-Her2 y ADC anti-Trop2 mostraron citotoxicidad con valores EC50 entre $1{,}178 \times 10^{-10}$ M y $8{,}363 \times 10^{-12}$ M.

Citotoxicidad contra JIMT-1

T-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.25	$5{,}534 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.26	$8{,}002 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.27	$8{,}175 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.43	$5{,}944 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.44	$1{,}205 \times 10^{-9}$
hRS7-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.25	$1{,}498 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.26	$1{,}276 \times 10^{-10}$
Compuesto IV.27	$1{,}366 \times 10^{-10}$

Tabla 4: En 96h BrdU ELISA en células JIMT-1 que expresan Her2 y Trop2, los ADCs anti-Her2 y ADC anti-Trop2 mostraron citotoxicidad con valores EC50 entre $1{,}205 \times 10^{-9}$ M y $1{,}276 \times 10^{-12}$ M.

<u>Citotoxicidad contra</u> MDA-MB-231 (diana negativa)

T-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.35	---
Compuesto IV.25	---
Compuesto IV.26	---
Compuesto IV.27	---
Compuesto IV.30	---
Compuesto IV.39	---
Compuesto IV.41	---
Compuesto IV.40	---
Compuesto IV.42	---
Compuesto IV.28	---
Compuesto IV.29	---
hRS7-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.25	---
Compuesto IV.26	---
Compuesto IV.27	---

Tabla 5: En 96h BrdU ELISA en células diana MDA-MB-231 negativas, los ADCs anti-Her2 y ADC anti-Trop2 no mostraron citotoxicidad.

Citotoxicidad contra HEKwt (diana negativa)

hRS7-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.24	8,665 x 10^{-9}

Cuadro 6: En 96h BrdU ELISA en células diana HEKwt negativas, los ADCs anti-Her2 y ADC anti-Trop2 no mostraron citotoxicidad.

Citotoxicidad contra L540

Brentuximab-LALA-D265C	**EC50 [M]**
Compuesto IV.32	3,421 x 10^{-10} (viabilidad en reposo: 29%)

Tabla 7: En 96h CTG en células L540 que expresan CD30, el ADC anti-CD30 mostró citotoxicidad con valor EC50 3,421x10^{-10} M.

Valores de ClogP

La Tabla 8 muestra los valores ClogP de las cargas útiles (D), así como los valores ClogP de los compuestos según la invención con potenciadores de solubilidad (SE) o sin SE:

Potenciador de la solubilidad	Carga útil	IV Número	Clog P
	Exatecan		1,54
	SN-38		1,87
	E104 (agonista TLR7 1)		4,01
	MMAE		3,51
	Triptolide		1,32
	Doxorrubicina		0,53
	PNU-159682		3,17
	NAMPTi		2,21
	Deacetilcolchicina		1,64

	alfa-amantina		-7,66
ninguno	Exatecan		0,28
PEG4	Exatecan	IV.1	0,51
PEG4	Exatecan	IV.2	-0,65
PEG12	Exatecan	IV.3	-1,4
PEG2 - β-ciclodextrina	Exatecan	IV.4	-24,79
PEG4 - β-ciclodextrina	Exatecan	IV.5	-24,97
PEG8 - β-ciclodextrina	Exatecan	IV.6	-25,35
PEG24 - β-ciclodextrina	Exatecan	IV.7	-26,85
PEG4 - β-CD	Exatecan	IV.8	-26,14
PEG8 - β-CD	Exatecan	IV.9	-26,52
PEG24 - β-ciclodextrina	Exatecan	IV.10	-28,02
PEG2 - γ-ciclodextrina	Exatecan	IV.11	-29,5
PEG4 - γ-ciclodextrina	Exatecan	IV.12	-29,68
PEG8 - γ-ciclodextrina	Exatecan	IV.13	-30,06
PEG3 - beta-CD-2-O-verknüpft	Exatecan	IV.14	-24,41
PEG3 - gamma-CD-2-O-verknüpft	Exatecan	IV.15	-27,95
Polisarcosina -ácido	Exatecan	IV.16	-18,1

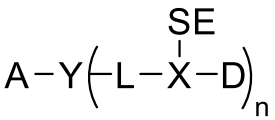
Polisarcosina -amida	Exatecan	IV.17	-19,4
Polisarcosina -amida	Exatecan	IV.18	-20,56
PEG4-Diglucamida (Gluconolacton)	Exatecan	IV.19	-8,98
PEG4-Monoglucamida (Gluconolacton)	Exatecan	IV.20	-17,05
PEG4-Diglucamida (Glucamina)	Exatecan	IV.21	-18,18
PEG8-Diglucamida (Glucamina)	Exatecan	IV.22	-18,55
PEG4 - γ-ciclodextrina	SN-38	IV.23	-29,61
PEG4 - γ-ciclodextrina	PNU-159682	IV.24	-26,46
PEG8 - β-ciclodextrina	MMAE	IV.25	-23,00
Polisarcosina -amida	MMAE	IV.26	-17,05
PEG8-Diglucamida (Glucamina)	MMAE	IV.27	-15,04
PEG4 - γ-ciclodextrina	Deacetilcolchicina	IV.28	-29,49
PEG4 - γ-ciclodextrina	Deacetilcolchicina	IV.29	-55,52
PEG8 - β-ciclodextrina	SN-38	IV.30	-26,96
PEG8-Diglucamida (Glucamina)	SN-38	IV.31	-18,99

PEG8 - β-ciclodextrina	NAMPTi 1	IV.32	-24,70
PEG8 - β-ciclodextrina	E104 (agonista TLR7 1)	IV.33	-21,08
Polisarcosina -amida	E104 (agonista TLR7 1)	IV.34	-15,13
PEG8 - β-ciclodextrina 2 Toxina	Doxorrubicina	IV.35	-26,60
PEG8 - β-ciclodextrina 4Toxina_Mal-PEG4	Doxorrubicina	IV.36	-49,75
PEG8 - β-ciclodextrina 4Toxina_Mal-PEG8	Doxorrubicina	IV.37	-49,94
2-Alquil_PEG4 - γ-ciclodextrina	Doxorrubicina	IV.38	-28,03
PEG8 - γ-ciclodextrina_2_Alquil-PEG4_2 Toxina	Triptolide	IV.39	-28,42
PEG8 - PEG8-Diglucamida_2 Toxina	Triptolide	IV.41	-19,03
PEG8 - PEG8-Diglucamida_5 Toxina	Triptolide	IV.42	-42,97
PEG8 - β-ciclodextrina	1x Amanitina, 2x Exatecan	IV.43	-31,88
PEG8 - β-ciclodextrina	1x Amanitina, 4x Exatecan	IV.44	-55,13
ninguno	5xAmanitina, núcleo de azidolisina; BMPS	IV.45	-

			30,23
ninguno	5xAmanitina, núcleo de azidolisina; Mal-dPEG4	IV.46	-31,29
ninguno	5xAmanitina, núcleo de azidolisina; Mal-dPEG8	IV.47	-31,48
ninguno	5xAmanitina, núcleo de azidolisina; Mal-dPEG12	IV.48	-31,66
ninguno	5xAmanitina, núcleo de azidolisina; Mal-dPEG24	IV.49	-32,23
ninguno	5xAmanitina, núcleo de triazol; Mal-dPEG4	IV.50	-30,14
ninguno	5xAmanitina, núcleo de triazol Mal-dPEG8	IV.51	-30,33
ninguno	5xAmanitina, núcleo de triazol; Mal-dPEG12	IV.52	-30,51
ninguno	5xAmanitina, núcleo de triazol; Mal-dPEG24	IV.53	-31,08
Glucurónido	Exatecan	IV.54	-2,92

Reivindicaciones

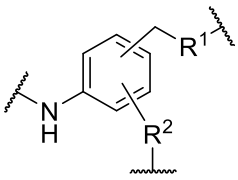
1. Un compuesto enlazador modular de Fórmula (I)



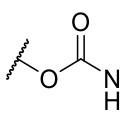
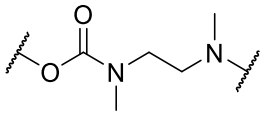
Fórmula (I)

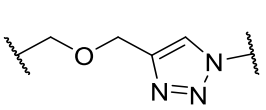
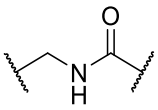
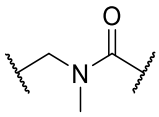
o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

en donde:

X es espaciador autoinmolante, 

donde:

R^1 une covalentemente X a D en para, meta u orto al grupo amino de X y es un enlace,  ,  o  ; y

R^2 conecta X a SE y es,  ,  o  o -O- ;

D es una sustancia farmacéuticamente activa;

SE es un grupo potenciador de la solubilidad;

L es un espaciador que comprende un péptido unido covalentemente a X;

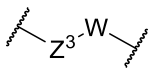
n es un número entero de al menos 2, preferiblemente n es un número entero entre 2 y 5;

Y es una unidad de ramificación,

A es una fracción reactiva para conjugación con una fracción de unión a diana.

2. El compuesto enlazador modular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

L es

 ,

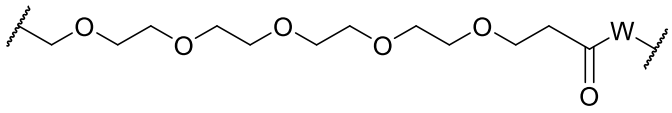
donde:

W es una secuencia peptídica escindible o no escindible que conecta Z^3 y X y se selecciona del grupo formado por:

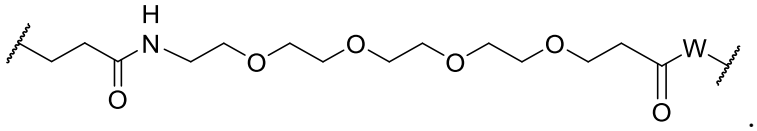
Val-Ala, Val-Cit, Met-Thr, Thr-Thr, Phe-Lys, Glu-Val-Ala, Glu-Val-Cit, Gly-Gly-Phe-Gly, Gly-Gly-Tyr-Gly, cBu-Ala, cBu-Cit, Glu-cBu-Ala, Glu-cBu-Cit, Asp-cBu-Ala, Asp-cBu-Cit, Asp-Pro-Val, Asn-Pro-Val, iGlu-cBu-Ala, iGlu-cBu-Cit, Val-Lys, Val-Arg, Val-Gln, Val-Met, Val-Thr, AcLys-Val-Cit, AcLys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, iGlu-Val-Ala, Asp-Val-Cit, iGlu-Val-Cit, Tyr-Arg, Tyr-Met, Phe-Cit, Phe-Ala, Phe-Arg, Phe-Met, Phe-Gln, Phe-Arg-Arg-Gly, Phe-Arg-Arg-Leu, Phe-Arg-Arg-Leu-Gly, Phe-Leu-Arg-Arg-Gly, Ala-Lys, Leu-Cit, Leu-Gln, Ile-Cit, Ala-Ala-Asn, Ala-Asn, Ala-Ala, Asn-Asn, Asn, beta-Ala, y Lys o sus combinaciones; y

en donde Z^3 es un enlace o un espaciador que comprende una cadena de alquilo C_{1-20} o un polietilenglicol de 1 a 10 $(PEG)_{1-10}$ o un C_2-amida-PEG_{1-10};

preferiblemente L es



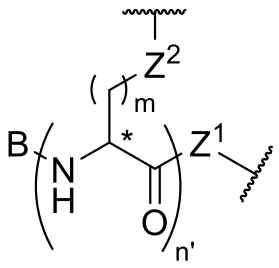
o

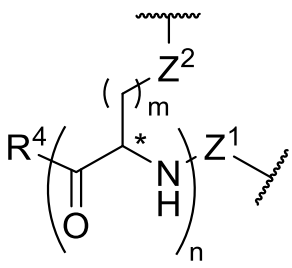


.

3. El compuesto enlazador modular de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde

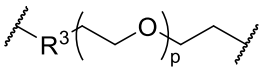
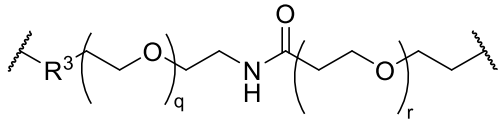
Y es:





o ;

m es un número entero entre 1 y 6;

Z^1 conecta Y a A y es  o  , donde

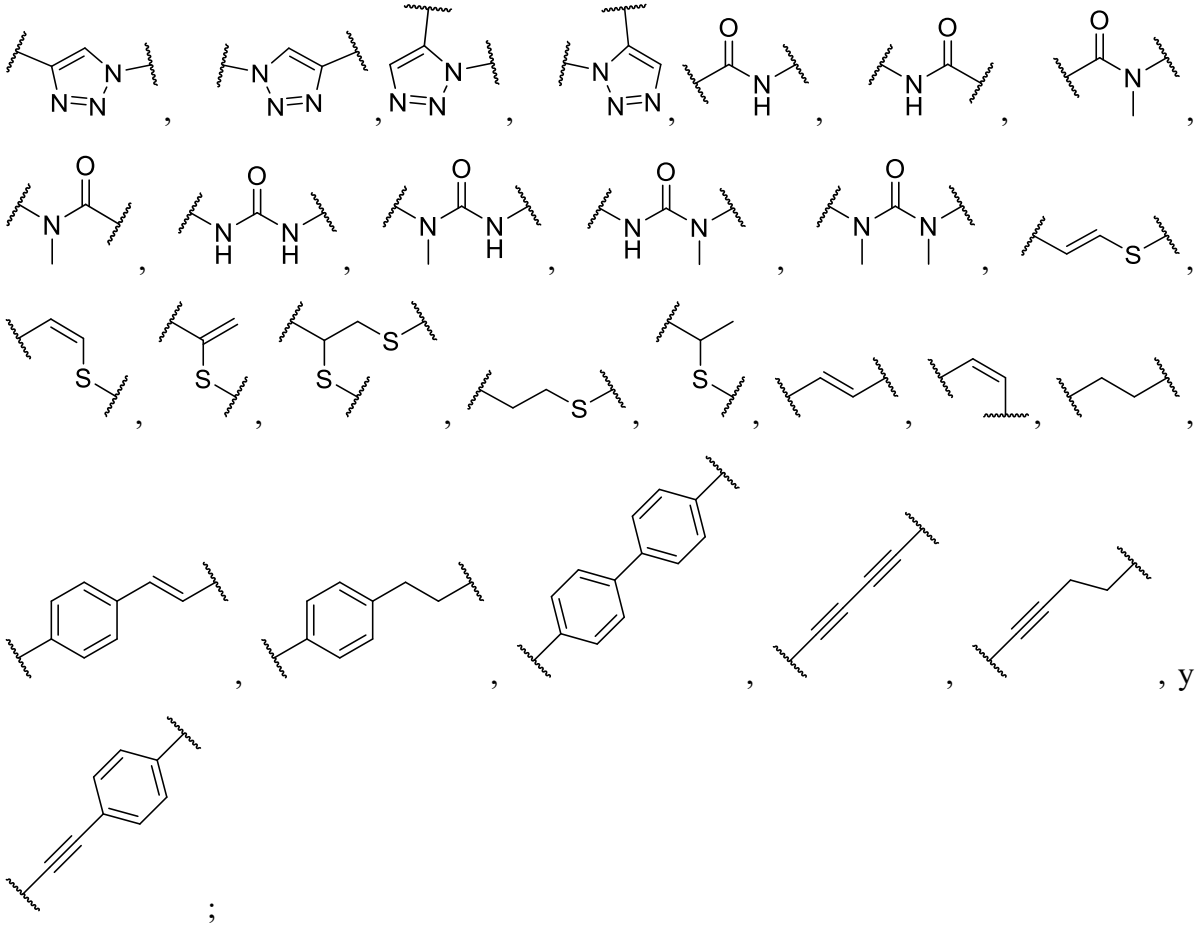
R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH_3)C(=O)-, y

p es un número entero entre 1 y 24, preferiblemente de 4 a 24, más preferiblemente de 8 a 24,

q es un número entero entre 1 y 8,

r es un número entero entre 1 y 24

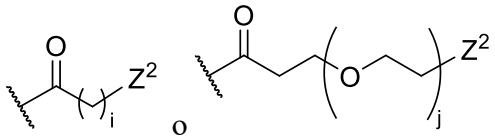
Z^2 conecta Y a L y se selecciona del grupo formado por:



;

B es:

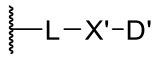
una caperuza, preferiblemente un grupo acilo, y n' es n; o

 o , donde

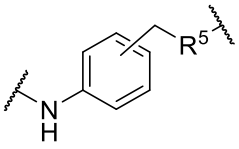
i es un número entero entre 1 y 20,

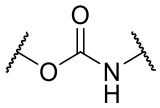
j es un número entero entre 1 y 10, y

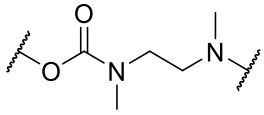
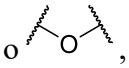
n' es n menos 1; o


donde

D' es una sustancia farmacéuticamente activa diferente de D; y

X' es espaciador autoinmolante  , donde:

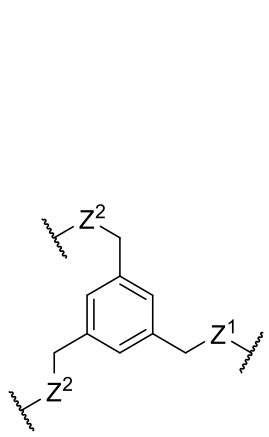
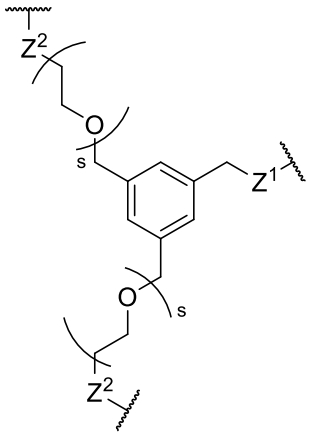
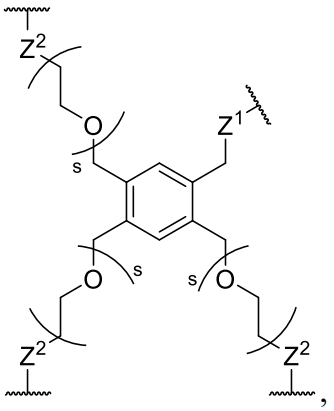
R^5 une covalentemente X' a D' en para u orto al grupo amino de X' y es un enlace, 

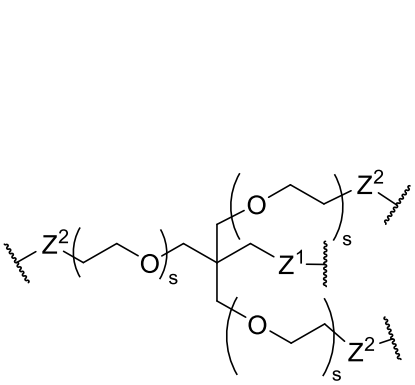
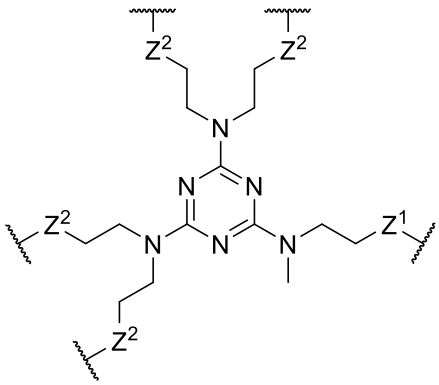
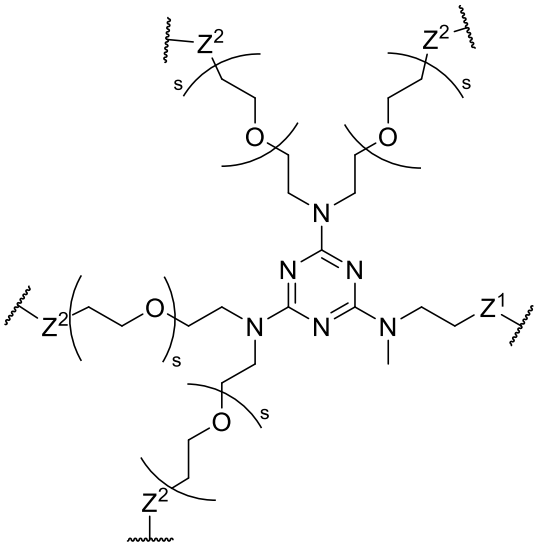
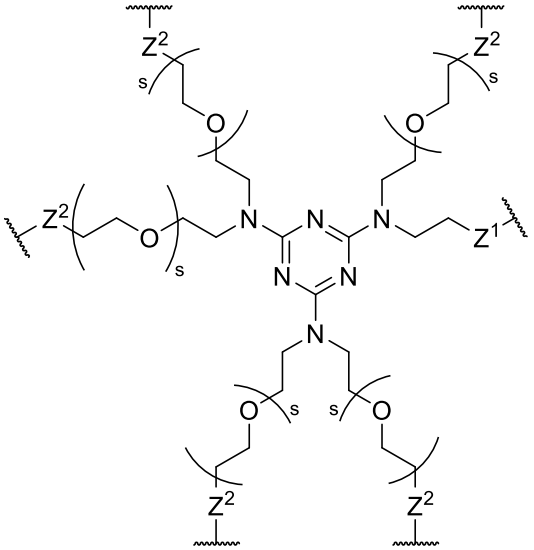
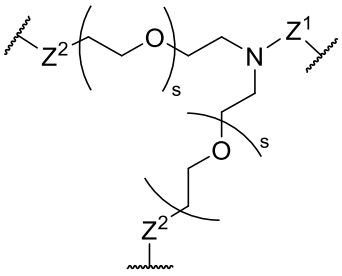
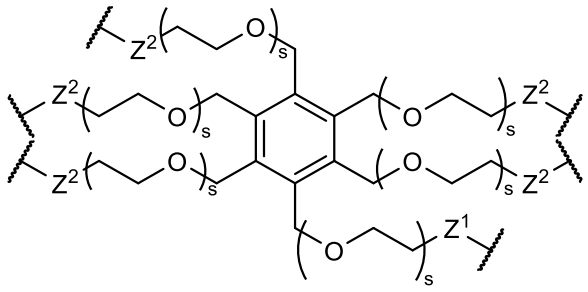
,  o  ,

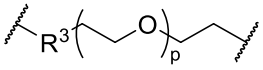
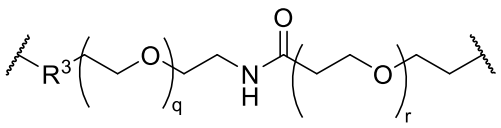
y n' es n;

R^4 es OH o NH2.

4. El compuesto enlazador modular de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde Y es:

 ,   ,


,

,

o

,

o

;

Z^1 conecta Y a A y es  o  , donde

R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH3)C(=O)-,

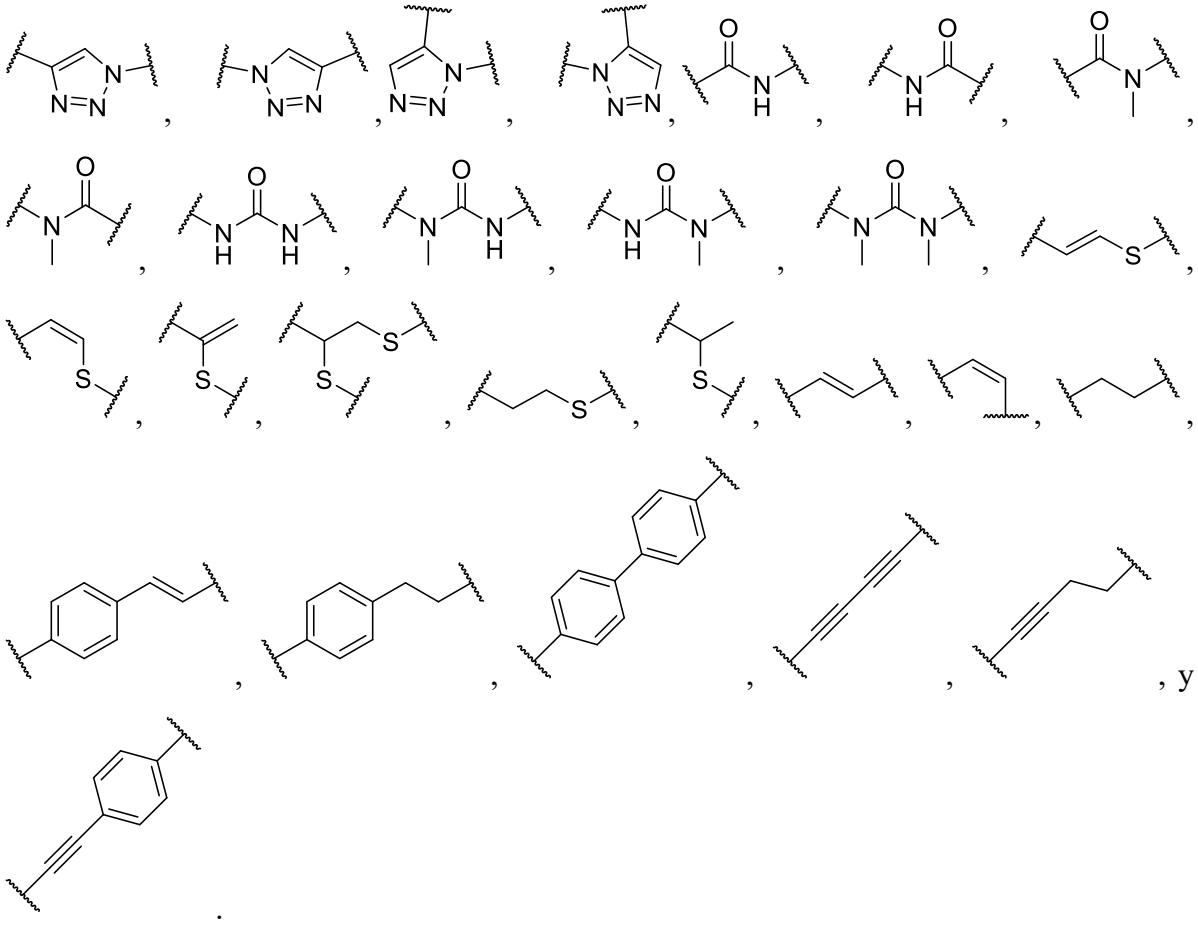
p es un número entero entre 1 y 24,

q es un número entero entre 1 y 8,

r es un número entero entre 1 y 24,

s es un número entero entre 0 y 4,

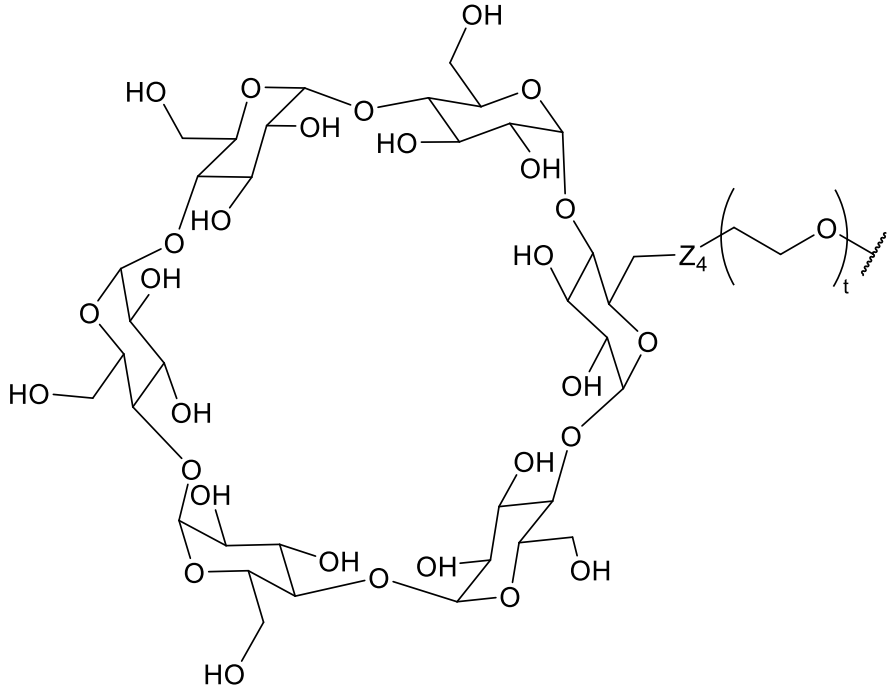
Z^2 conecta Y a L y se selecciona del grupo formado por:



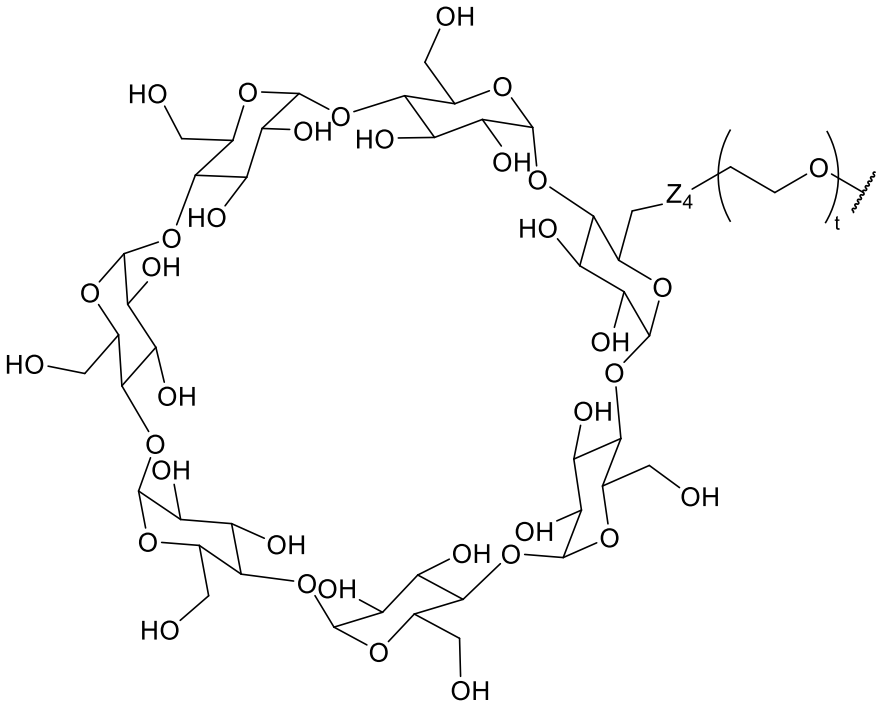
5. El compuesto enlazador modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde D y D' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: camptotecinas, preferiblemente exatecan, SN38 y topotecan; auristatinas, preferiblemente seleccionadas de monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF); maitansinoides, preferiblemente seleccionados de mertansina (DM1) y ravtansina (DM4); calicheamicinas; agonistas del receptor tipo Toll 7 (TLR7); inhibidor de nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT) ($NAMPT_i$): pirrolobenzodiazepinas (PBD); duocarmicinas; antraciclinas, preferiblemente doxorrubicina; amatoxinas, preferiblemente alfa-amanitina, beta amanitina, amanina y amaninamida; criptoficinas; faloidinas; seco-

ciclopropilpirroloindolina (seco-CPI); seco-ciclopropilbenzoindolina (seco-CBI); taxoles; vinblastinas; colchicinas; eribulinas; metotrexato (MTX); triptolida; y sus derivados.

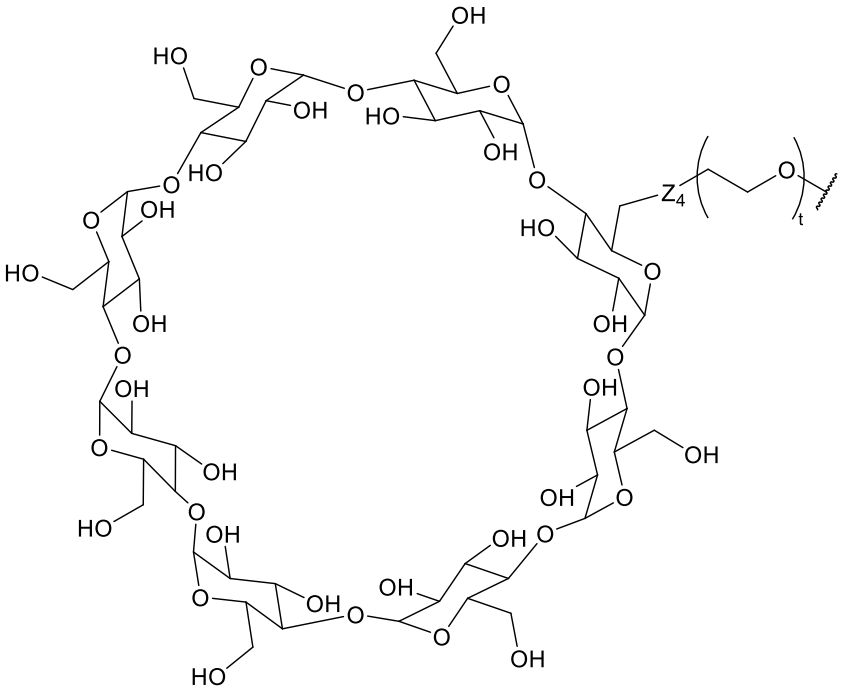
6. El compuesto enlazador modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde SE comprende una alfa-ciclodextrina, una beta-ciclodextrina, una gamma-ciclodextrina, una polisarcosina, un PEG, un galactósido, un glucurónido o un polialcohol hecho de carbohidratos, preferiblemente SE comprende:



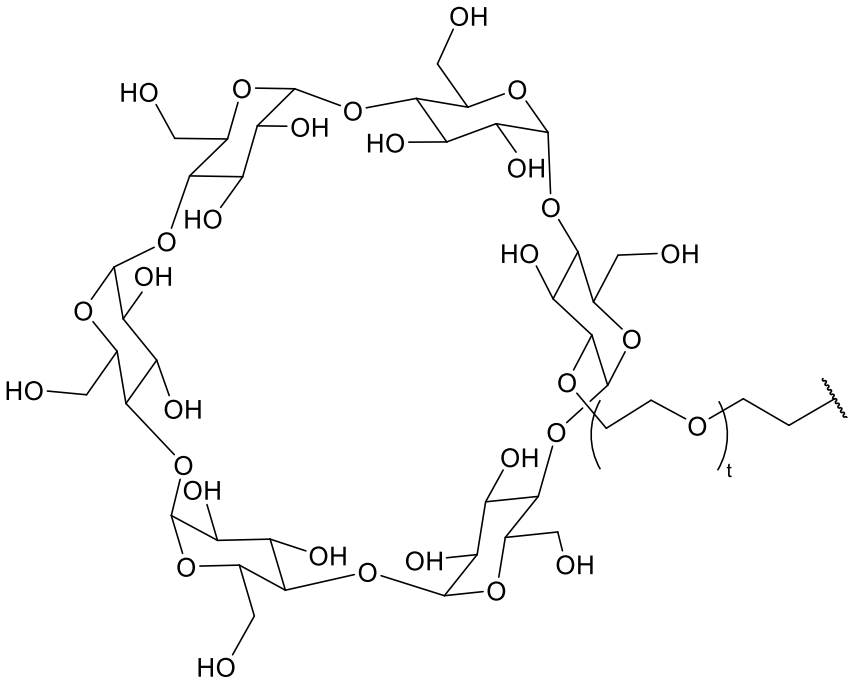
,


OH
HO
O
OH
HO
OH
O
Z4
O
t
HO
O
OH
O
HO
OH
O
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
O
OH
O
OH
OH
O
HO
O
OH

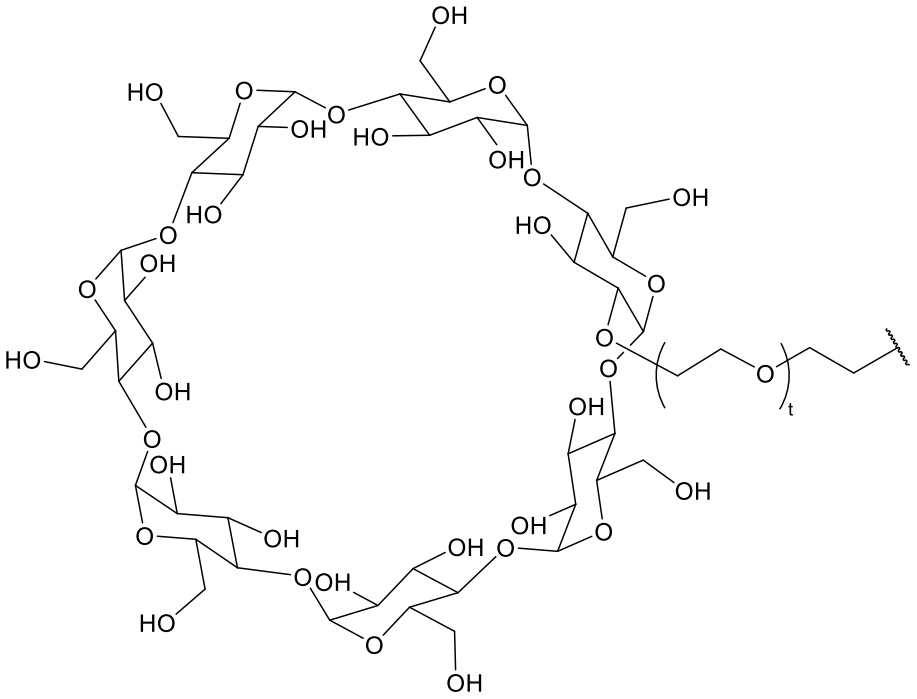
,


OH
HO
O
OH
HO
OH
O
Z4
O
t
HO
O
OH
O
HO
OH
O
OH
O
OH
OH
O
OH
OH
O
OH
O
OH
OH
O
HO
O
OH

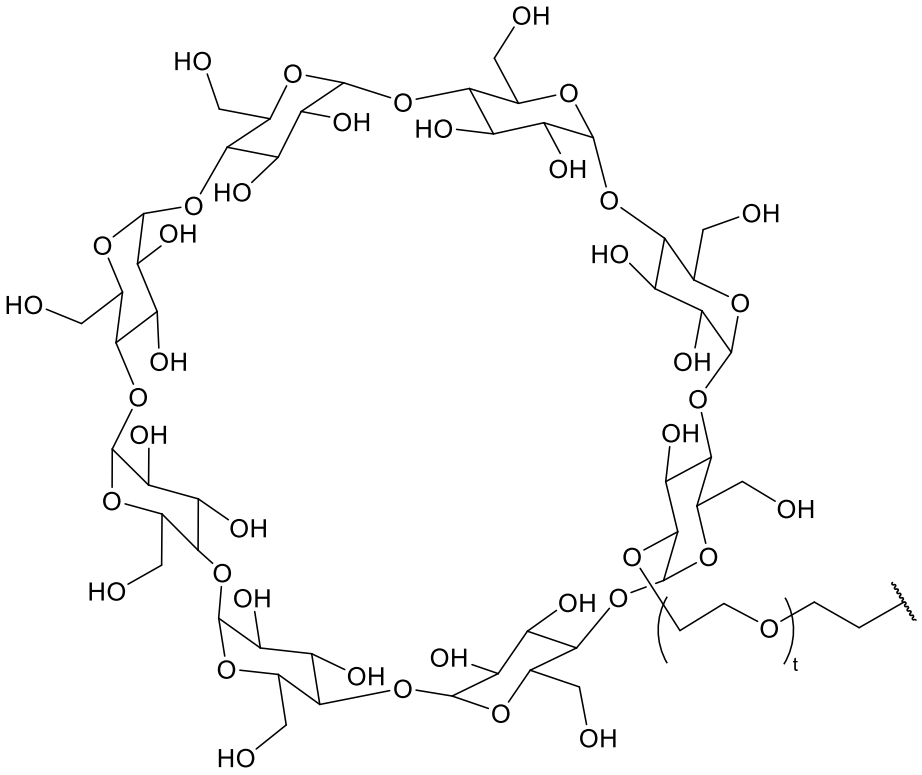
,


OH
HO
O
OH
HO
OH
HO
O
HO
OH
O
OH
O
HO
OH
O
O
O
t
OH
OH
OH
OH
O
O
O
HO

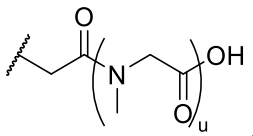
,


OH
HO
O
OH
HO
OH
HO
O
OH
O
HO
OH
O
O
O
t
OH
OH
OH
OH
O
O
O
HO

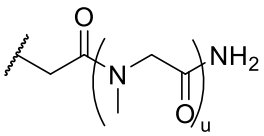
,



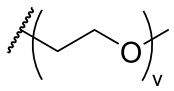
,



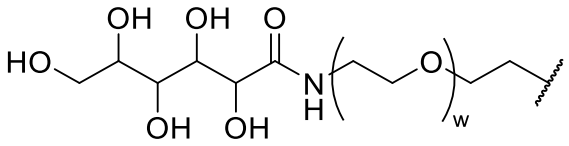
,



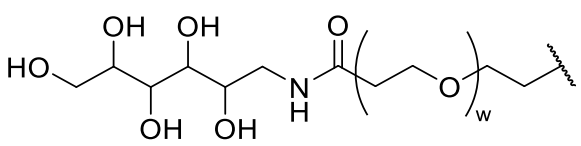
,



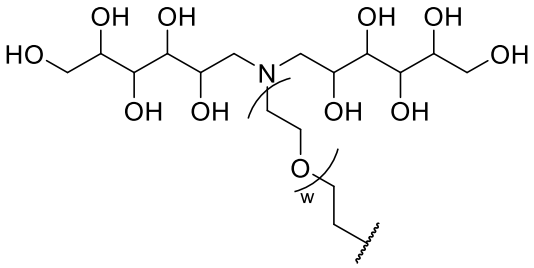
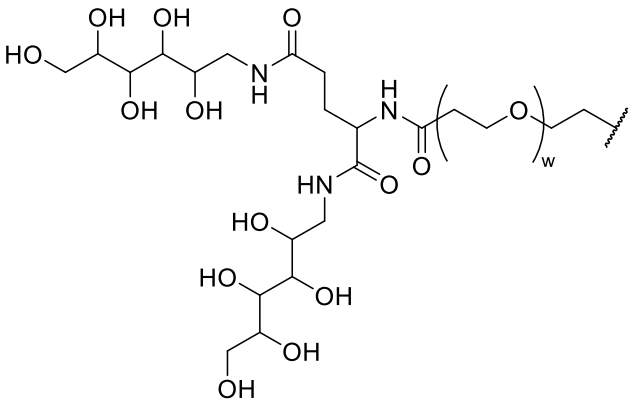
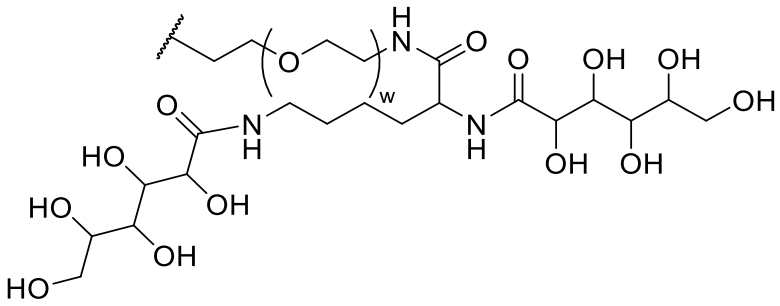
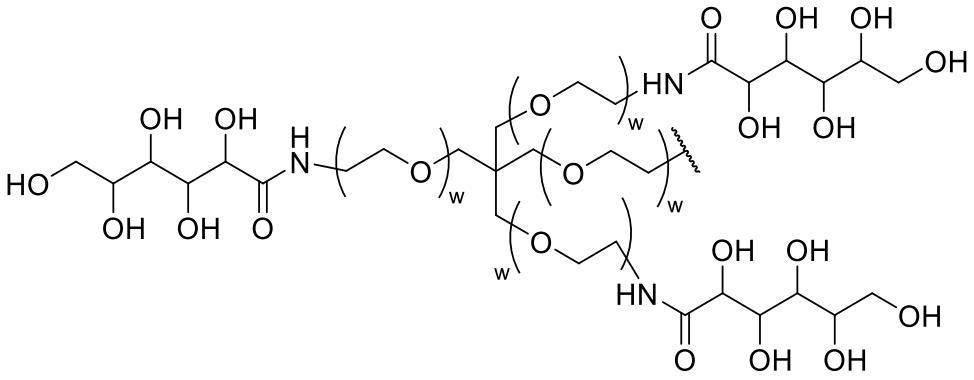
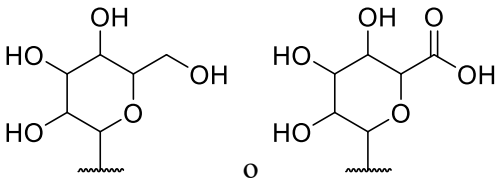
,



,

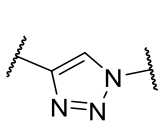
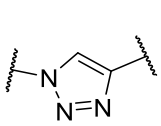
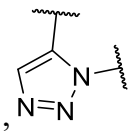
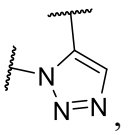
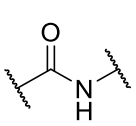
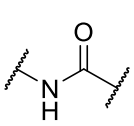
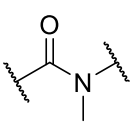


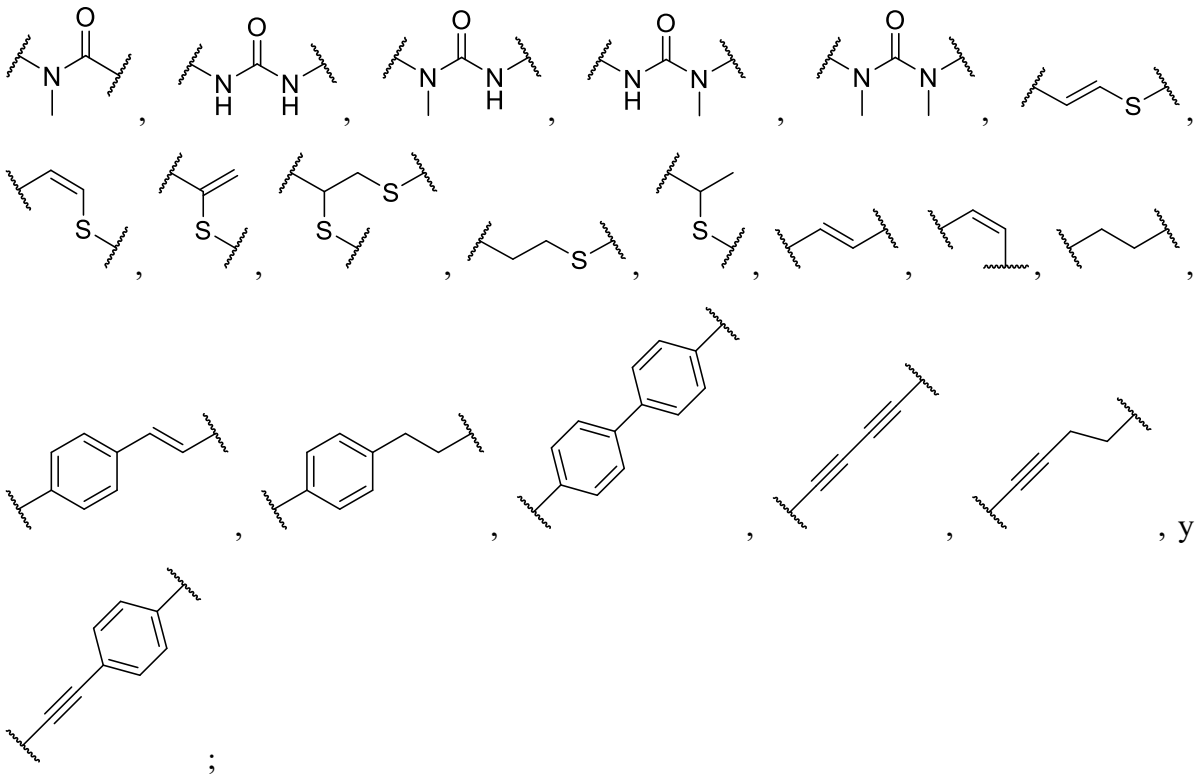
,


,

,

,

,

o

;

donde Z^4 se selecciona del grupo formado por:


,

,

,

,

,

,

,



;

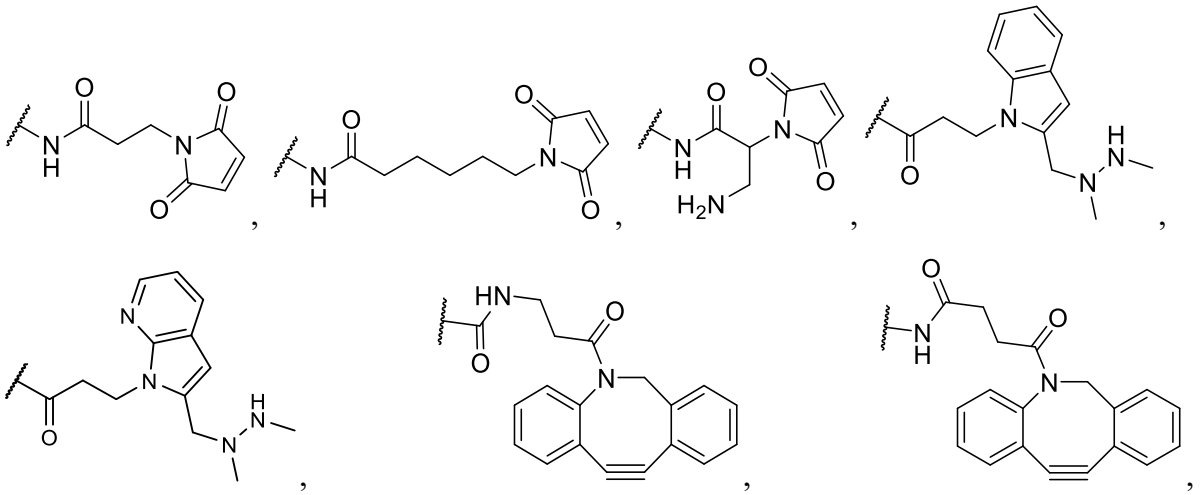
t es de 2 a 18, preferiblemente de 8 a 12,

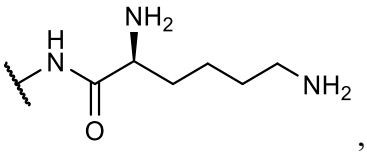
u es al menos 1, preferiblemente 10;

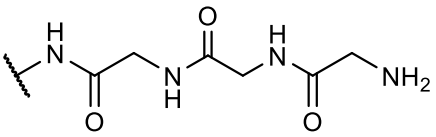
v es de 4 a 24;

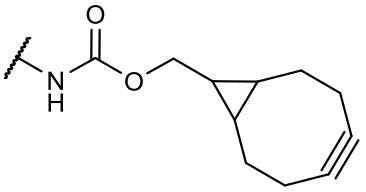
w es de 2 a 24.

7. El compuesto enlazador modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde A es



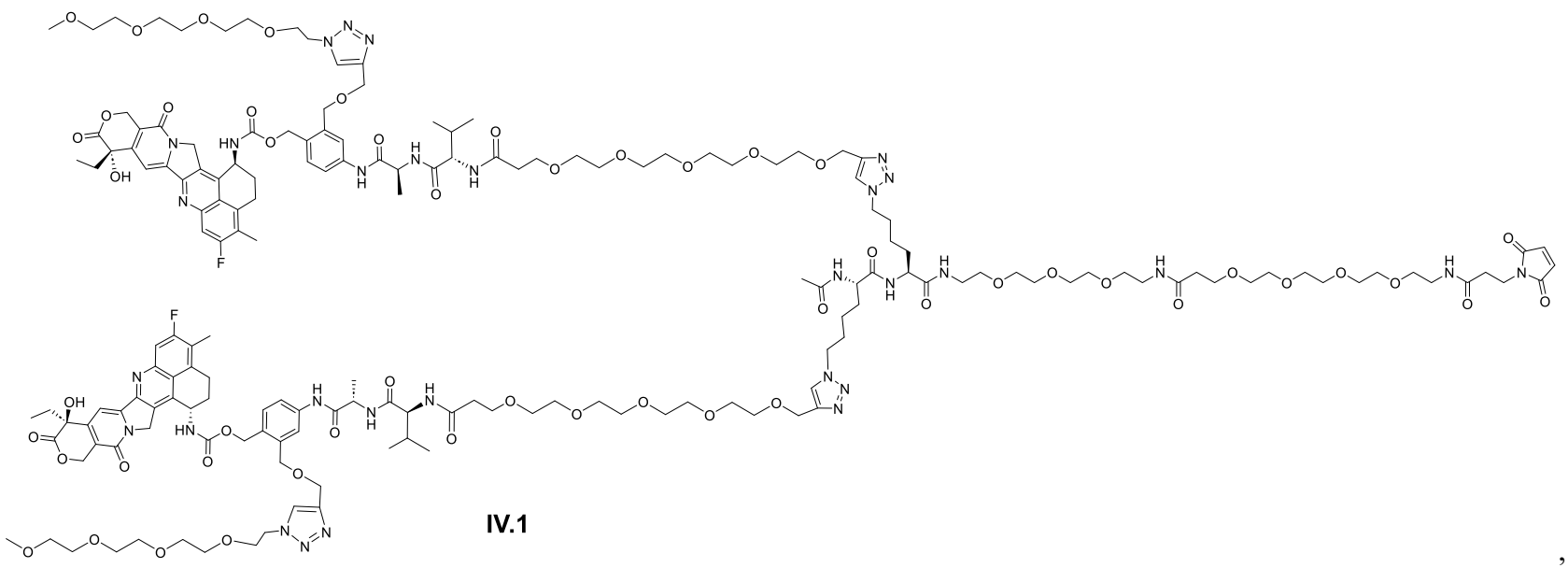


,


o


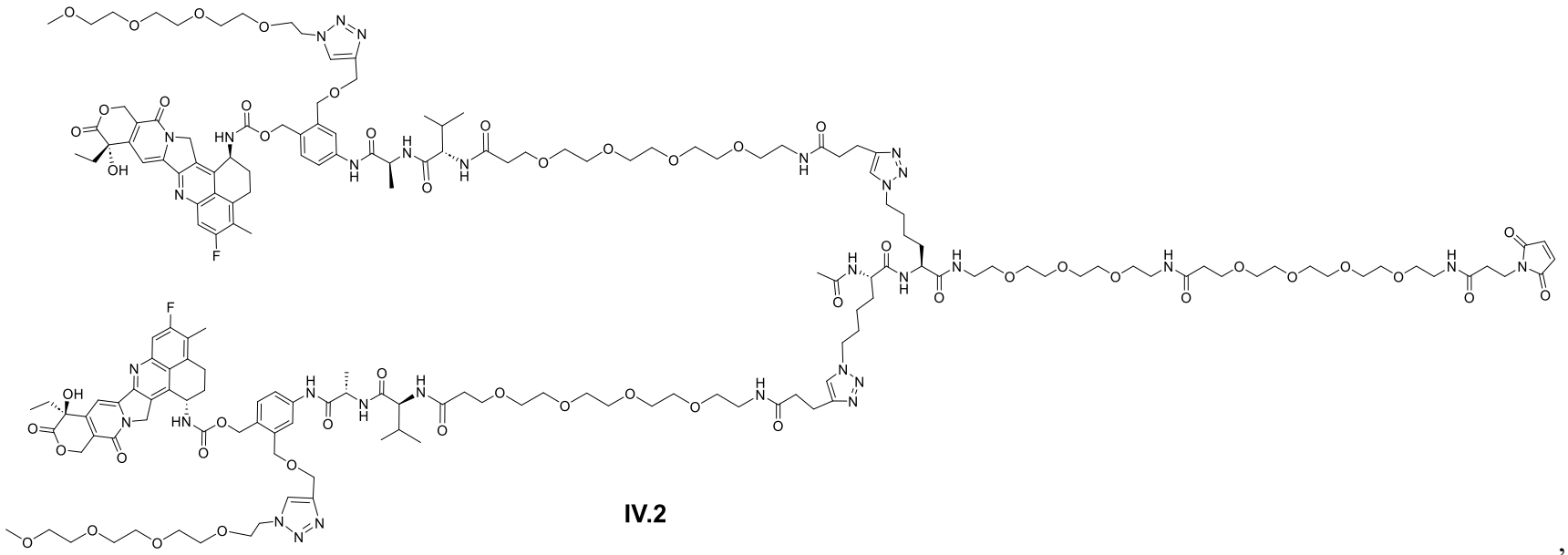
.

8. El compuesto enlazador modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto enlazador modular es:



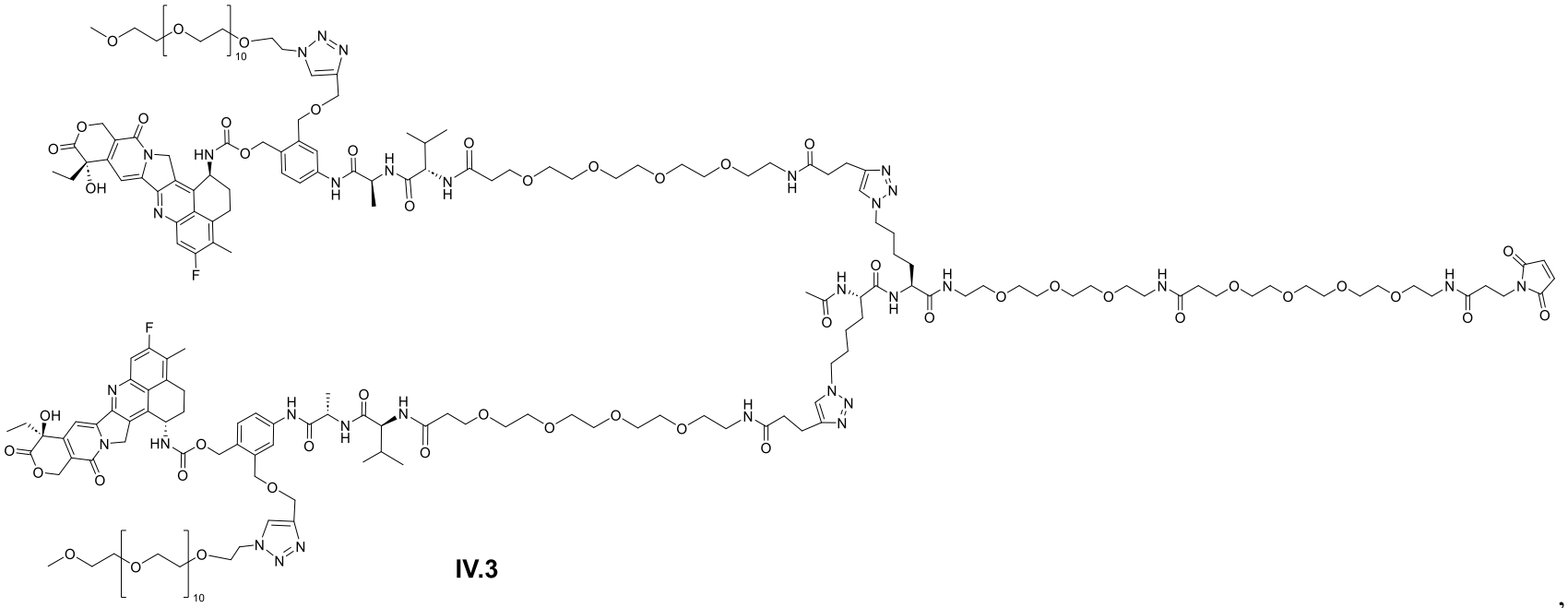
IV.1

,



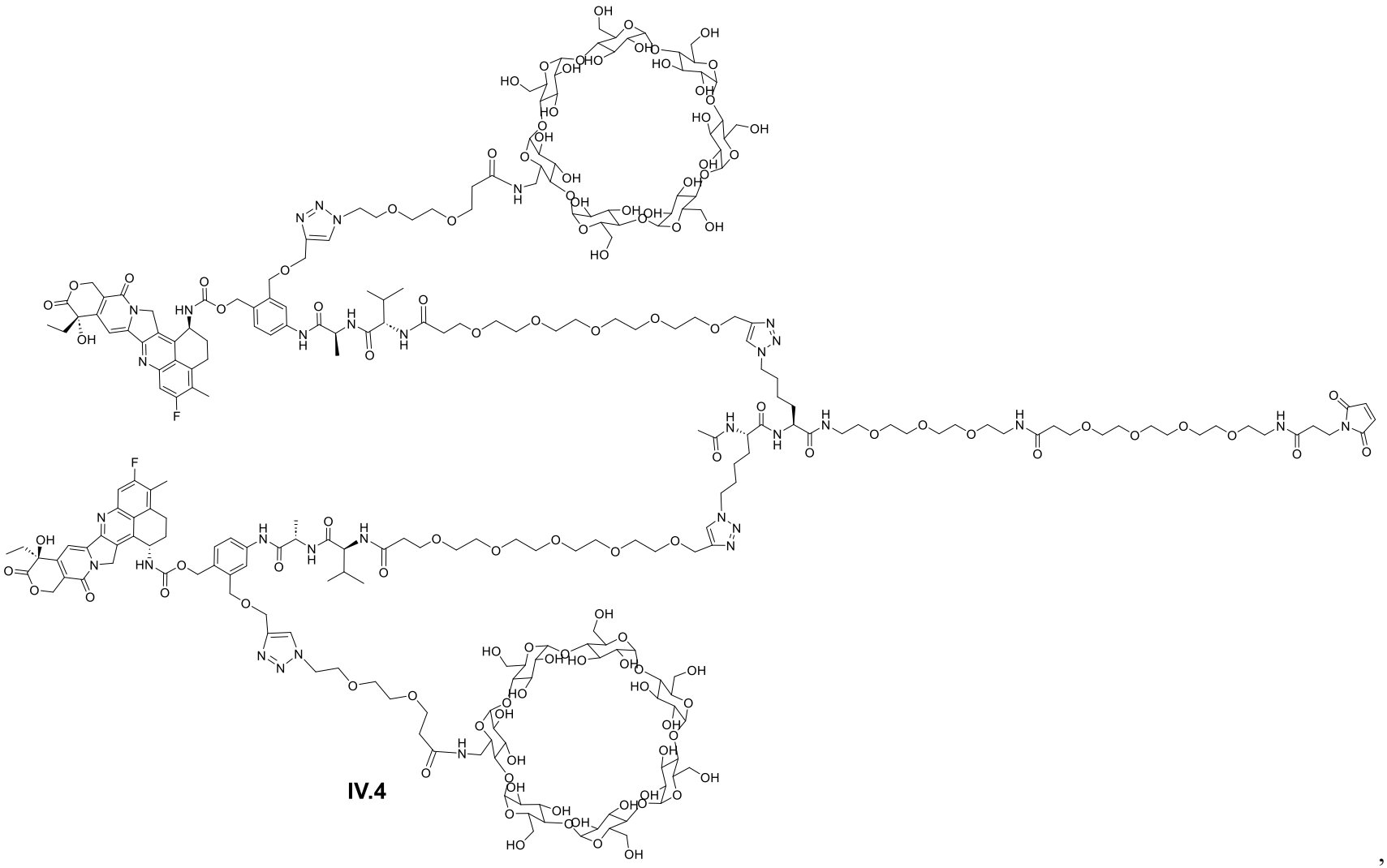
IV.2

,



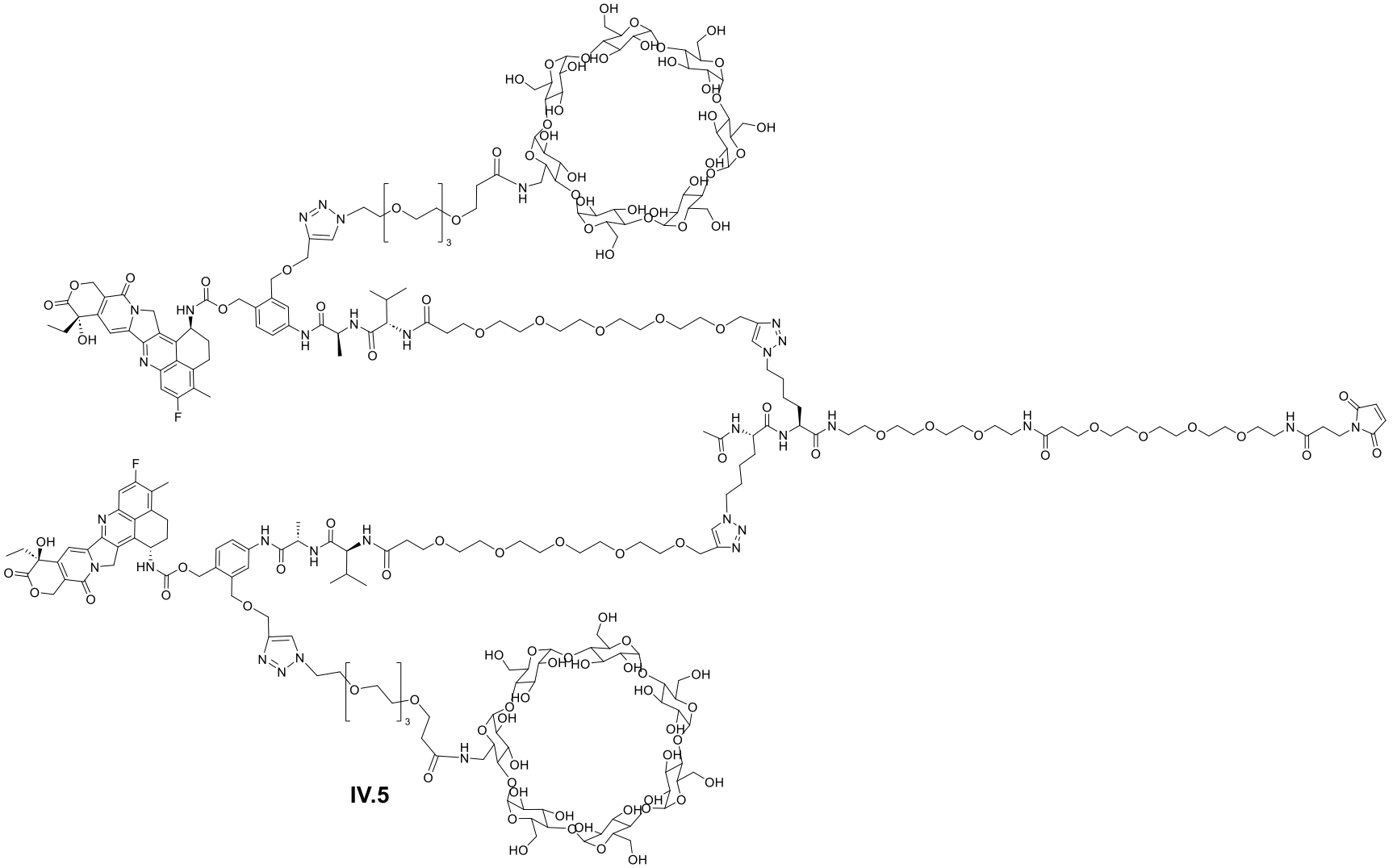
IV.3

,

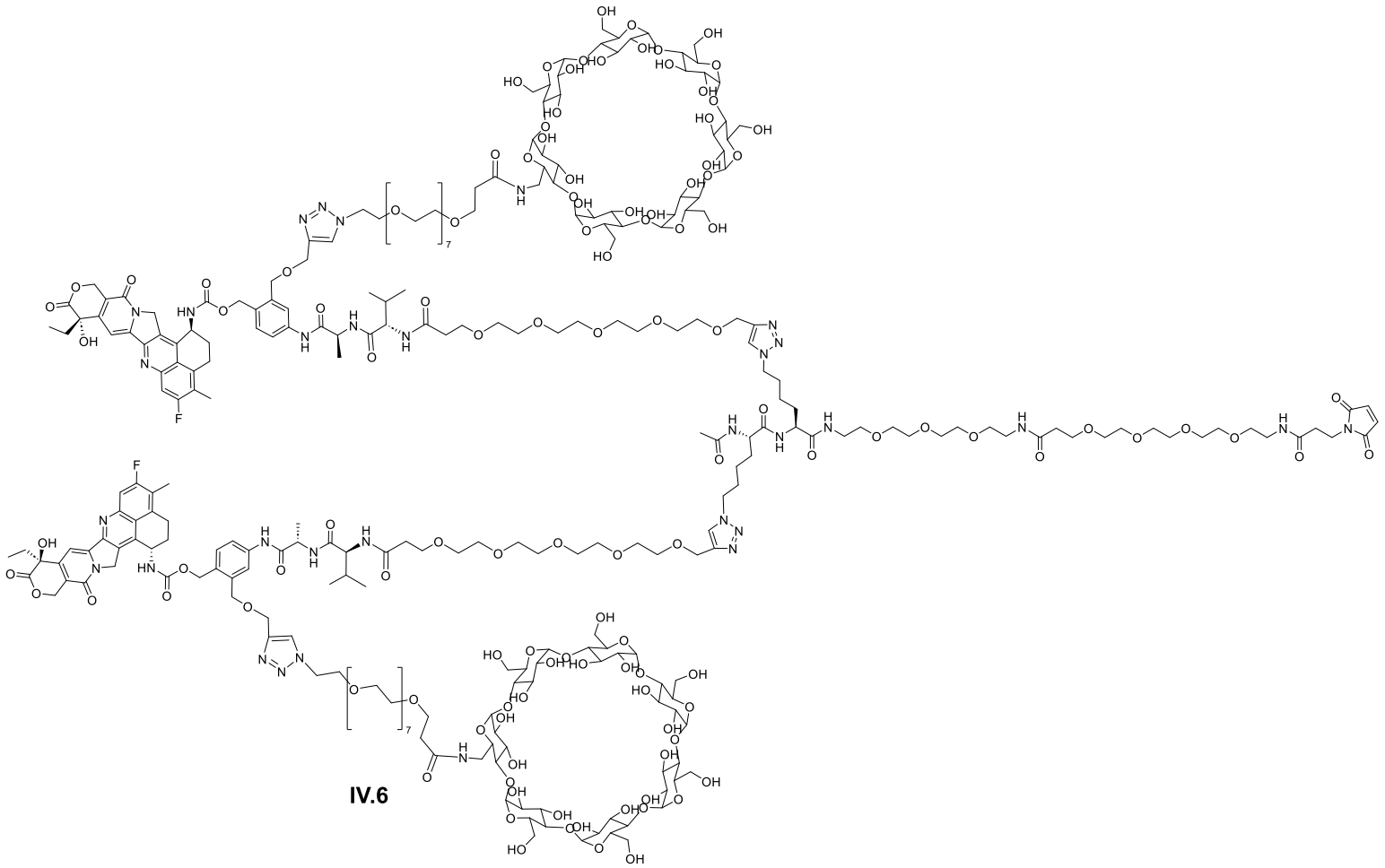


IV.4

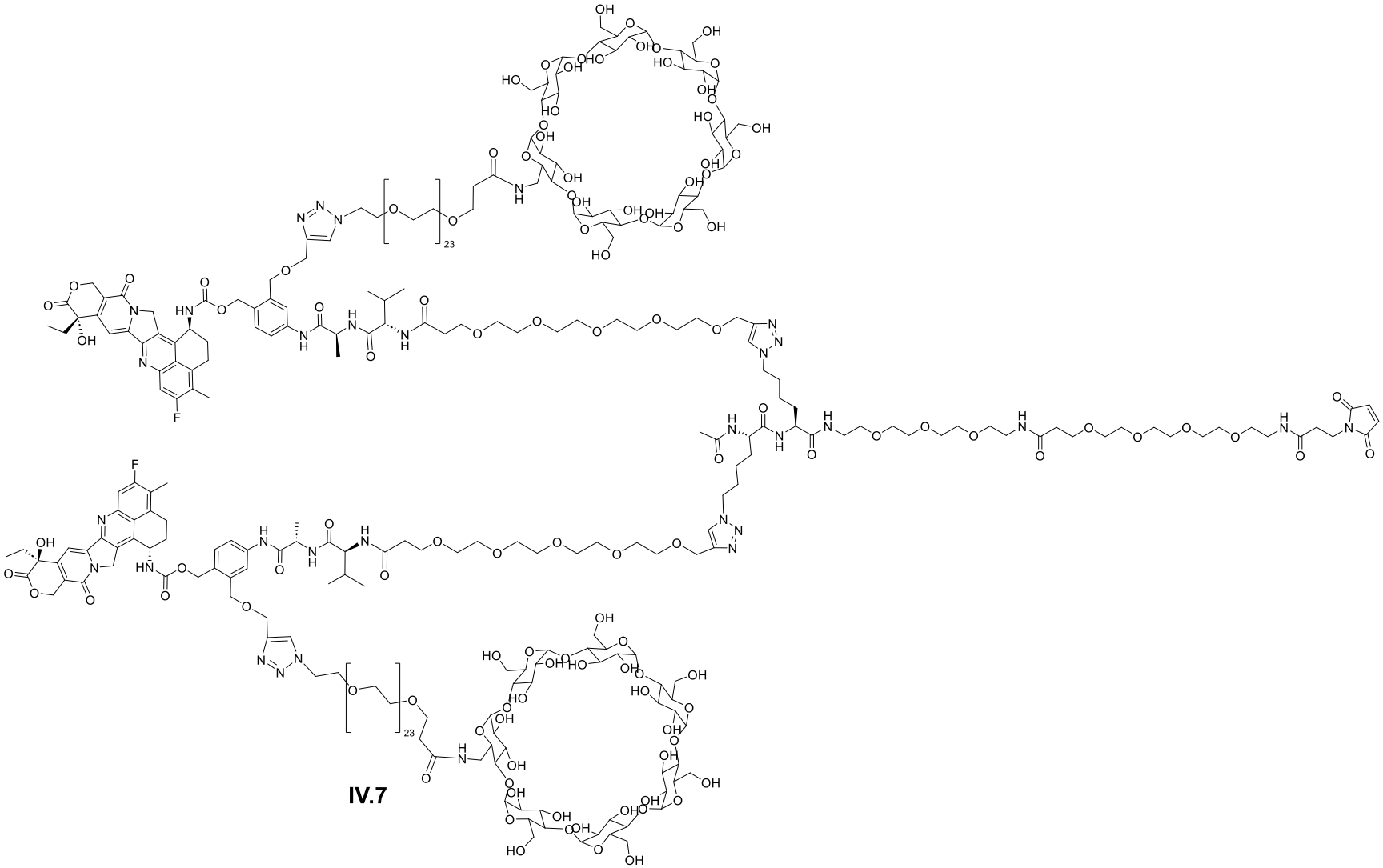
,



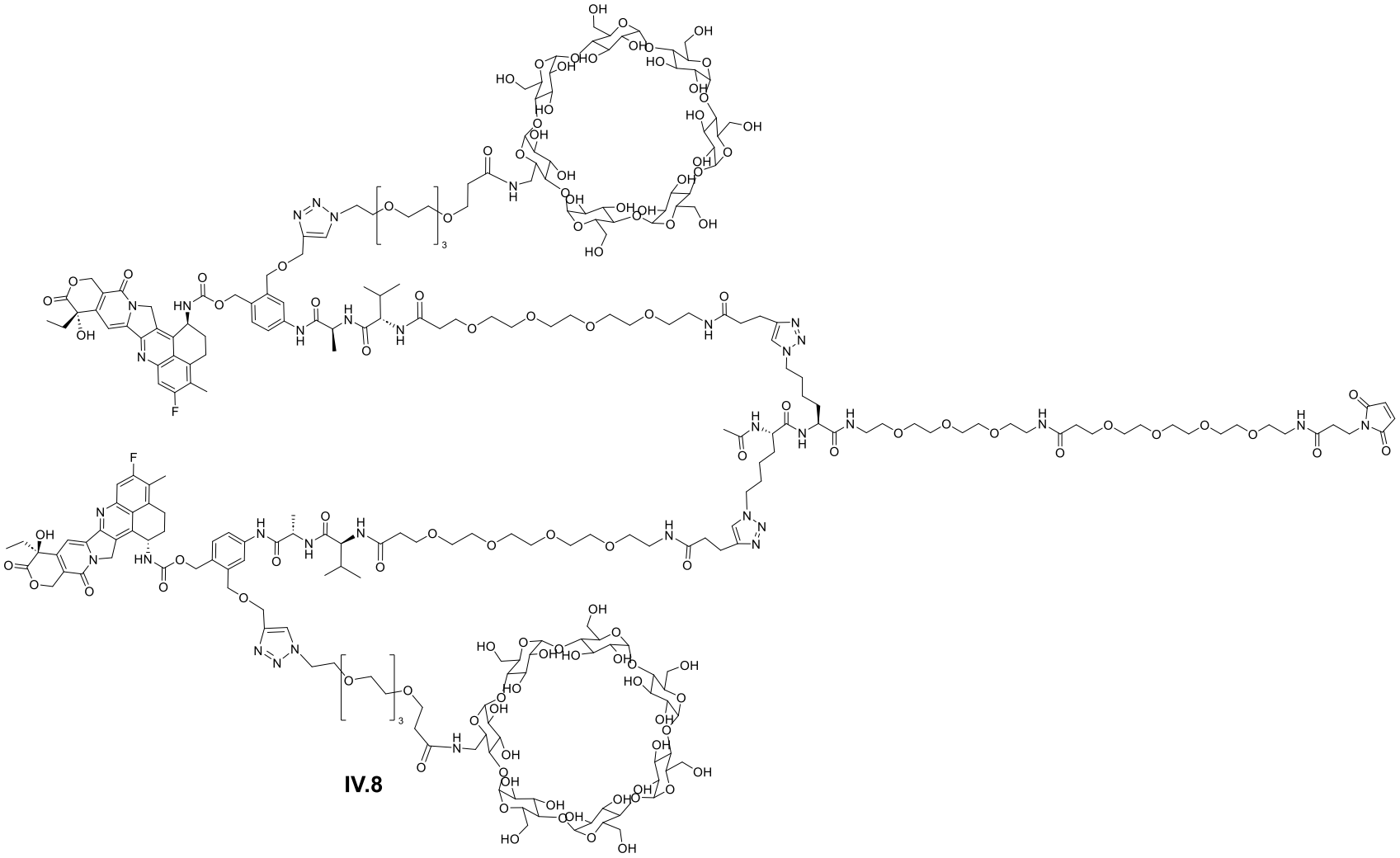
IV.5



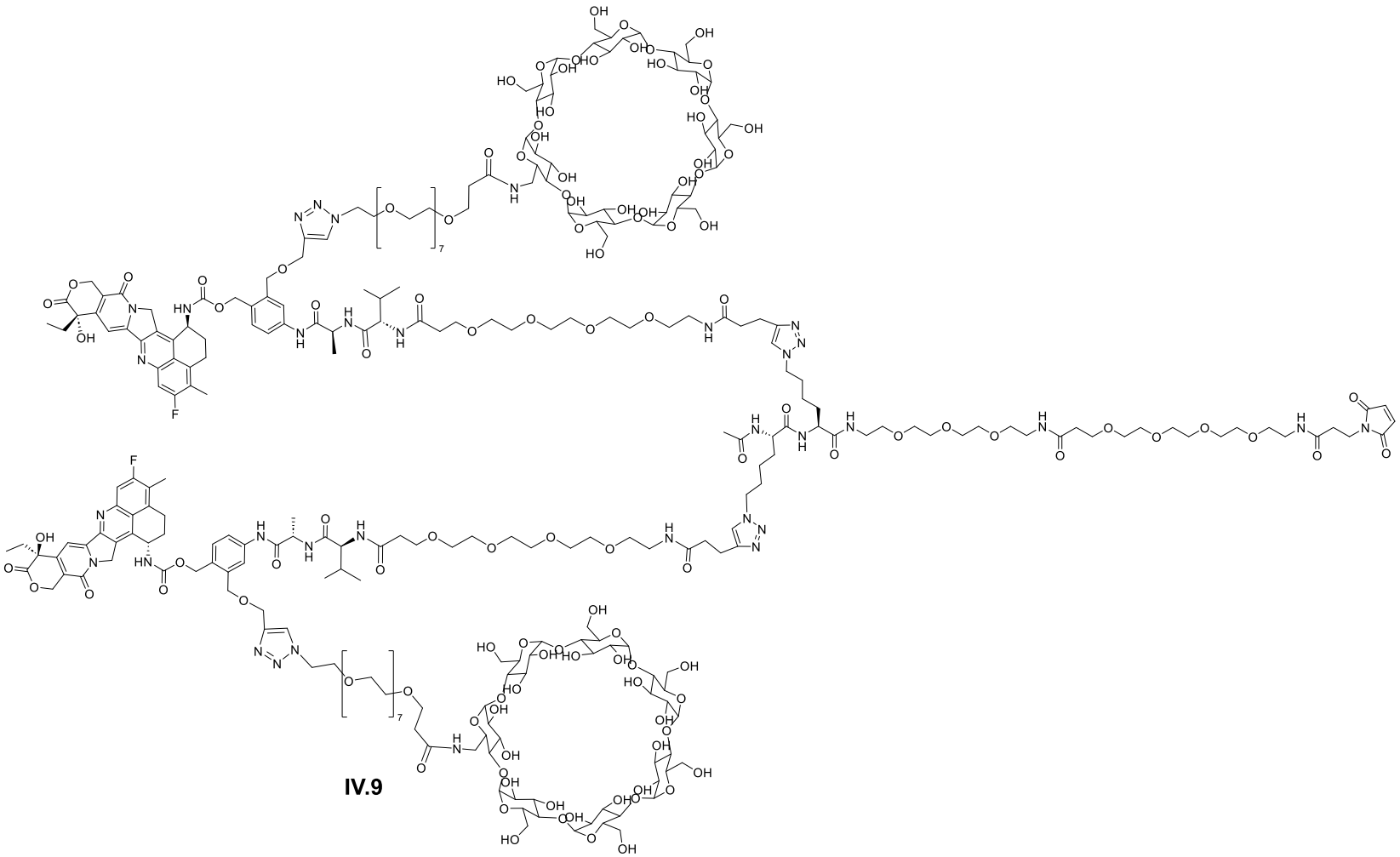
IV.6



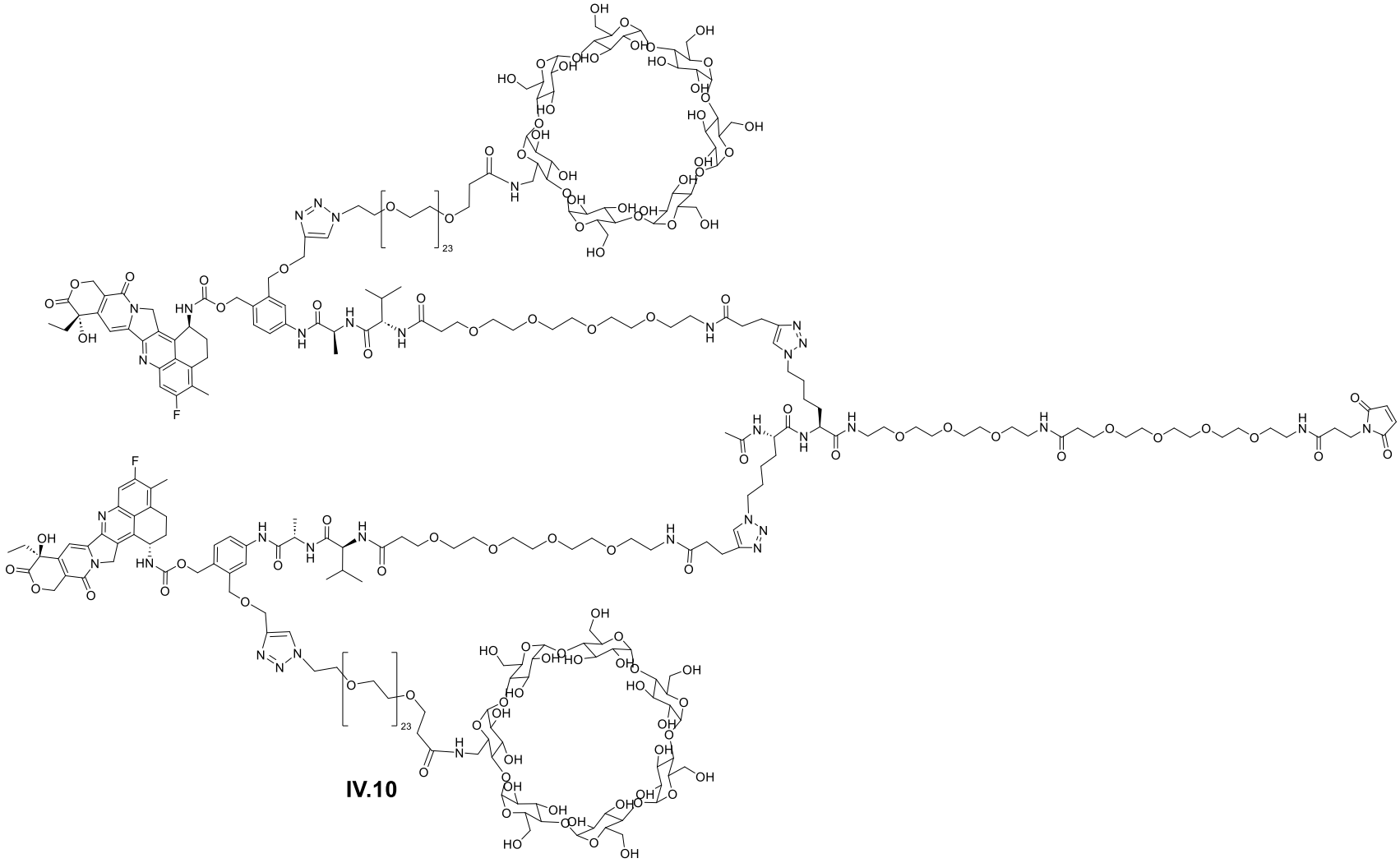
IV.7



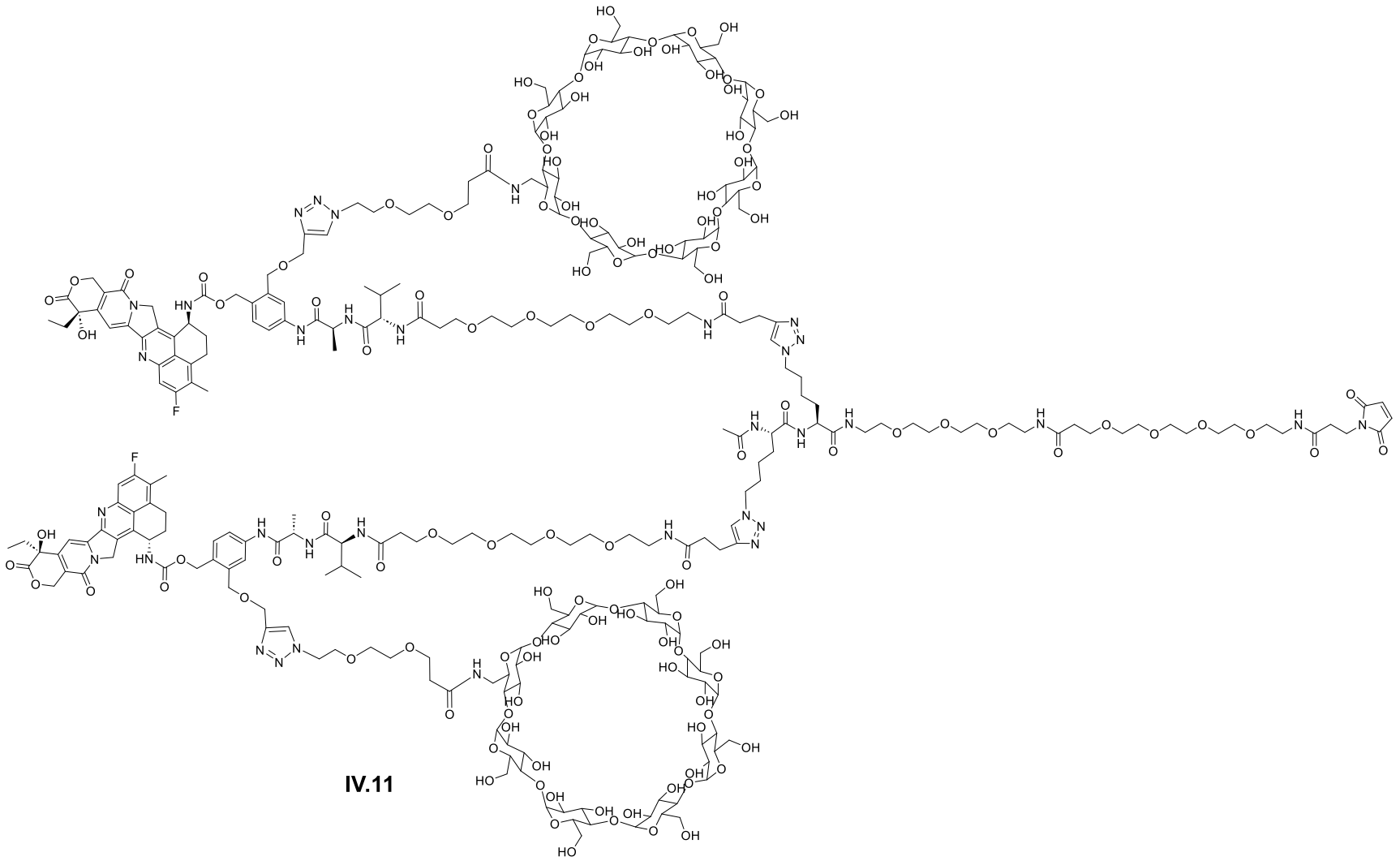
IV.8



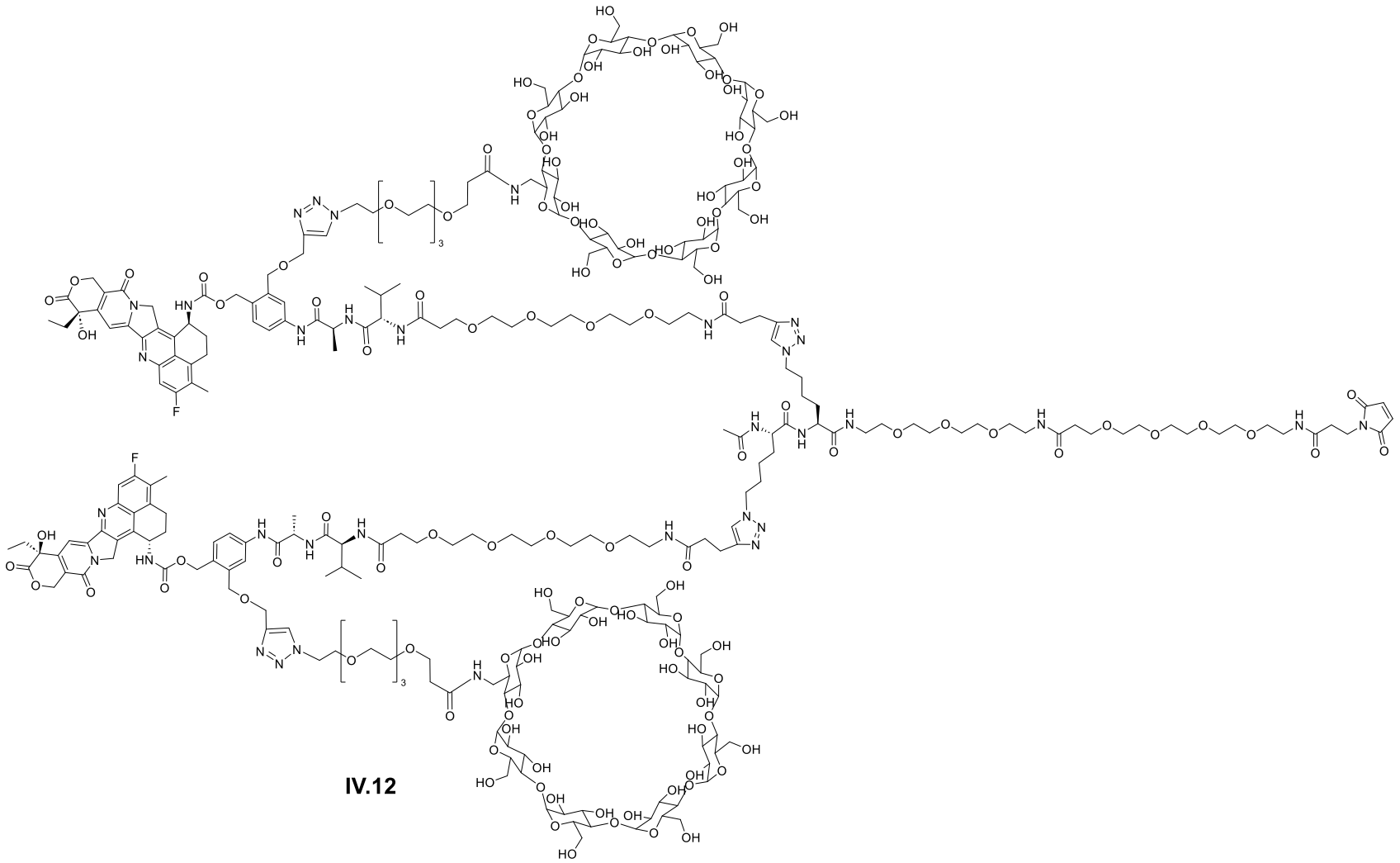
IV.9



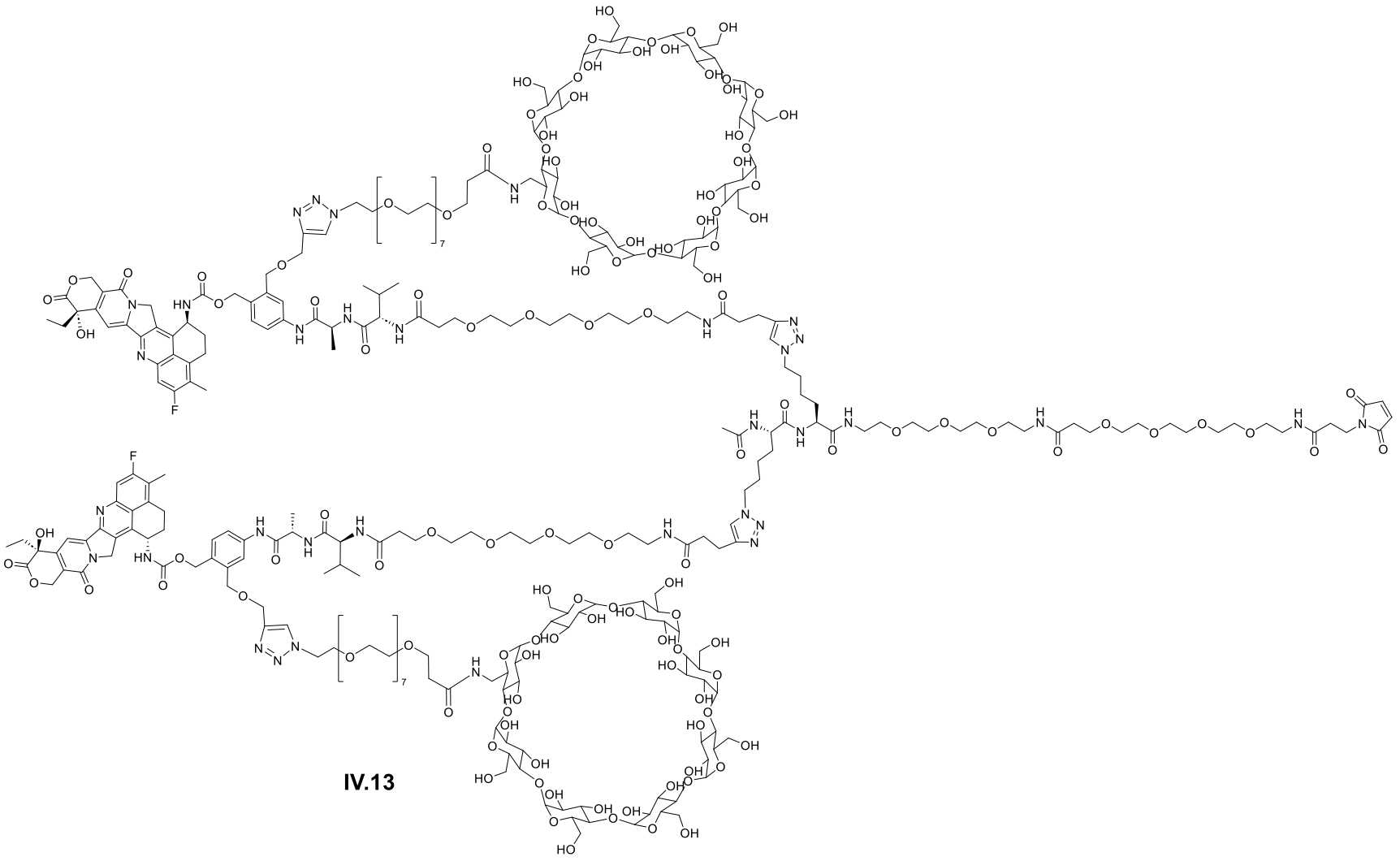
IV.10



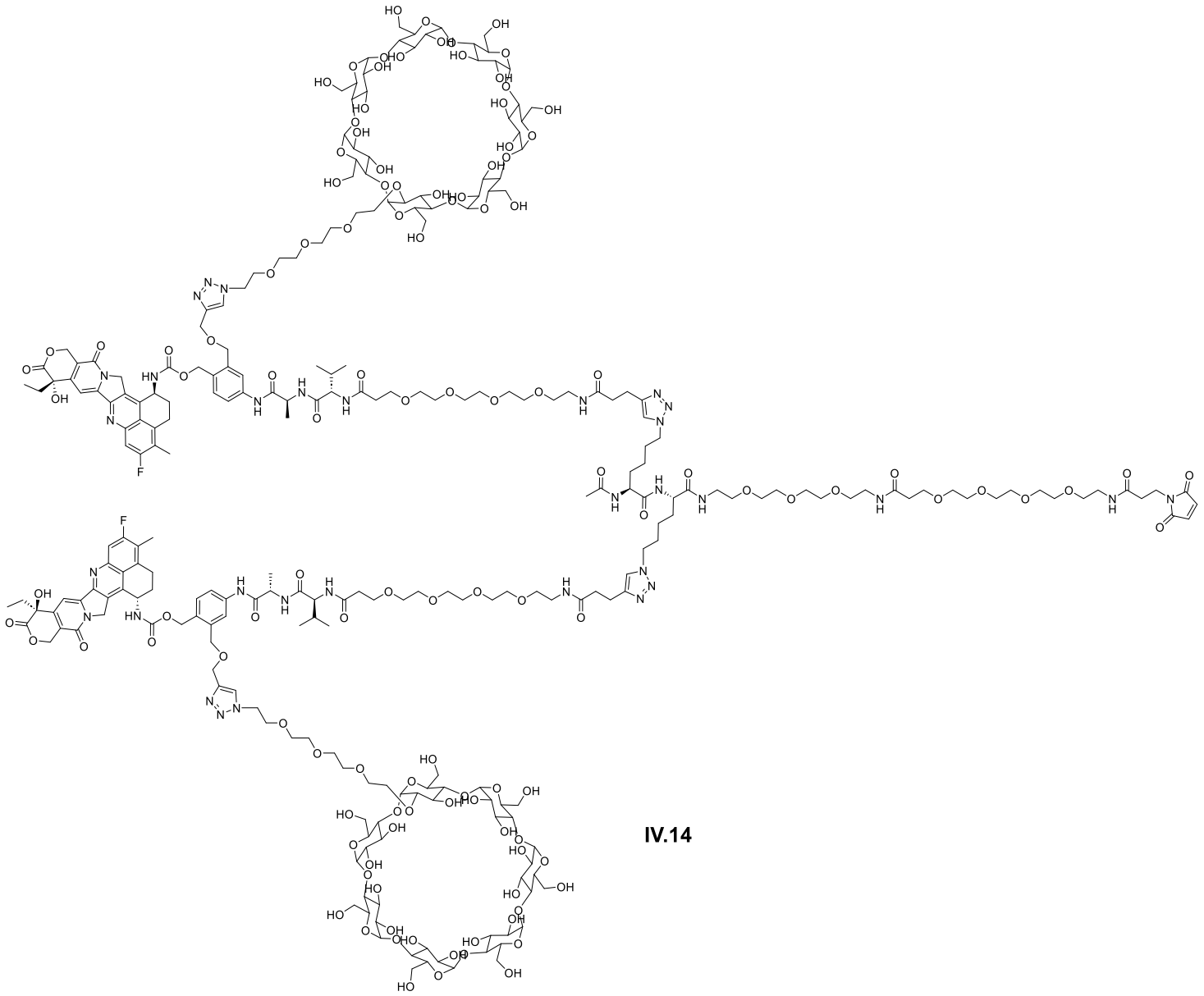
IV.11



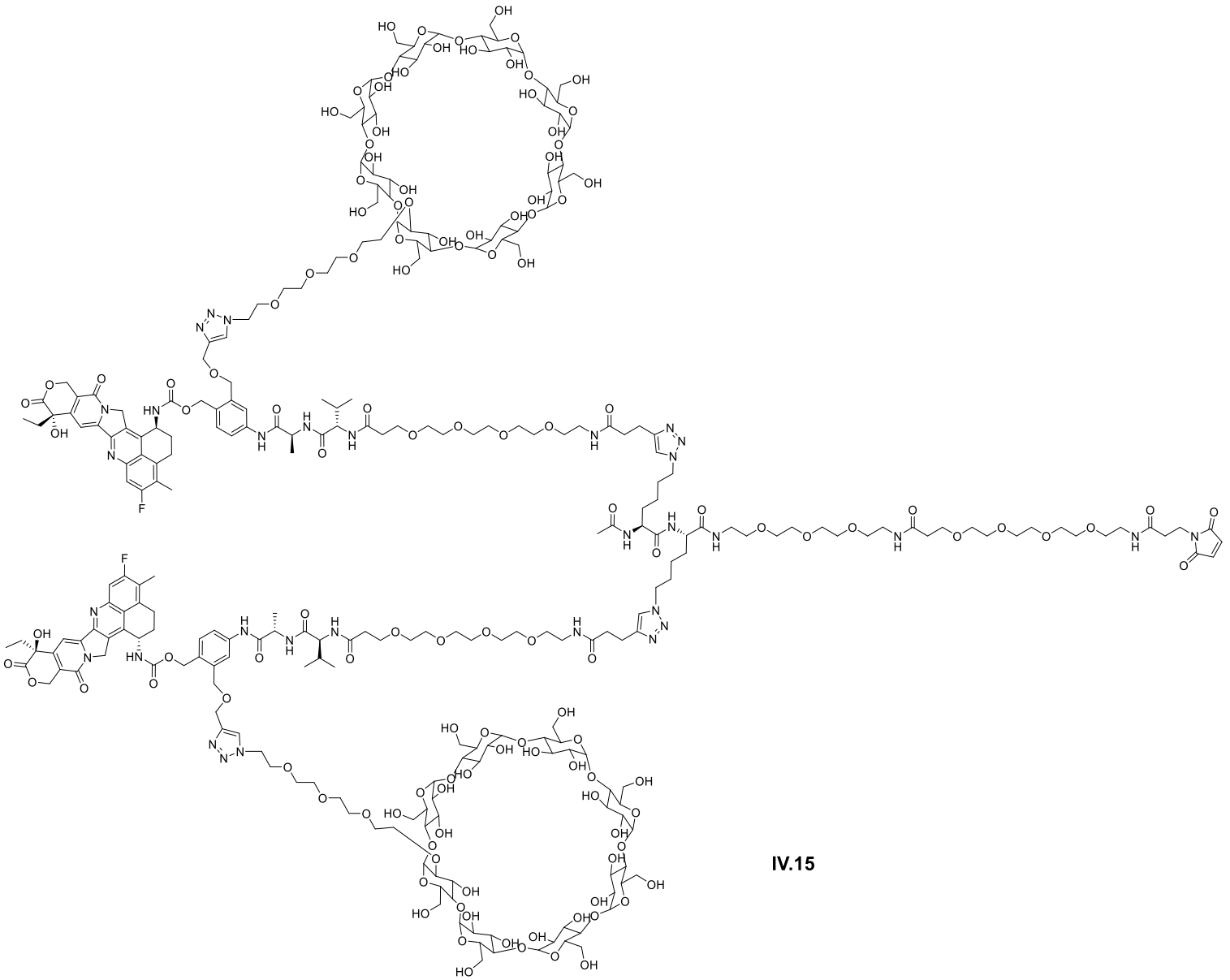
IV.12



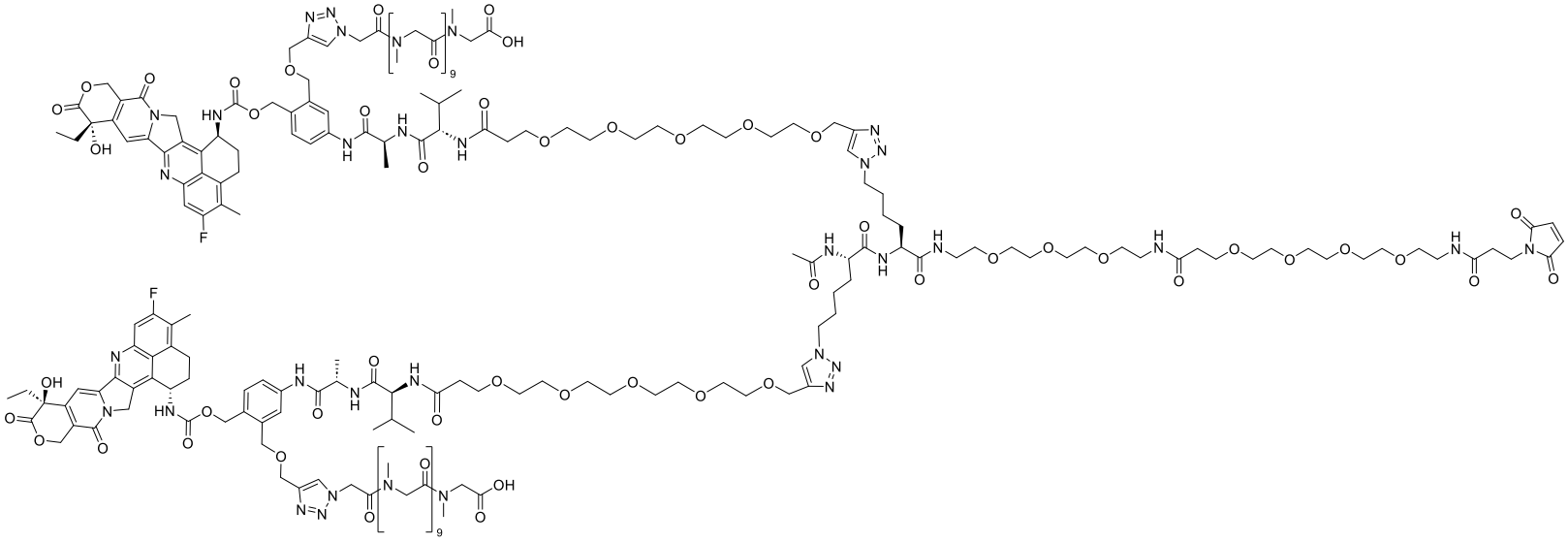
IV.13



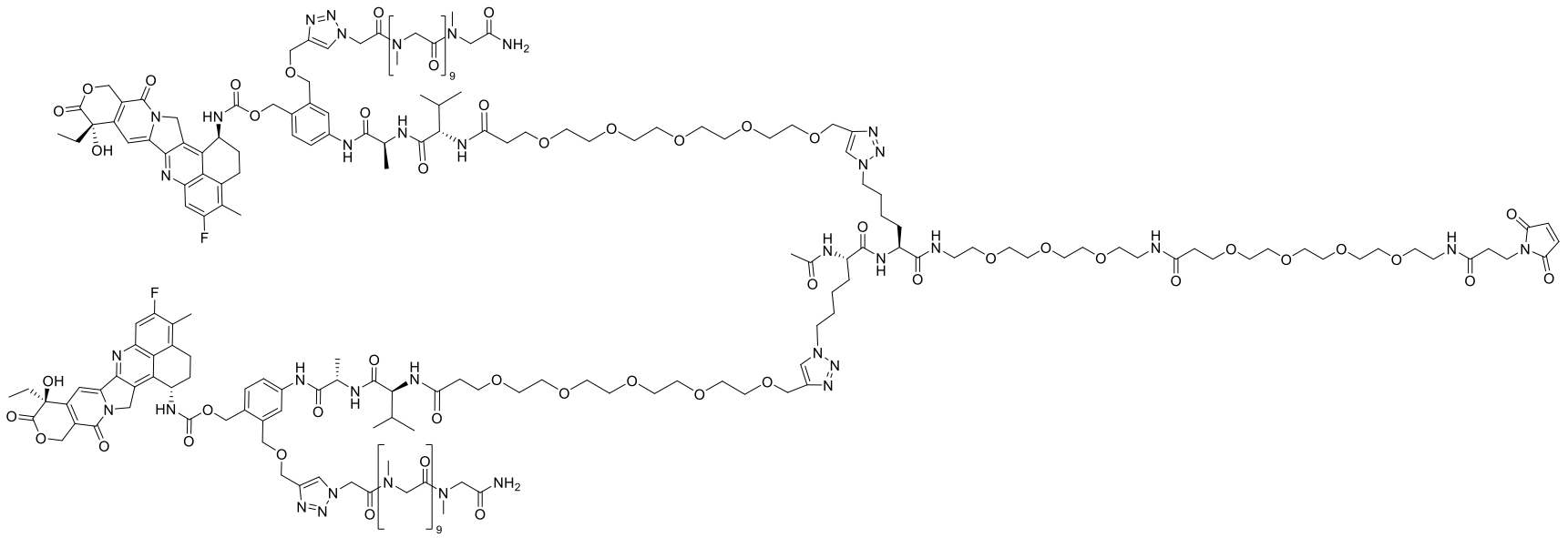
IV.14



IV.15

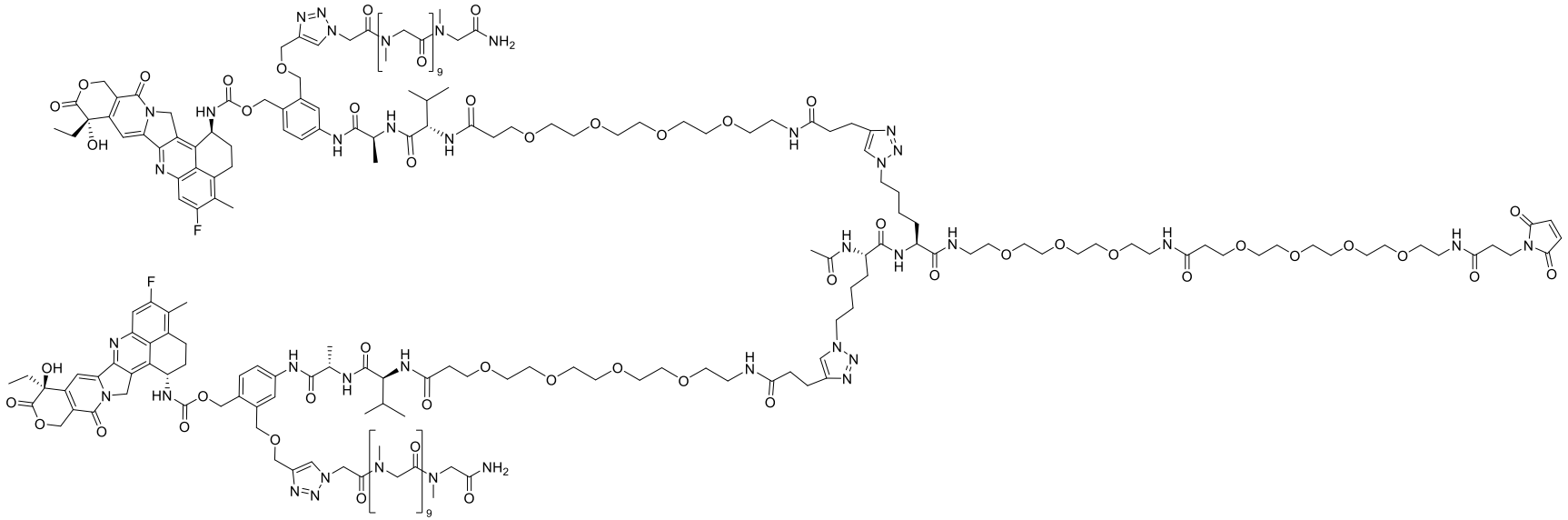


IV.16



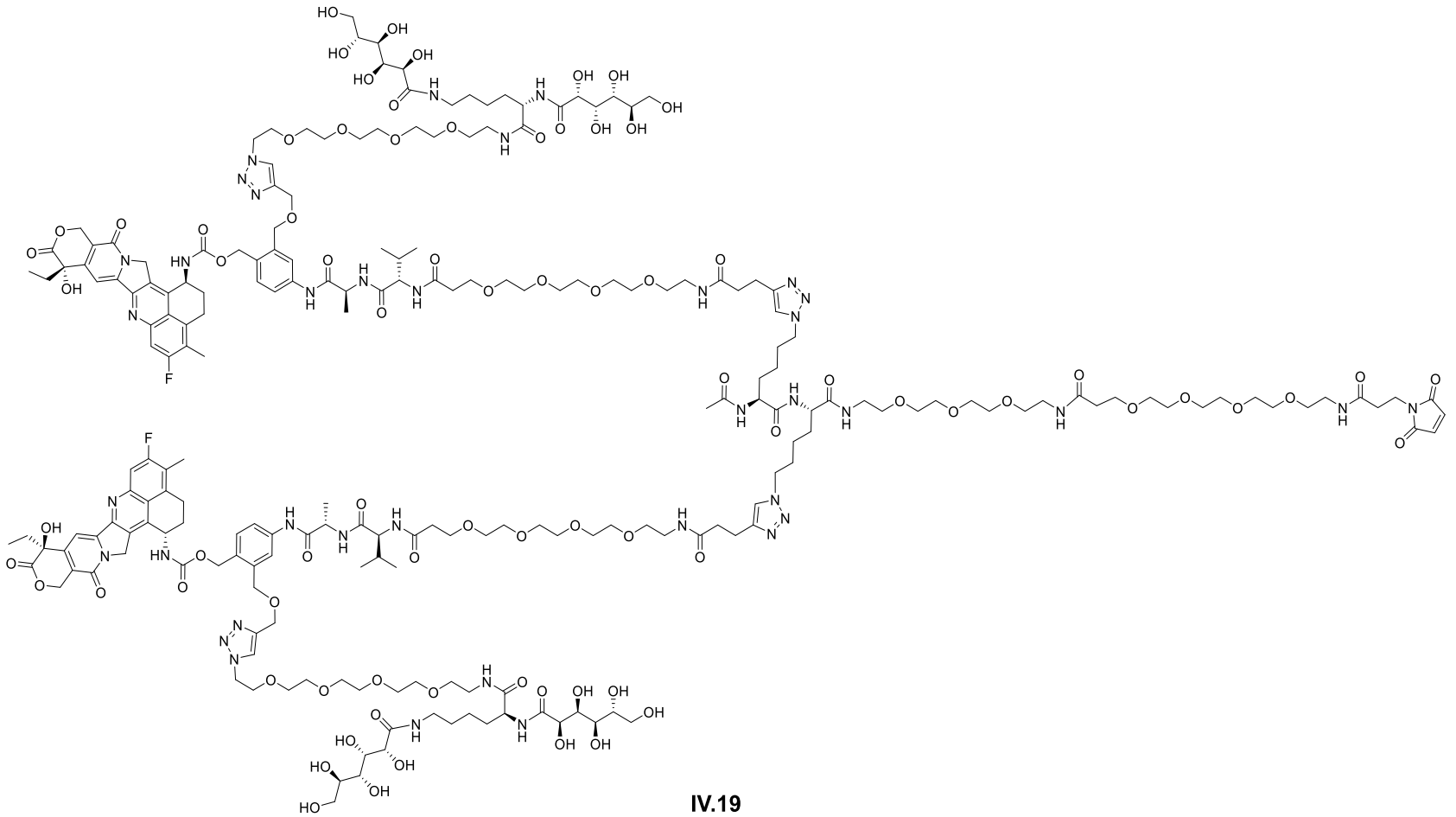
IV.17

,



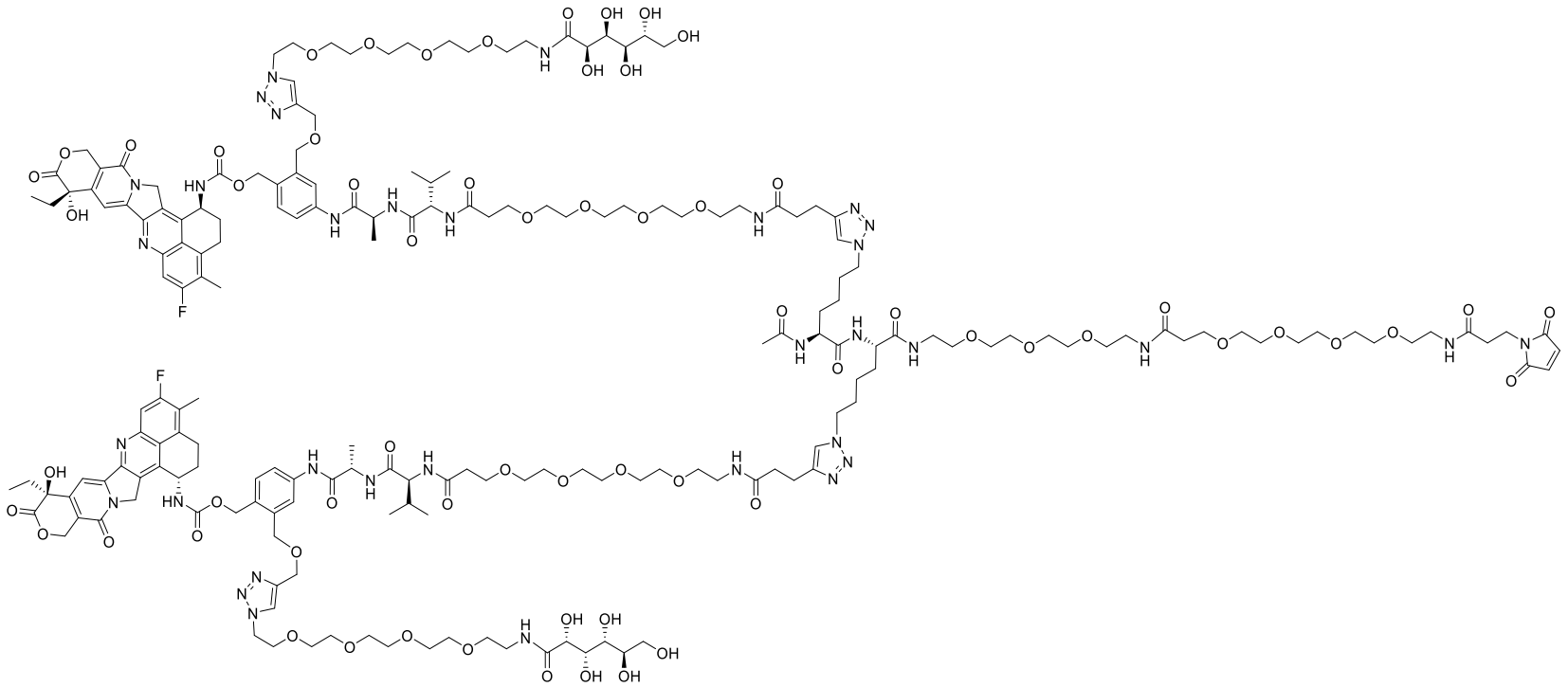
IV.18

,



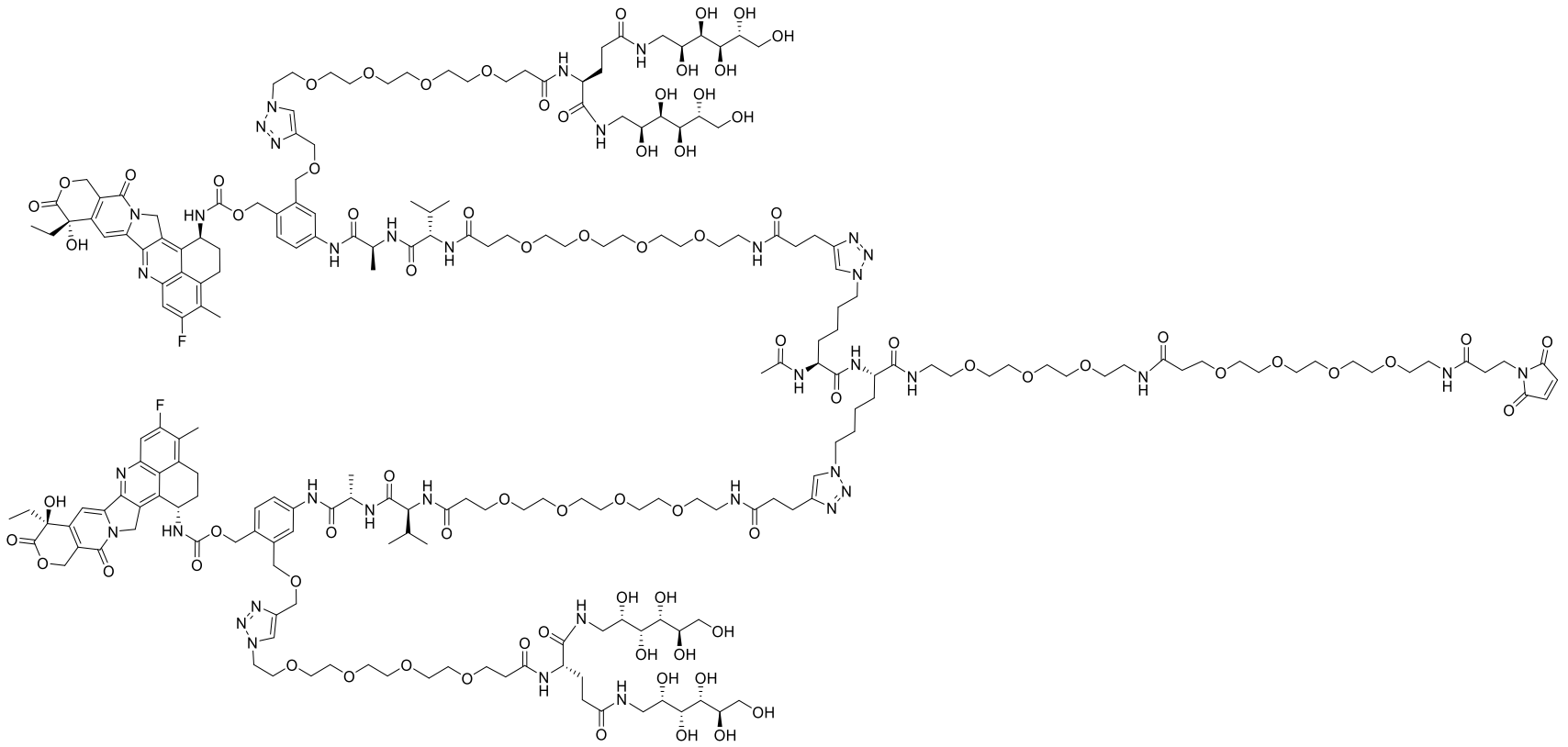
IV.19

,



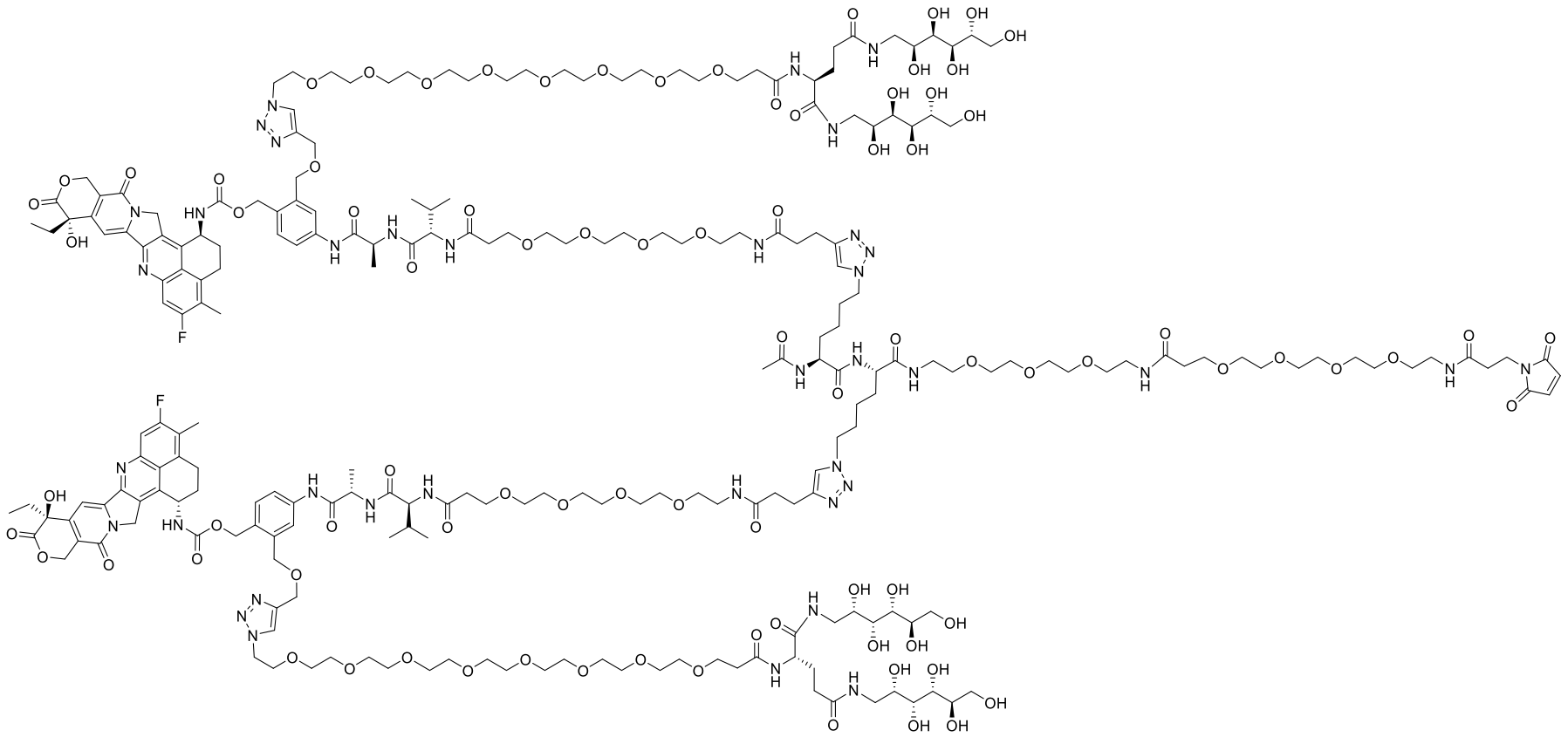
IV.20

,



IV.21

o



IV.22

.

9. Un método para sintetizar un compuesto enlazador modular de Fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, método que comprende:

(i) poner en contacto un primer compuesto que comprende:

– una fracción inmolante,

– una secuencia peptídica W escindible,

– un grupo amino protector Pg^1, que está unido covalentemente a W,

– una sustancia farmacéuticamente activa D y

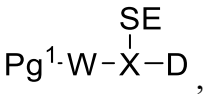
– un primer grupo complementario Cg^1

con un segundo compuesto que comprende

– un grupo potenciador de la solubilidad SE y

– un segundo grupo complementario Cg^2

para formar un intermediario de Fórmula II:



Fórmula II

en donde SE está unido a X a través de R^2 y en donde R^2 está formado por la reacción de Cg^1 y Cg^2;

(ii) eliminar el grupo amino protector Pg^1 de la Fórmula II para exponer una amina primaria;

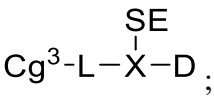
(iii) poner en contacto dicha amina primaria con un tercer compuesto que comprende

– un espaciador Z^3,

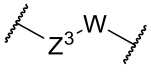
– un grupo amina reactivo, y

– un tercer grupo complementario Cg^3

para formar el intermediario de Fórmula III:



Fórmula III

en donde L es 

(iv)poner en contacto el intermediario de Fórmula III con un cuarto compuesto ramificado que comprende

– un cuarto grupo complementario Cg^4 y

– un quinto grupo complementario Cg^5,

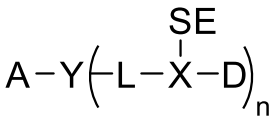
en donde Cg^3 reacciona con Cg^4 para formar Z^2; y

(v) poner en contacto el producto de iv) con un quinto compuesto que comprende

– una fracción reactiva A para conjugación con una fracción de unión a diana y

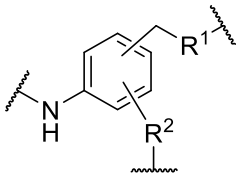
– un sexto grupo complementario Cg^6

en donde la reacción de Cg^5 y Cg^6 forma Z^1, para formar el compuesto enlazador modular de Fórmula I:



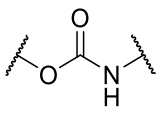
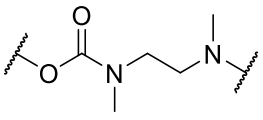
Fórmula (I)

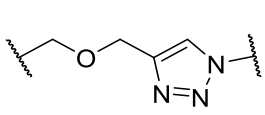
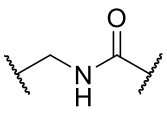
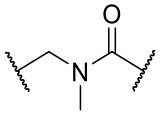
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde:

X es un espaciador autoinmolante, 

donde:

R^1 une covalentemente X a D en para u orto al grupo amino de X y

es un enlace o  ,  o  ; y

R^2 conecta X con SE y es  ,  o  .

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10,

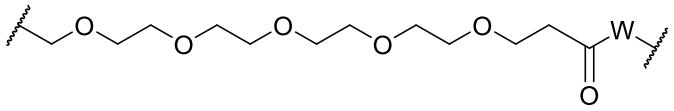
en donde W es una secuencia peptídica escindible o no escindible seleccionada del grupo formado por:

Val-Ala, Val-Cit, Met-Thr, Thr-Thr, Phe-Lys, Glu-Val-Ala, Glu-Val-Cit, Gly-Gly-Phe-Gly, Gly-Gly-Tyr-Gly, cBu-Ala, cBu-Cit, Glu-cBu-Ala, Glu-cBu-Cit, Asp-cBu-Ala, Asp-cBu-Cit,

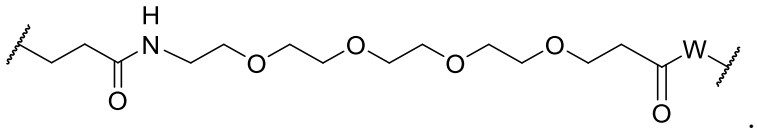
Asp-Pro-Val, Asn-Pro-Val, iGlu-cBu-Ala, iGlu-cBu-Cit, Val-Lys, Val-Arg, Val-Gln, Val-Met, Val-Thr, AcLys-Val-Cit, AcLys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, iGlu-Val-Ala, Asp-Val-Cit, iGlu-Val-Cit, Tyr-Arg, Tyr-Met, Phe-Cit, Phe-Ala, Phe-Arg, Phe-Met, Phe-Gln, Phe-Arg-Arg-Gly, Phe-Arg-Arg-Leu, Phe-Arg-Arg-Leu-Gly, Phe-Leu-Arg-Arg-Gly, Ala-Lys, Leu-Cit, Leu-Gln, Ile-Cit, Ala-Ala-Asn, Ala-Asn, Ala-Ala, Asn-Asn, Asn, beta-Ala, y Lys o sus combinaciones; y

en donde Z^3 es un enlace o un espaciador que comprende una cadena de alquilo C_{1-20} o un polietilenglicol de 1 a 10 $(PEG)_{1-10}$ o un C_2-amida-PEG_{1-10} ;

en donde L es preferiblemente



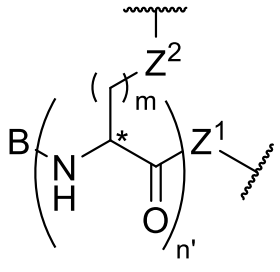
o



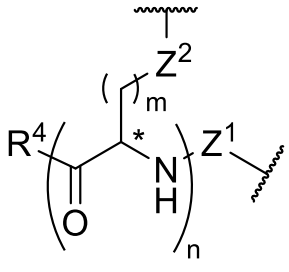
.

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde

Y es:

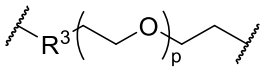


o ;

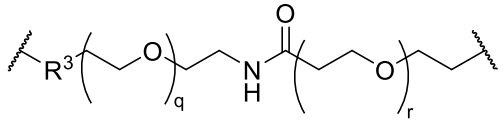


m es un número entero entre 1 y 6;

Z^1 conecta Y a A y es



o



, donde

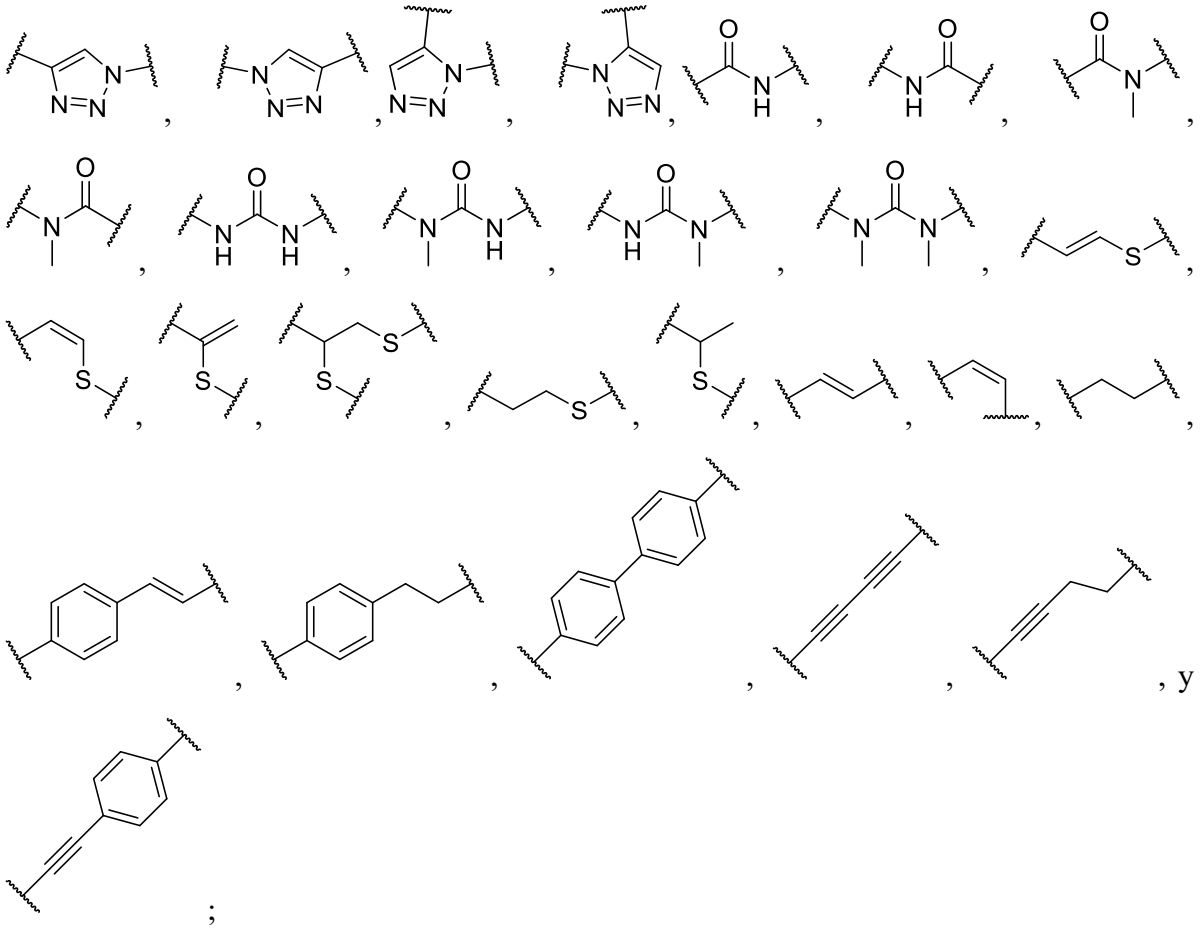
R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH_3)C(=O)-, y

p es un número entero entre 1 y 24, preferiblemente entre 4 y 24, más preferiblemente entre 8 y 24,

q es un número entero entre 1 y 8,

r es un número entero entre 1 y 24,

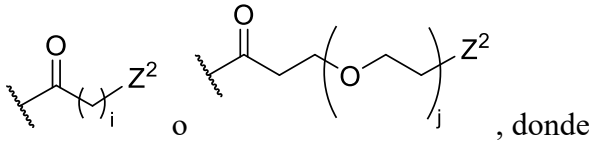
Z^2 conecta Y a L y se selecciona del grupo formado por:



;

B es:

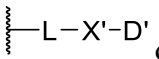
una caperuza, preferiblemente un grupo acilo, y n' es n; o

 , donde

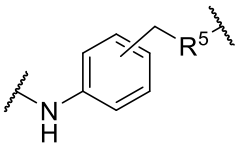
i es un número entero entre 1 y 20,

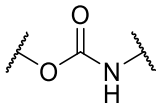
j es un número entero entre 1 y 10, y

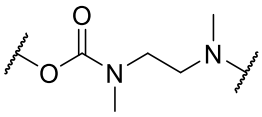
n' es n 1; o

 donde

D' es una sustancia farmacéuticamente activa diferente de D; y

X' es espaciador autoinmolante  , donde:

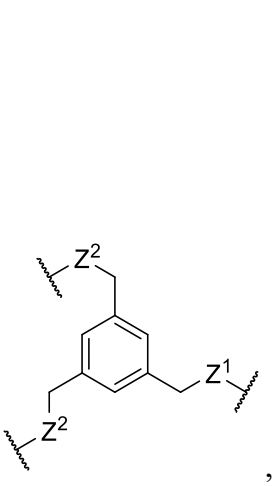
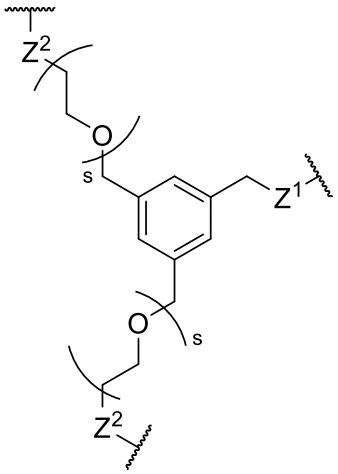
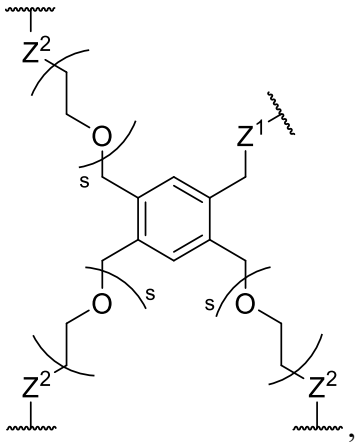
R^5 une covalentemente X' a D' en para u orto al grupo amino de X' y es un enlace, 

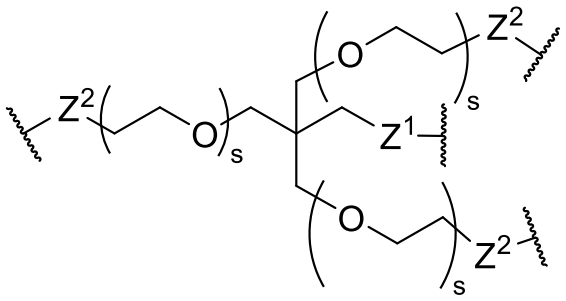
 o 

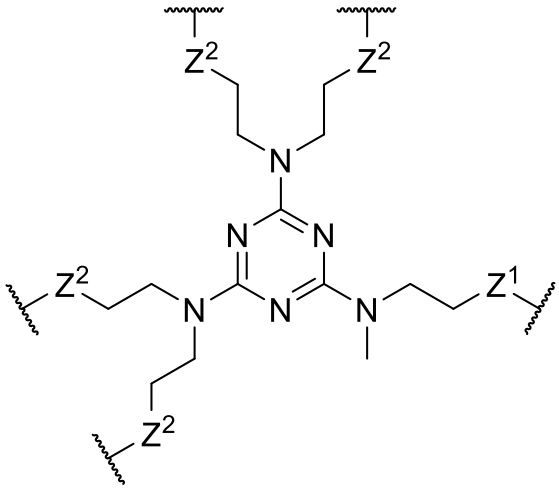
y n' es n;

R^4 es OH o NH2.

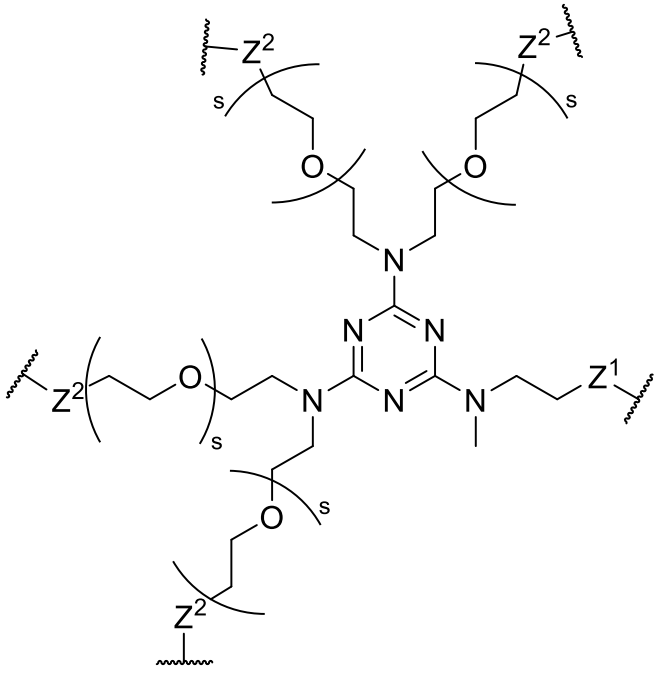
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde Y es:

 ,  ,  ,

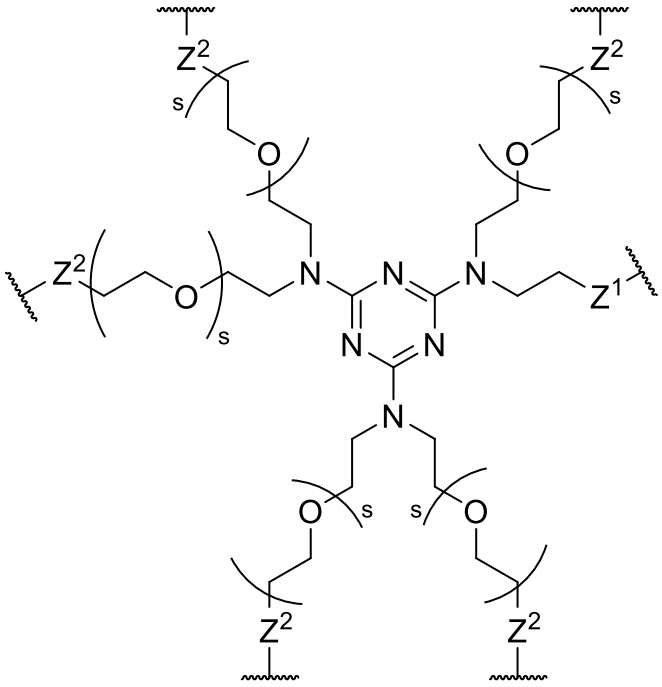
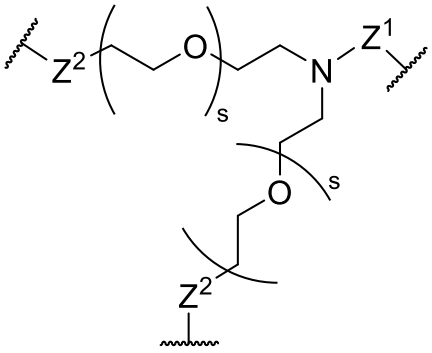
 ,

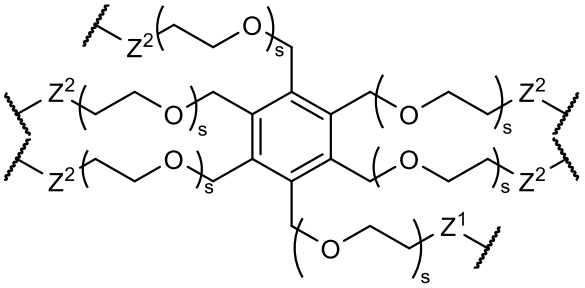

Z2
Z2
N
N
N
Z2
N
N
N
Z1
Z2

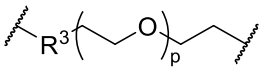
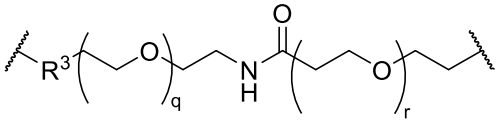
,


Z2
s
Z2
s
O
O
N
N
N
Z2
O
s
N
N
N
Z1
s
O
s
Z2

,


,  o ;


;

Z^1 conecta Y a A y es  o  , donde

R^3 es -O-, -NH-, -C(=O)-, -C(=O)N(CH_3)-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)- o -N(CH_3)C(=O)-,

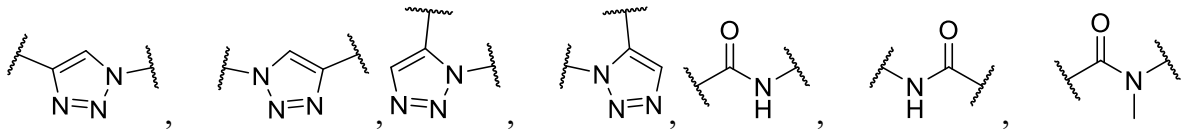
p es un número entero entre 1 y 24,

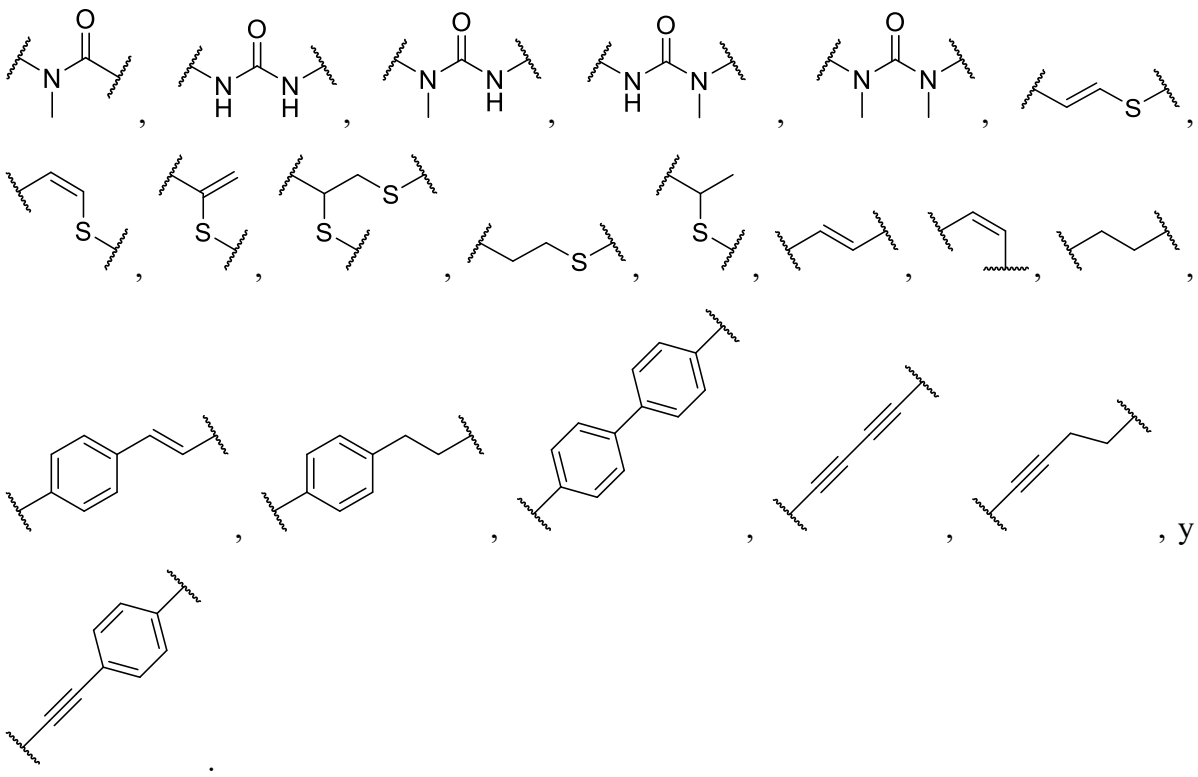
q es un número entero entre 1 y 8,

r es un número entero entre 1 y 24,

s es un número entero entre 0 y 4,

Z^2 conecta Y a L y se selecciona del grupo formado por:

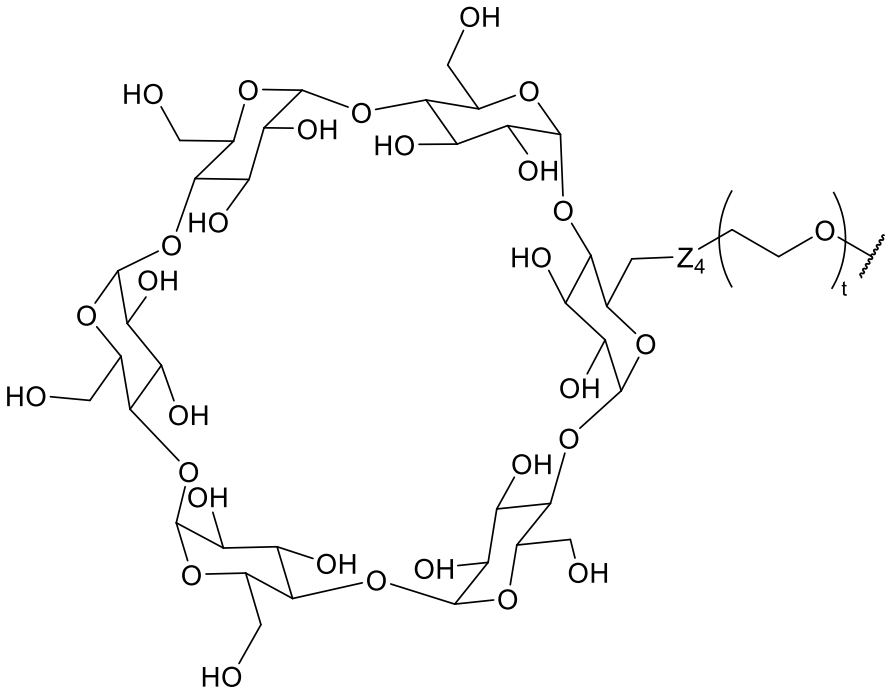




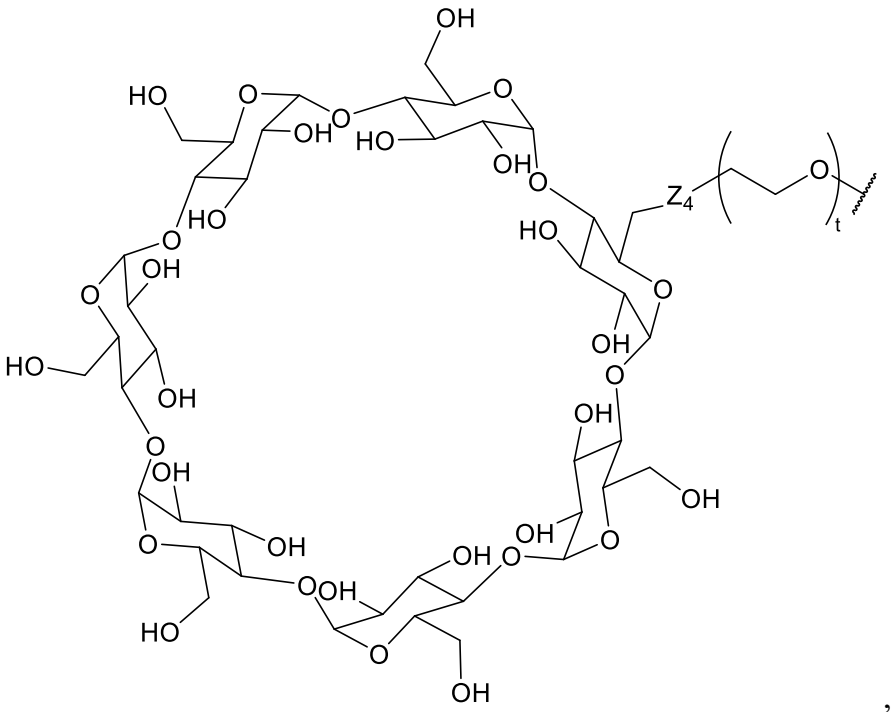
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde D y D' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en camptotecinas, preferiblemente exatecan, SN38 y topotecan; auristatinas, preferiblemente seleccionadas de monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF); maitansinoides, seleccionados preferiblemente entre mertansina (DM1) y ravtansina (DM4); calicheamicinas; agonistas del receptor tipo Toll 7 (TLR7); inhibidor de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) ($NAMPT_i$): pirrolobenzodiazepinas (PBD); duocarmicinas; antraciclinas, preferiblemente doxorrubicina; amatoxinas, preferiblemente alfa-amanitina, beta amanitina, amanina y amaninamida; criptoficinas; faloidinas; seco-ciclopropilpirroloindolina (seco-CPI); seco-ciclopropilbenzoindolina (seco-CBI); taxoles; vinblastinas; colchicinas; eribulinas; metotrexato (MTX); triptolida; y sus derivados.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde S comprende una alfa-ciclodextrina, una beta-ciclodextrina, una gamma-ciclodextrina, una polisarcosina, un PEG, un galactósido, un glucurónido o un polialcohol de hidratos de carbono,

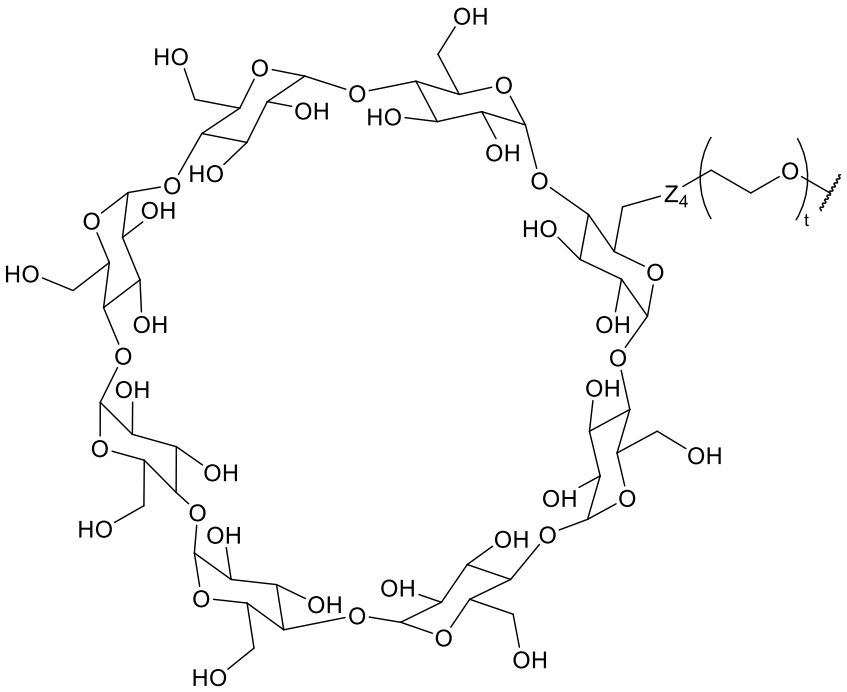
preferiblemente



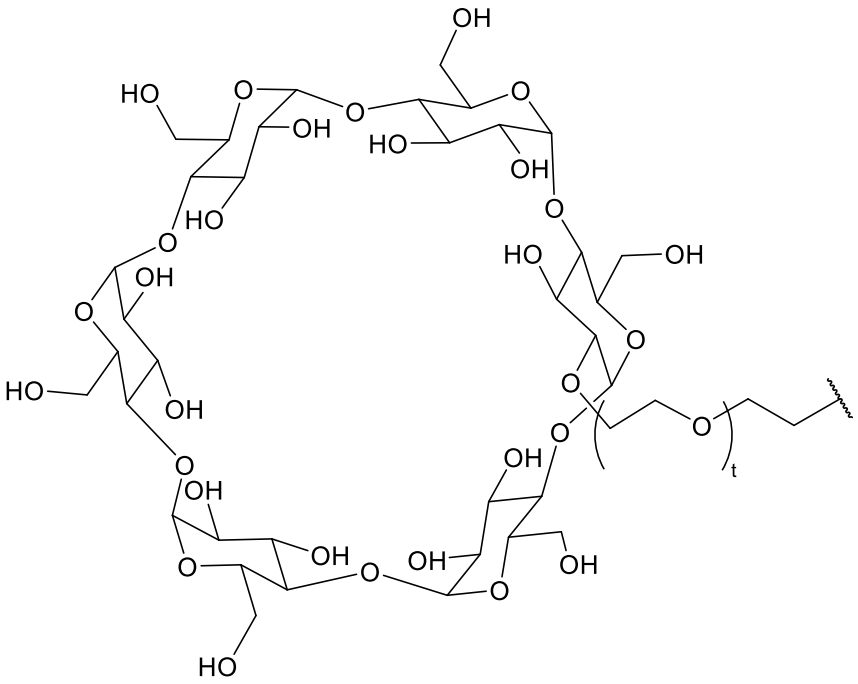
,

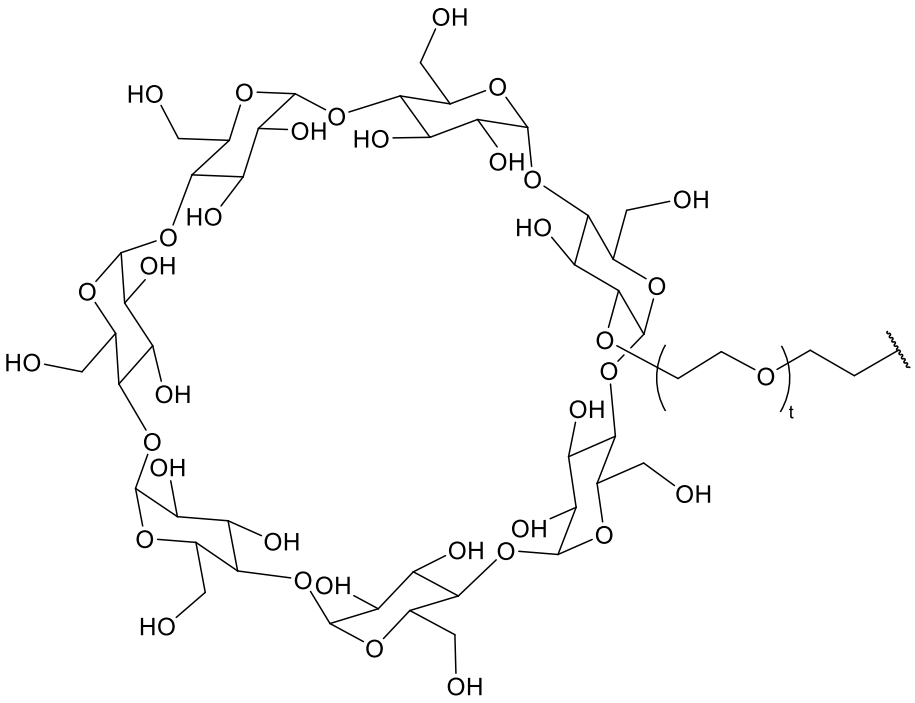


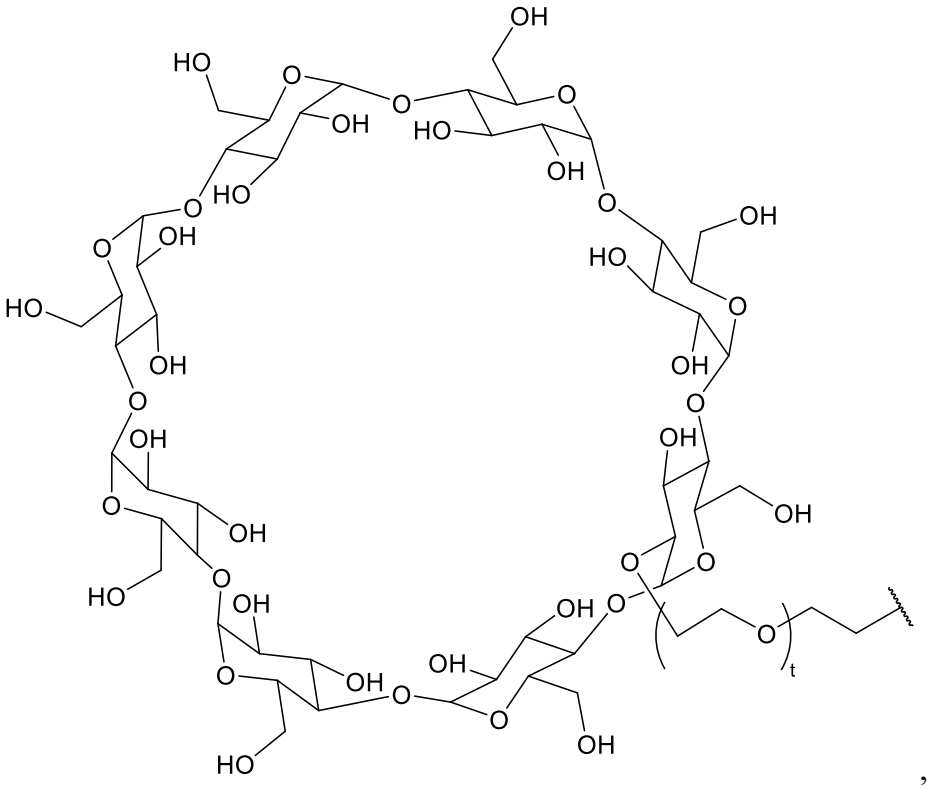
,


OH
HO
O
OH
HO
O
O
OH
HO
O
Z4
O
t
HO
O
OH
O
OH
HO
OH
O
OH
O
OH
OH
O
OH
HO
O
OH
OH
O
OH
O
OH
HO

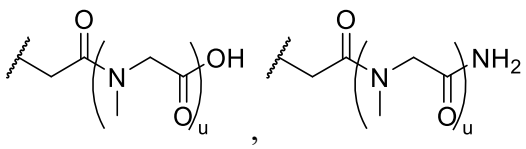
,


OH
HO
O
OH
HO
O
O
OH
HO
O
HO
OH
O
OH
O
HO
O
O
t
OH
O
OH
OH
O
OH
O
OH
HO

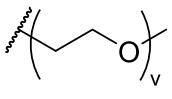


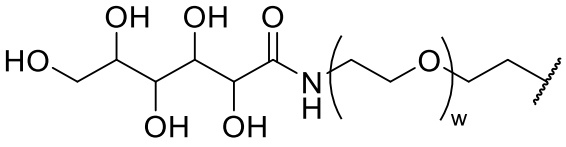


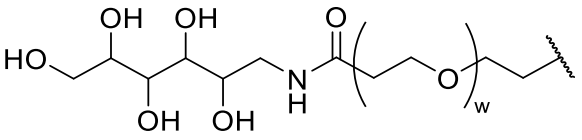
,

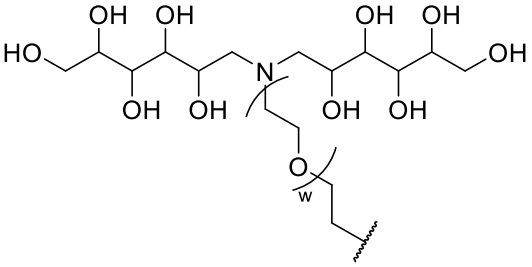


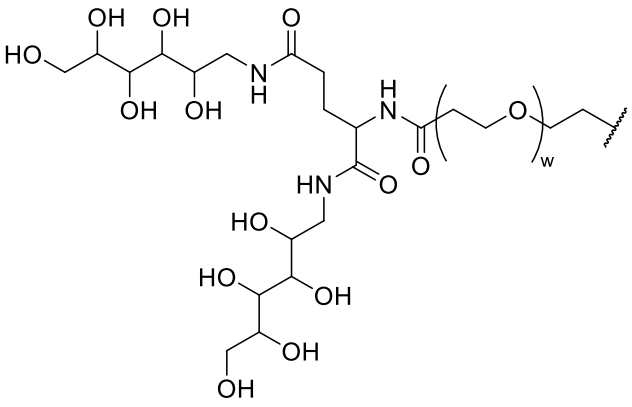
,

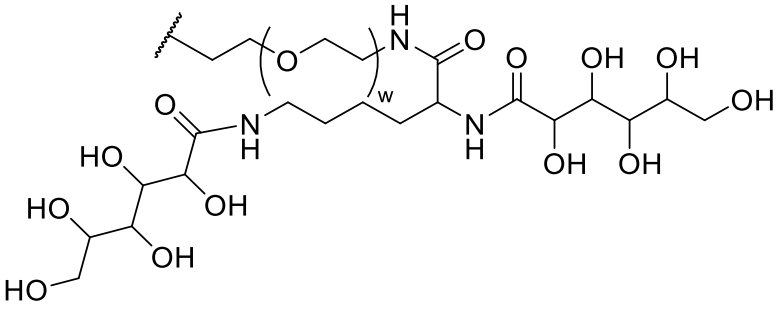

,

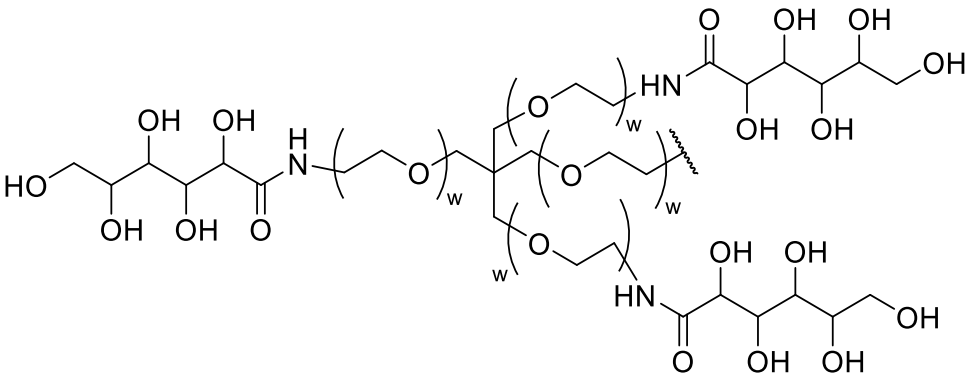

,

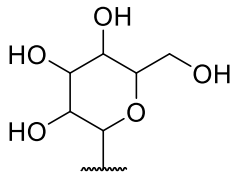
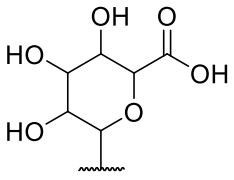

,


,

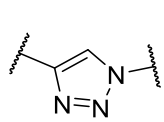
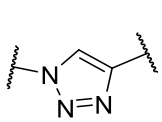
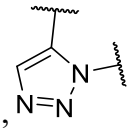
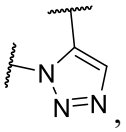
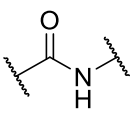
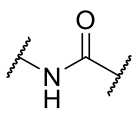
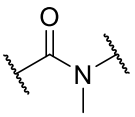
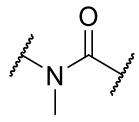
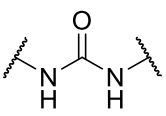
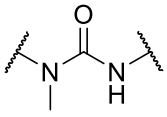
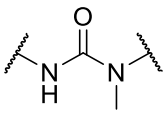
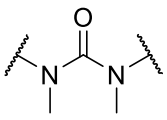
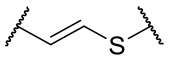
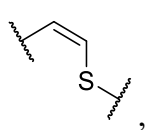
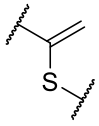
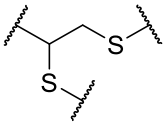
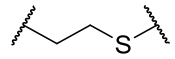
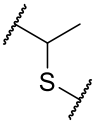
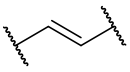
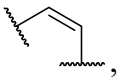
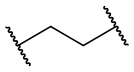
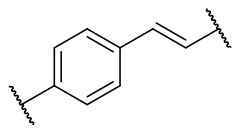
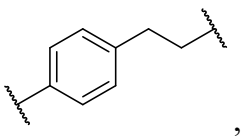
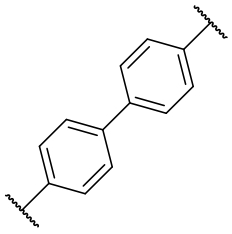
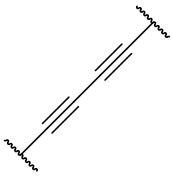
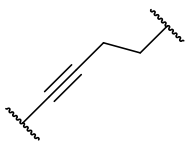
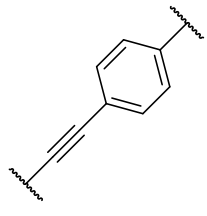

,


,


,



;

donde Z^4 se selecciona del grupo formado por:



























y

;

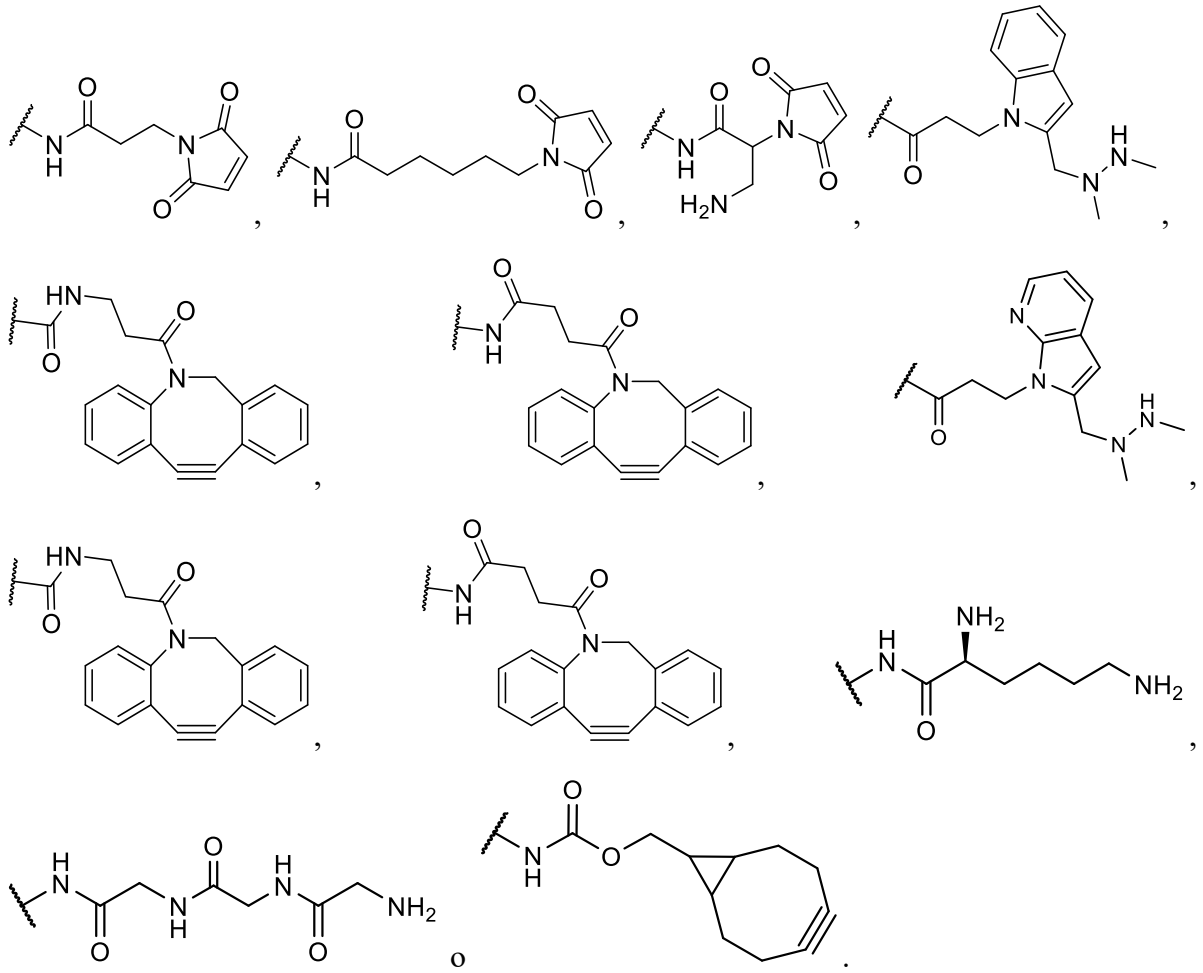
t es de 2 a 18, preferiblemente de 8 a 12.

u es al menos 1, preferiblemente 10;

v es de 4 a 24.

w es de 2 a 24.

16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en donde A es



17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, en donde

Cg^1 es un grupo alquino y Cg^2 es un grupo azida o

Cg^1 es un grupo amina primaria o secundaria y Cg^2 es un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster de N-hidroxisuccinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo o éster de N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo o grupo amida.

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, en donde

Cg^3 es un grupo alquino y Cg^4 es un grupo azida;

Cg^3 es un grupo azida y Cg^4 es un grupo alquino;

Cg^3 es un grupo amina primaria o secundaria y Cg^4 es un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster de N-hidroxisuccinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de

pentafluorofenilo o éster de N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo, amida, carbamato, haluro de carbamoilo o grupo urea; o
Cg^3 es un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster de N-hidroxisuccinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo o éster de N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, halogenuro de acilo, amida, carbamato, halogenuro de carbamoilo o grupo urea y Cg^4 es un grupo amina primaria o secundaria.

19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 18, en donde
Cg^5 es un grupo amina primaria o secundaria y Cg^6 es un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster de N-hidroxisuccinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo o éster de N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo o grupo amida; o
Cg^5 es un ácido carboxílico, éster carboxílico, preferiblemente éster de N-hidroxisuccinimida, éster de tetrafluorofenilo, éster de pentafluorofenilo o éster de N-hidroxiftalimida, anhídrido carboxílico, haluro de acilo o grupo amida y Cg^6 es un grupo amina primaria o secundaria.

20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 19, en donde el grupo amino protector Pg^1 es un grupo carbobenciloxi (Cbz), tert-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetilo (Ac), benzoilo (Bz), bencilo (Bn), p-betoxibencilo (PMB), p-toluenosulfonilo (Ts) o carbamato.

21. Un conjugado de fármaco de unión a diana que comprende al menos un producto de reacción del compuesto enlazador modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un grupo reactivo correspondiente de una fracción de unión a diana, donde dicho al menos un producto de reacción es el producto de una reacción entre A del compuesto enlazador modular y el grupo reactivo correspondiente de la fracción de unión a diana y une covalentemente el compuesto enlazador modular a la fracción de unión a diana, preferiblemente el grupo reactivo correspondiente de la fracción de unión a diana es un grupo tiol.

22. El conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con la reivindicación 21 que

comprende más de uno de dichos productos de reacción de tal manera que más de un compuesto enlazador modular, preferiblemente entre 2 y 10, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, se acopla a dicha fracción de unión a diana.

23. El conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con la reivindicación 21 o la reivindicación 22, en donde la fracción de unión a diana reconoce y se une específicamente a una secuencia diana o epítopo de un antígeno, preferiblemente la fracción de unión a diana es:
– un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal;
– un fragmento funcional de anticuerpo o un derivado de anticuerpo, tal como un fragmento variable de cadena única (scFv), un fragmento de unión a antígeno, como un fragmento Fab, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab')2 o un constructo de anticuerpo bi- o tri-específico;
– un diacuerpo,
– un anticuerpo contra camélidos,
– un anticuerpo de dominio,
– un nanocuerpo,
– un homodímero bivalente con dos cadenas que consisten en scFvs,
– un anticuerpo de tiburón,
– un anticuerpo compuesto por secuencias marco de primates del nuevo mundo más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de primates que no son del nuevo mundo o
– un constructo dimerizado que comprende un dominio de cadena pesada constante 3 (CH_3), una cadena ligera variable (V_L) y una cadena pesada variable (V_H)
– un TCR.

24. El conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en donde la fracción de unión a diana reconoce y se une específicamente a una secuencia o epítopo diana de Guanilato Ciclasa C (GUCY2C), Clúster de Diferenciación 33 (CD33), Clúster de Diferenciación 30 (CD30), Clúster de Diferenciación (CD5), Clúster de Diferenciación 20 (CD20), Clúster de Diferenciación 45 (CD45), Clúster de Diferenciación 117 (CD117 / c-Kit), Clúster de Diferenciación 123 (CD123 / IL3RA), Clúster de Diferenciación 137 (CD137 / 4-1BB), Clúster de Diferenciación 269 (CD269 / antígeno de maduración de células B, BCMA), claudina 18,2, CEA (antígeno

carcinoembrionario), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), DKK1 (proteína 1 relacionada con Dickkopf), glypican-3, muscina-1 (MUC-1 / CD227), mucina 5AC (MUC5AC), anhidrasa carbónica 9 (CAIX), receptor 1 de quimiocinas con fracción C-X-C (CXCR1, CD181), receptor 2 de quimiocinas con fracción C-X-C (CXCR2 / CD182), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), Clúster de Diferenciación 22 (CD22), Clúster de Diferenciación 79b (CD79b), Molécula de adhesión celular nectina 4 (Nectin 4), Transductor de señal de calcio asociado a tumores 2 (Trop-2), Clúster de Diferenciación 19 (CD19), Ligando 3 similar a Delta (DLL3), Glicoproteína transmembrana NMB (gpNMB), Antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met, CD 151), Miembro 6 de la familia 39 de transportadores de solutos (LIV-1), Receptor de folato 1 (FOLR1), clúster de diferenciación 56 (CD56), clúster de diferenciación 138 (CD138), mesotelina, anhidrasa carbónica 6 (CA6), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), clúster de diferenciación 37 (CD37) o miembro 3 de la familia de la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP3).

25. El conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, donde la fracción de unión a diana es una cualquiera de Adecatumumab (anti-EpCam), Amatuximab, (anti-mesotelina), Amivantamab (anti-EGFR), Besilesomab (anti-CEA), blinatumomab (anti-CD19), brentuximab (anti-CD30), Cantuzumab, Cibisatamab (anti-CEACAM5), Cirmtuzumab (anti-ROR1), cetuximab (anti-EGFR), Clivatuzumab (anti-MUC1), Gatipotuzumab (anti-MUC1), Coltuximab (anti-CD19), Daratumumab (anti-CD38), Duligotuzumab (anti-ERBB3), Edrecolomab (anti-EpCam), Enfortumab (anti-Nectina-4), Enoblituzumab (anti-CD276), Ensituximab (anti-MUC5AC), Epratuzumab (anti-CD22), Farletuzumab (anti-FOLR1), Igovomab (anti-CA-125), Inebilizumab (anti-CD19), Iratumumab (anti-CD30), Labetuzumab (anti-CEA), Margetuximab (anti-HER2/neu), Matuzumab (anti-EGFR), Modotuximab (anti-EGFR dominio extracelular III), Naptumomab (anti-5T4), Naratuximab (anti-CD37), Necitumumab (anti-EGFR), Nimotuzumab (anti-EGFR), Obinutuzumab (anti-CD20), Ocaratuzumab (anti-CD20), Ocrelizumab (anti-CD20), Ofatumumab (anti-CD20), Otlertuzumab (anti-CD37), Ontuxizumab (anti-TEM1), Pertuzumab (anti-HER2/neu), Polatuzumab (anti-CD79b), Rituximab (anti-CD20), Rovalpituzumab (anti-DLL3), Sacituzumab (anti-TROP-2),

Seribantumab (anti-ERBB3/HER3), Tafasitamab (anti-CD19), Tetulomab (anti-CD37), Timigutuzumab (anti-HER2), Trastuzumab (anti-HER2), Ublituximab (anti-CD20) o Zolbetuximab (anti-Claudina 18,2).

26. El conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la fracción de unión a diana se modificó genéticamente para albergar una sustitución de cisteína en cada una de sus cadenas pesadas seleccionada de A118C, S239C o D265C (según el sistema de numeración de la UE), preferiblemente D265C, donde dicha fracción de unión a diana se conjuga con al menos un compuesto enlazador modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 a través de uno o más de los residuos de cisteína modificados de dicha fracción de unión a diana.

27. El conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26 para su uso como medicamento, preferiblemente para su uso en el tratamiento del cáncer.

28. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26.

29. Uso del compuesto enlazador modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la fabricación de un conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23.

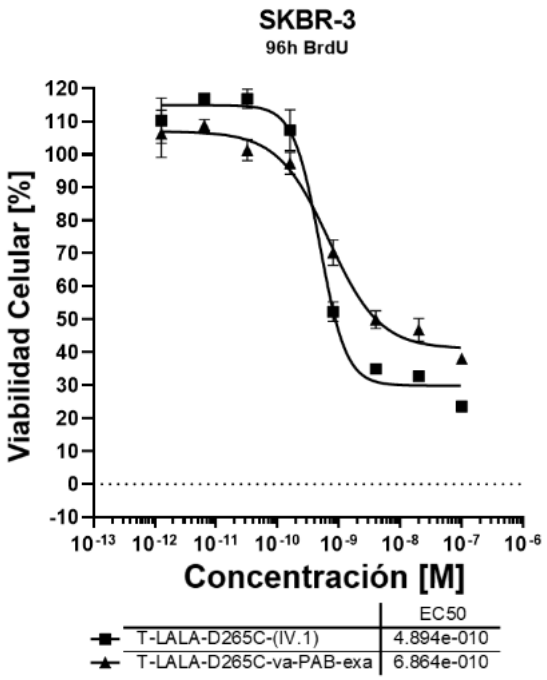
30. Un método para tratar el cáncer, en donde el método comprende administrar el conjugado de fármaco de unión a diana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 a un sujeto que lo necesite.

Resumen

La presente invención se refiere a compuestos enlazadores modulares para conjugados de fármacos de unión a dianas (TBDC) y en particular a compuestos enlazadores modulares para conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). La invención se refiere además a métodos de síntesis del compuesto enlazador modular, a conjugados de fármacos de unión a dianas que comprenden el compuesto enlazador modular de la invención así como a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos conjugados de fármacos de unión a dianas de la invención. Las modalidades de la invención se desarrollaron particularmente como conjugados de fármacos de unión a dianas para su uso en el tratamiento del cáncer y se describirán a continuación con referencia a esta solicitud. Sin embargo, se apreciará que la invención no está limitada a este campo de uso particular.

Figura 1

A


SKBR-3
96h BrdU
Viabilidad Celular [%]
Concentración [M]
EC50
T-LALA-D265C-(IV.1) 4.894e-010
T-LALA-D265C-va-PAB-exa 6.864e-010

B

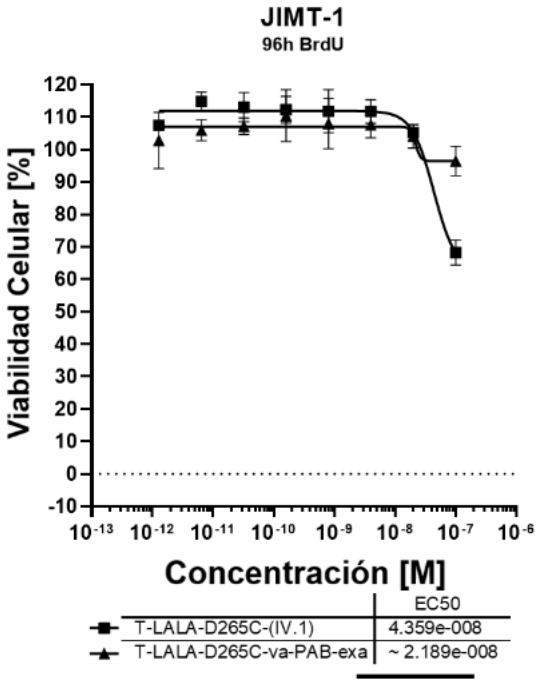
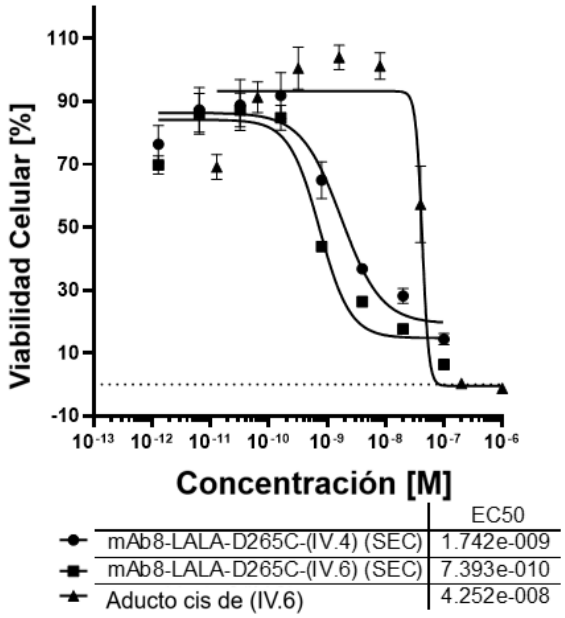

JIMT-1
96h BrdU
Viabilidad Celular [%]
Concentración [M]
EC50
T-LALA-D265C-(IV.1) 4.359e-008
T-LALA-D265C-va-PAB-exa ~ 2.189e-008

Figura 2

A


Viabilidad Celular [%]
110
90
70
50
30
10
-10
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
Concentración [M]
EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.4) (SEC) 1.742e-009
mAb8-LALA-D265C-(IV.6) (SEC) 7.393e-010
Aducto cis de (IV.6) 4.252e-008

B

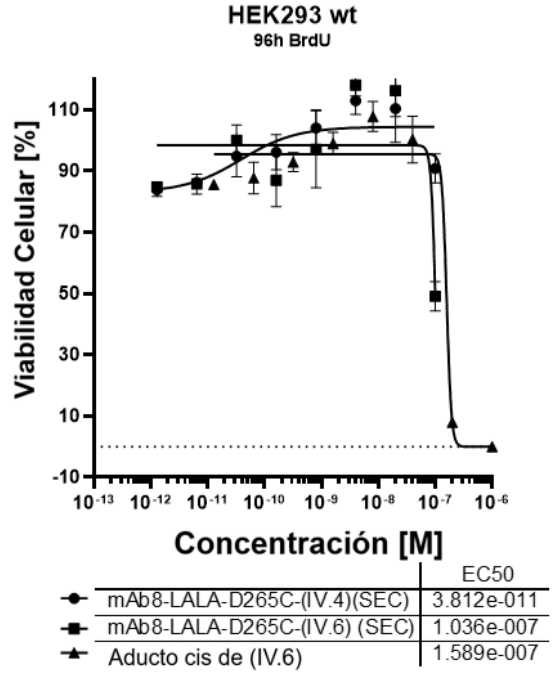
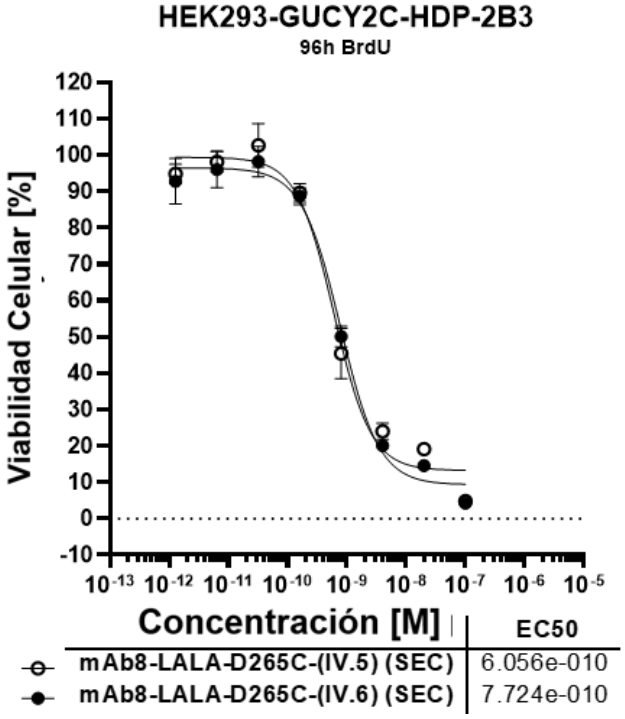

HEK293 wt
96h BrdU
Viabilidad Celular [%]
110
90
70
50
30
10
-10
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
Concentración [M]
EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.4)(SEC) 3.812e-011
mAb8-LALA-D265C-(IV.6) (SEC) 1.036e-007
Aducto cis de (IV.6) 1.589e-007

Figura 3

A


HEK293-GUCY2C-HDP-2B3
96h BrdU
Viabilidad Celular [%]
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
Concentración [M]
EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.5) (SEC) 6.056e-010
mAb8-LALA-D265C-(IV.6) (SEC) 7.724e-010

B

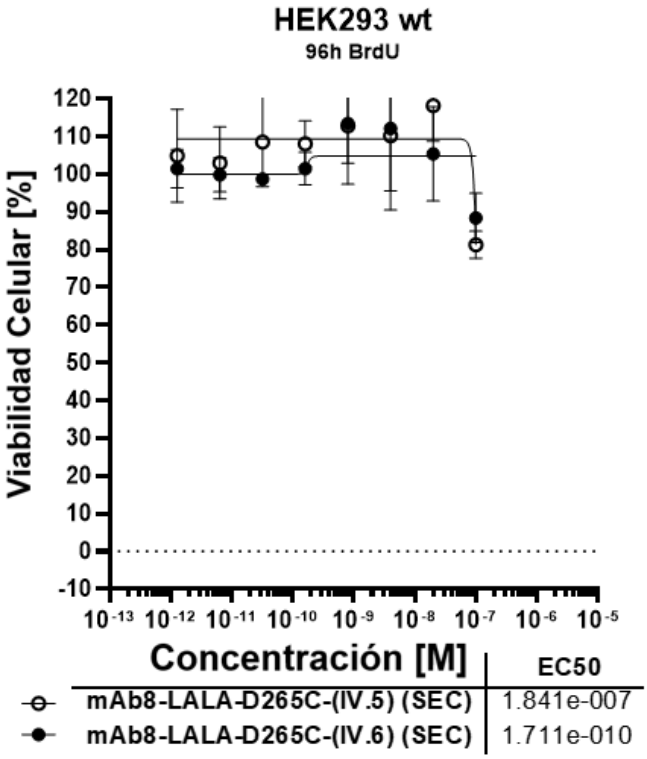
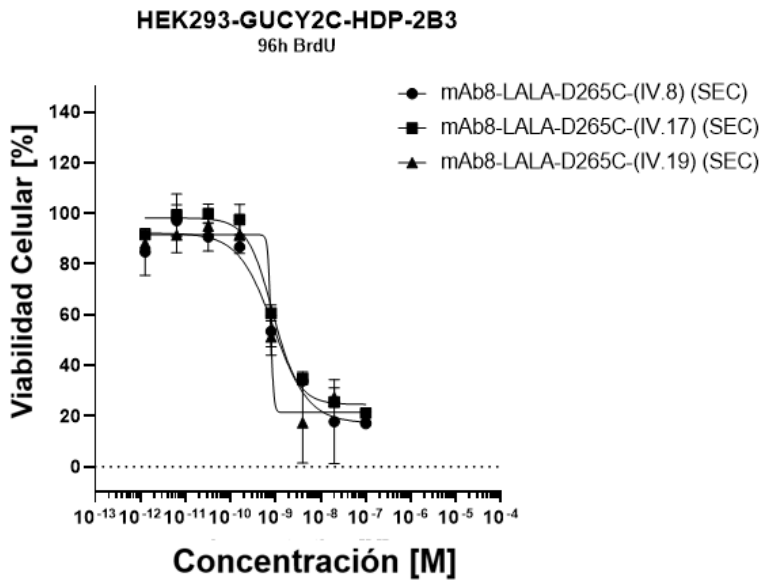

HEK293 wt
96h BrdU
Viabilidad Celular [%]
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
Concentración [M]
EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.5) (SEC) 1.841e-007
mAb8-LALA-D265C-(IV.6) (SEC) 1.711e-010

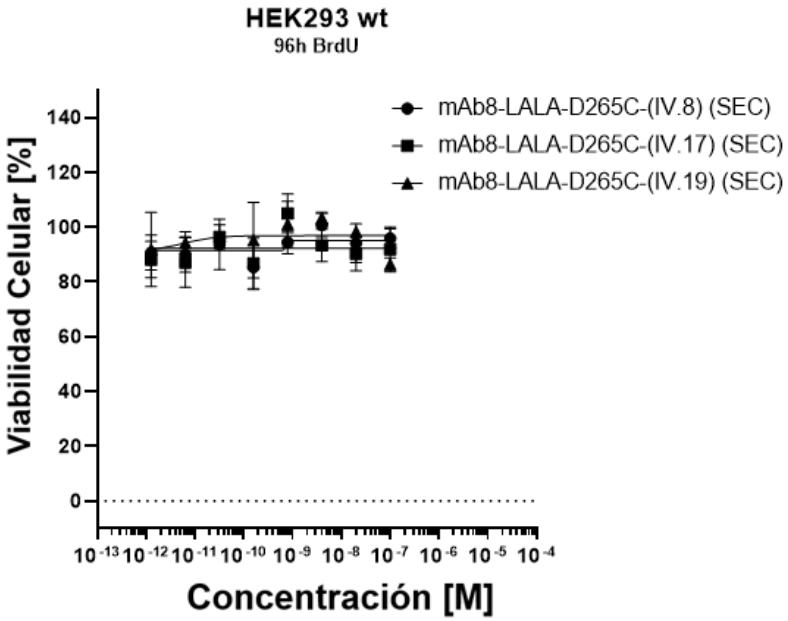
Figura 4

A



	EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.8) (SEC)	9.139e-010
mAb8-LALA-D265C-(IV.17) (SEC)	8.532e-010
mAb8-LALA-D265C-(IV.19) (SEC)	7.825e-010

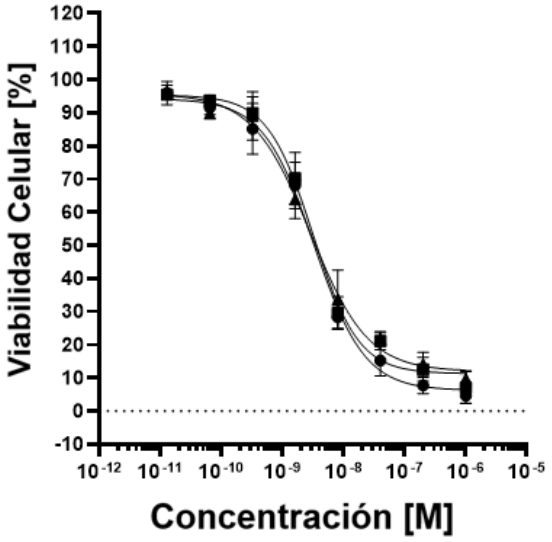
B



	EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.8) (SEC)	N/A
mAb8-LALA-D265C-(IV.17) (SEC)	N/A
mAb8-LALA-D265C-(IV.19) (SEC)	N/A

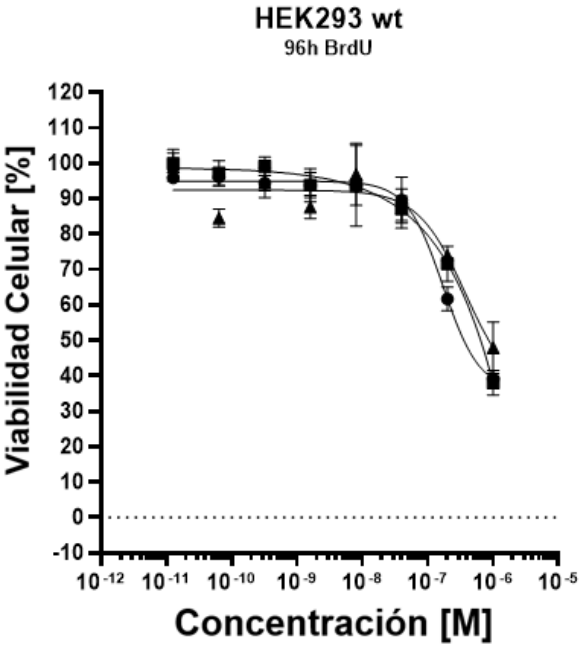
Figura 5

A



	EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.9)	3.252e-009
mAb8-LALA-D265C-(IV.12)	3.136e-009
mAb8-LALA-D265C-(IV.18)	2.837e-009

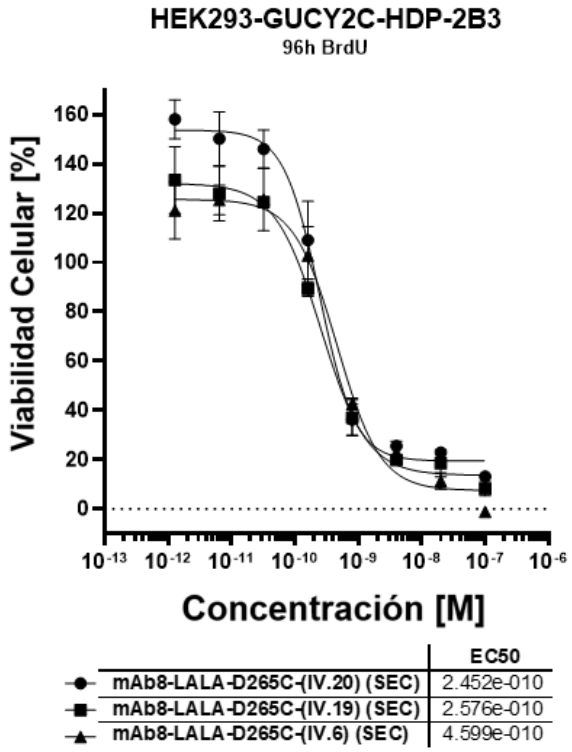
B



	EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.9)	1.717e-007
mAb8-LALA-D265C-(IV.12)	0.07738
mAb8-LALA-D265C-(IV.18)	3.760e-007

Figura 6

A


HEK293-GUCY2C-HDP-2B3
96h BrdU
Viabilidad Celular [%]
160
140
120
100
80
60
40
20
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
Concentración [M]
EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.20) (SEC) 2.452e-010
mAb8-LALA-D265C-(IV.19) (SEC) 2.576e-010
mAb8-LALA-D265C-(IV.6) (SEC) 4.599e-010

B

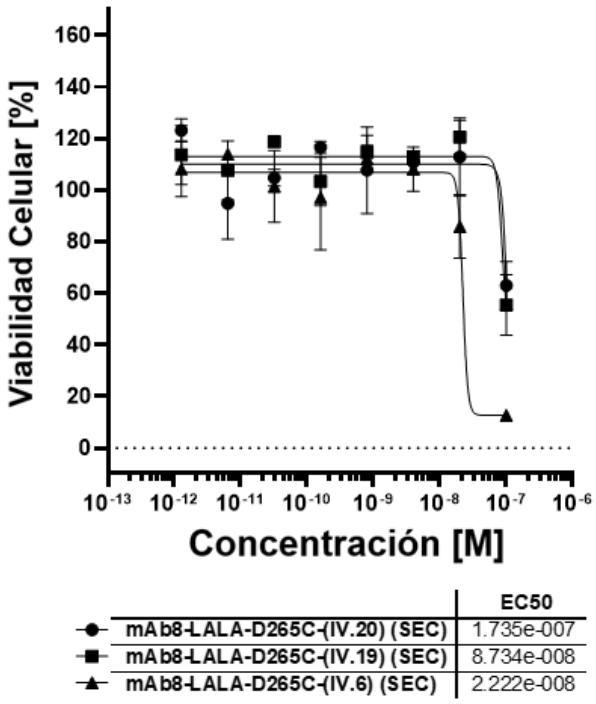
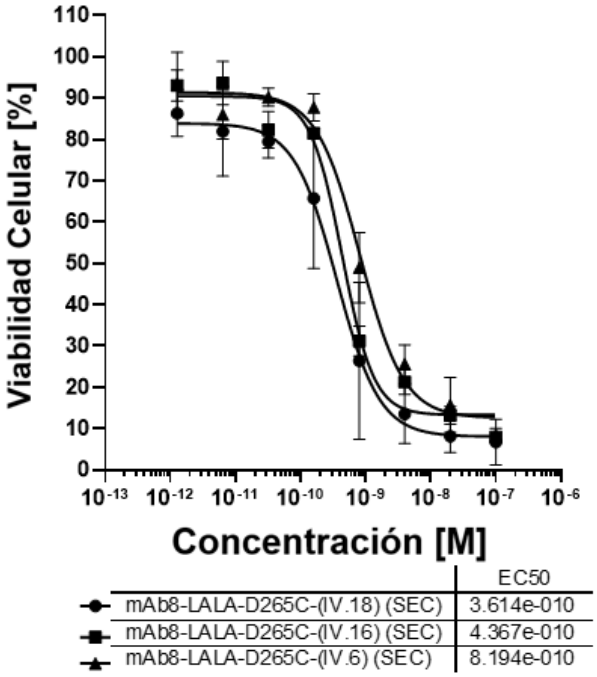

Viabilidad Celular [%]
160
140
120
100
80
60
40
20
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
Concentración [M]
EC50
mAb8-LALA-D265C-(IV.20) (SEC) 1.735e-007
mAb8-LALA-D265C-(IV.19) (SEC) 8.734e-008
mAb8-LALA-D265C-(IV.6) (SEC) 2.222e-008

Figura 7

A



B

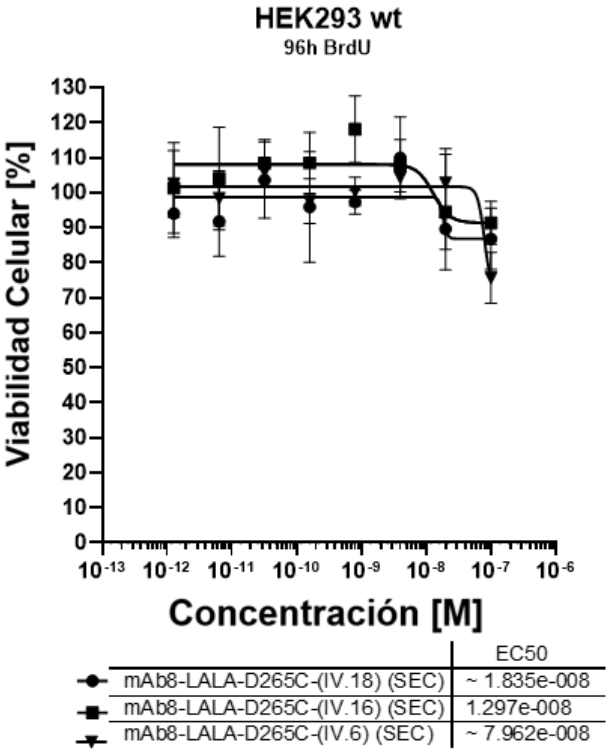


Fig. 7

Figura 8

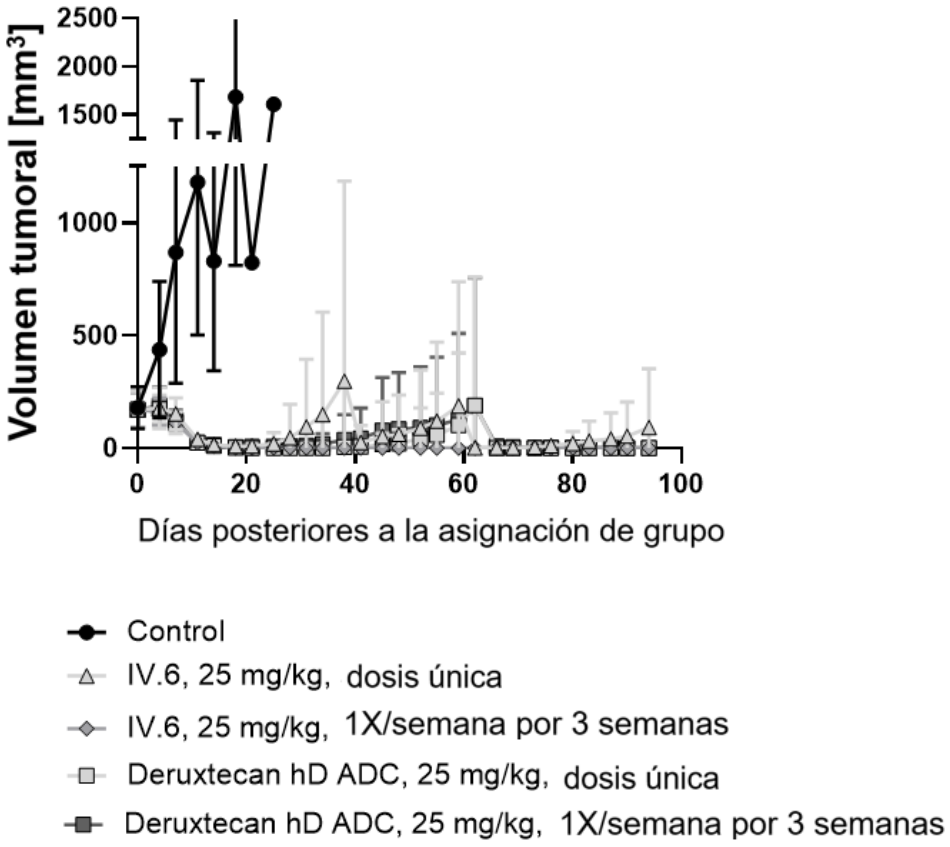


Figura 9

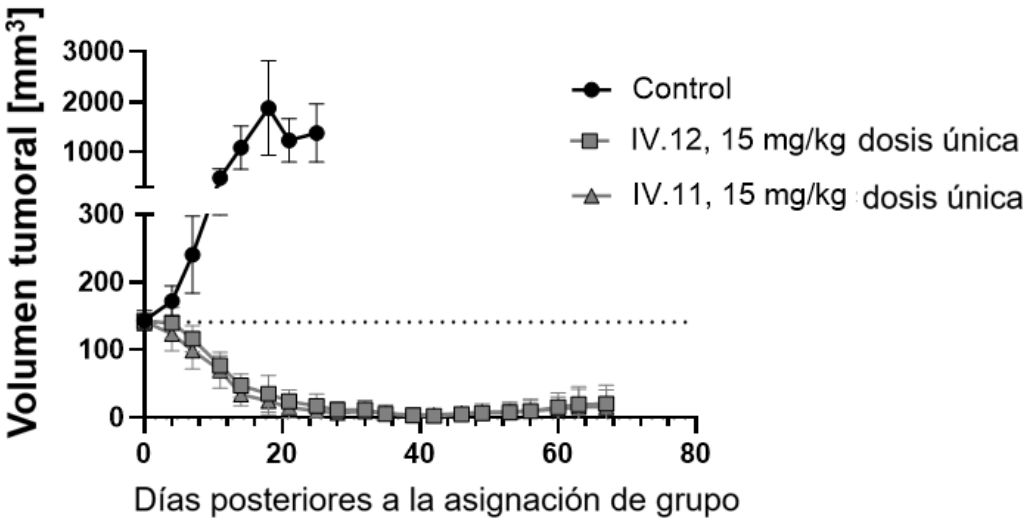


Figura 10

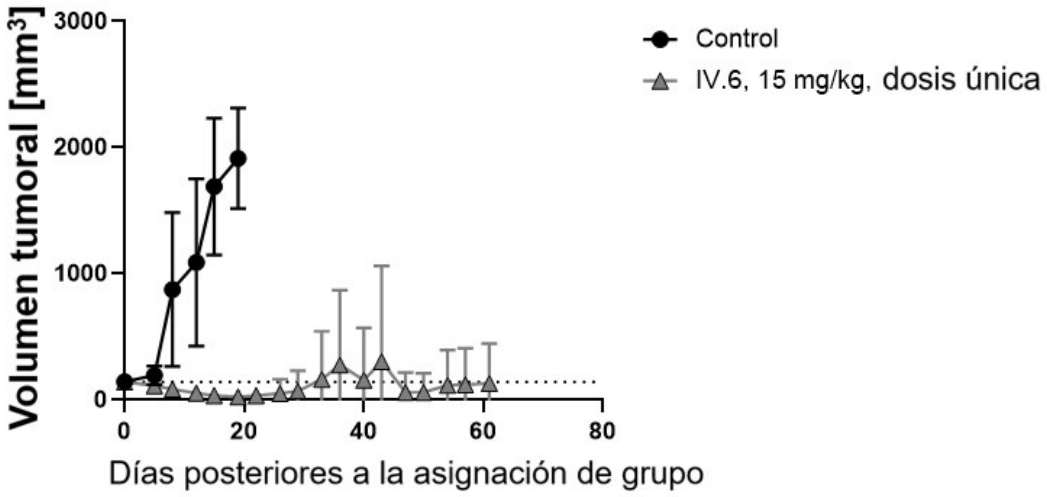


Figura 11

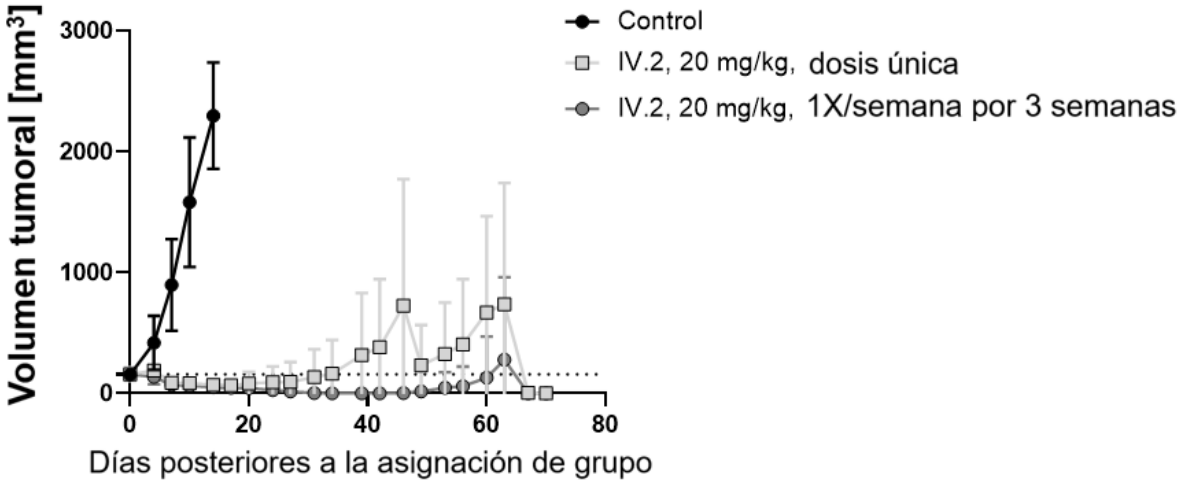


Figura 12

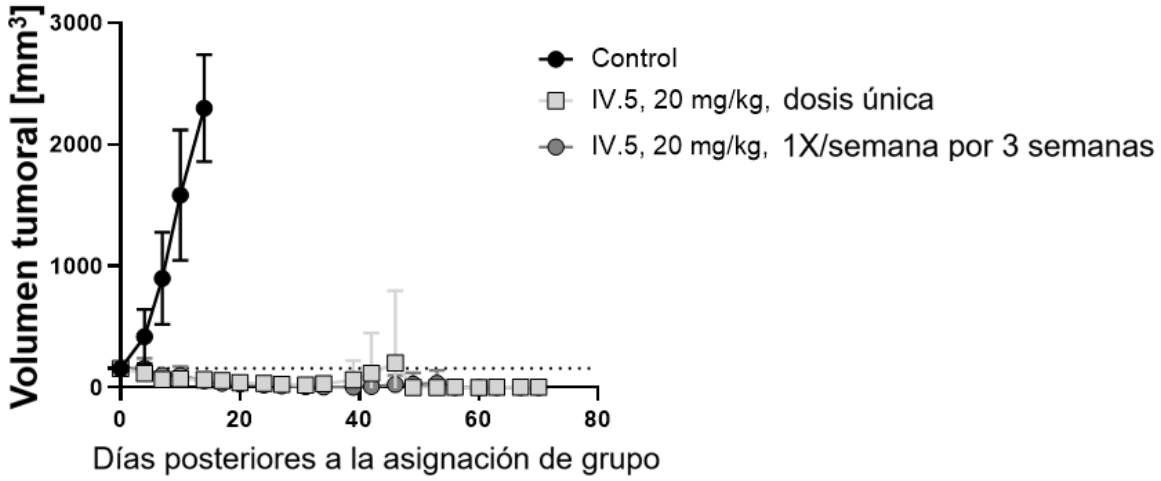


Figura 13

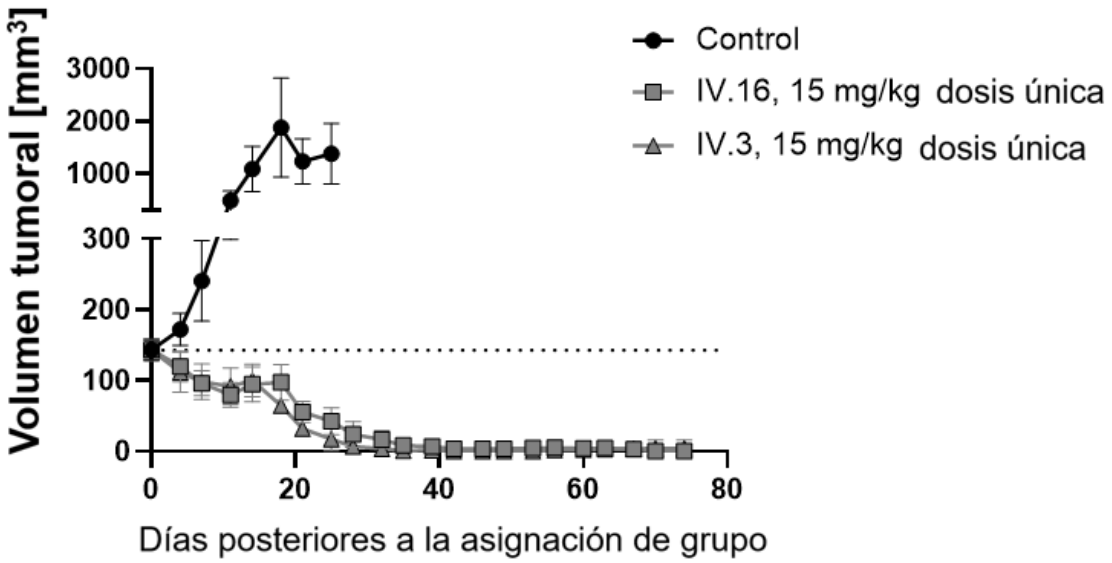


Figura 14

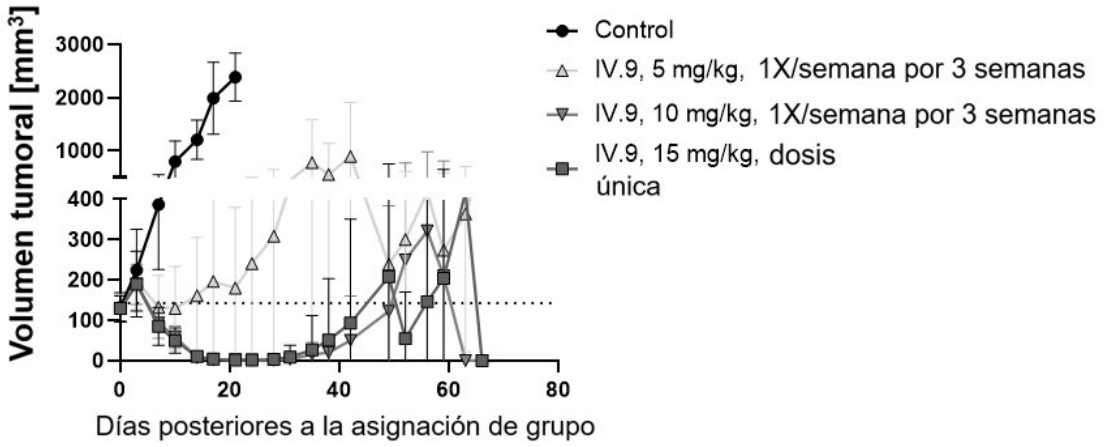


Figura 15

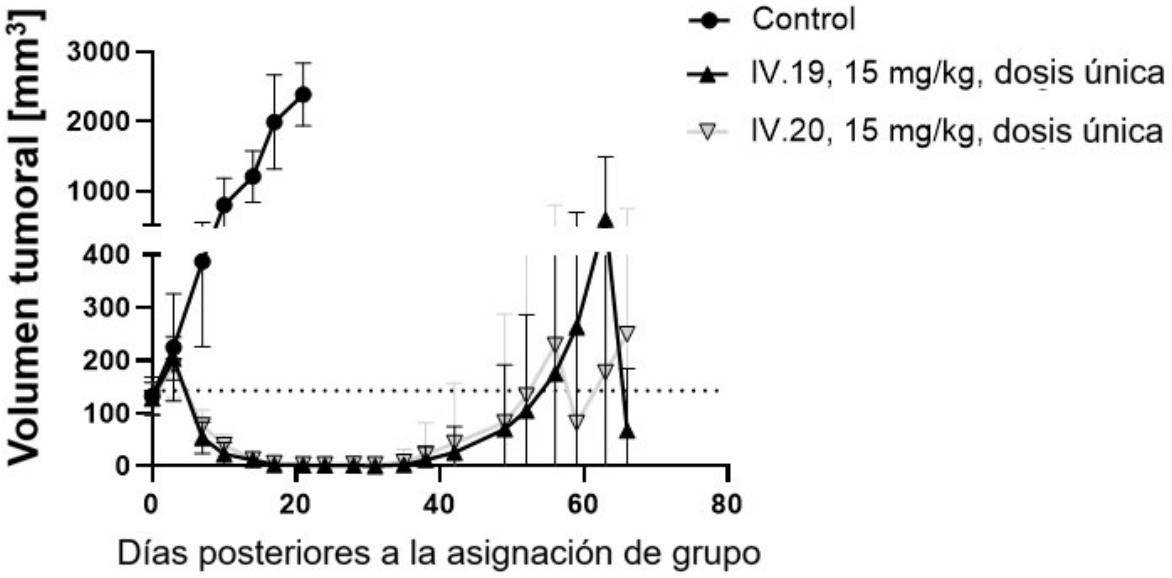


Figura 16

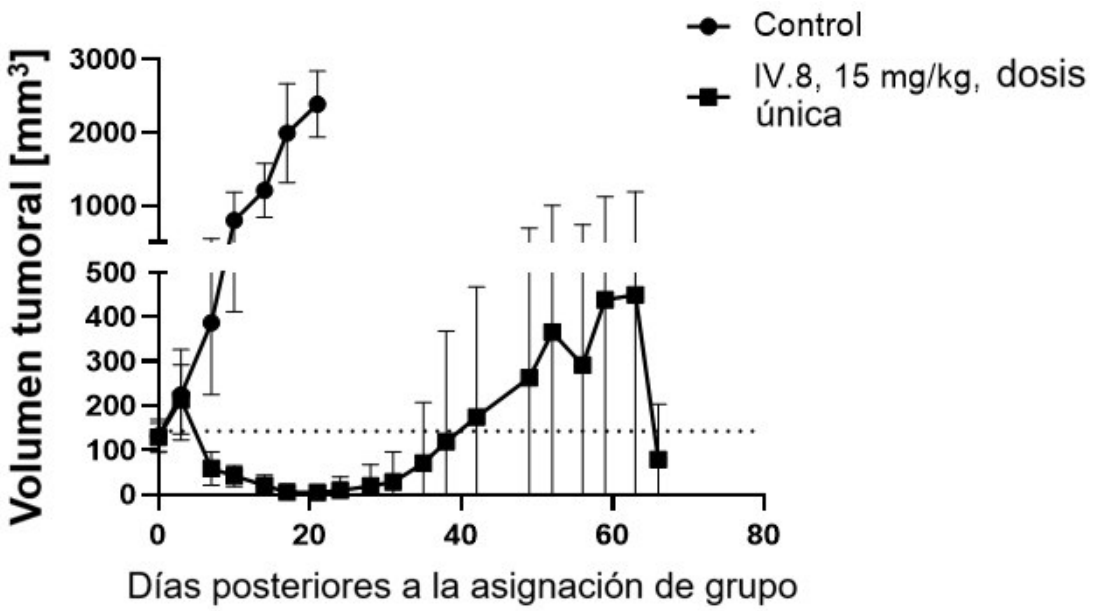


Figura 17

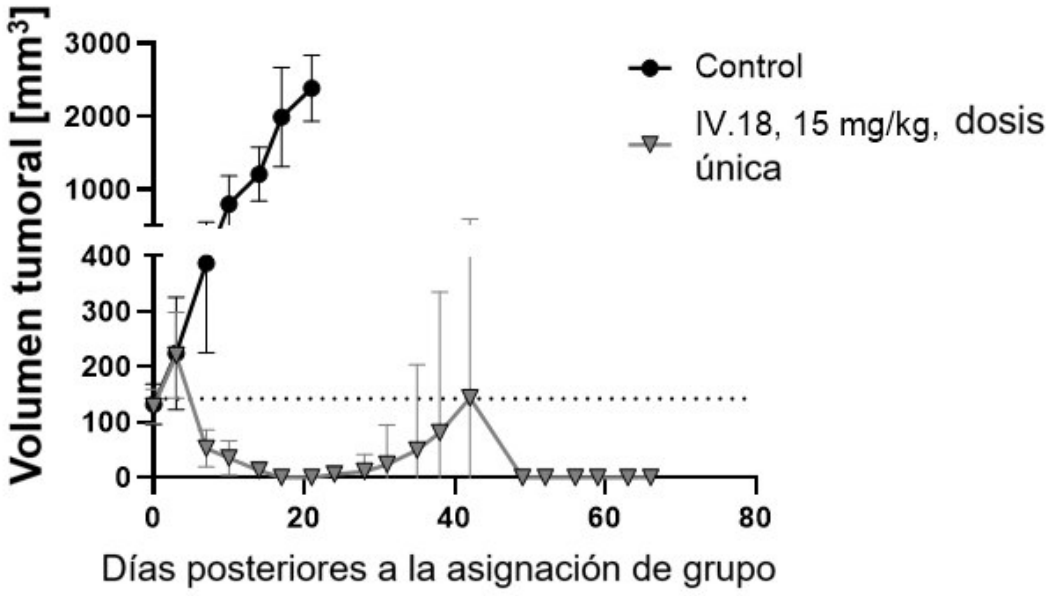


Figura 18

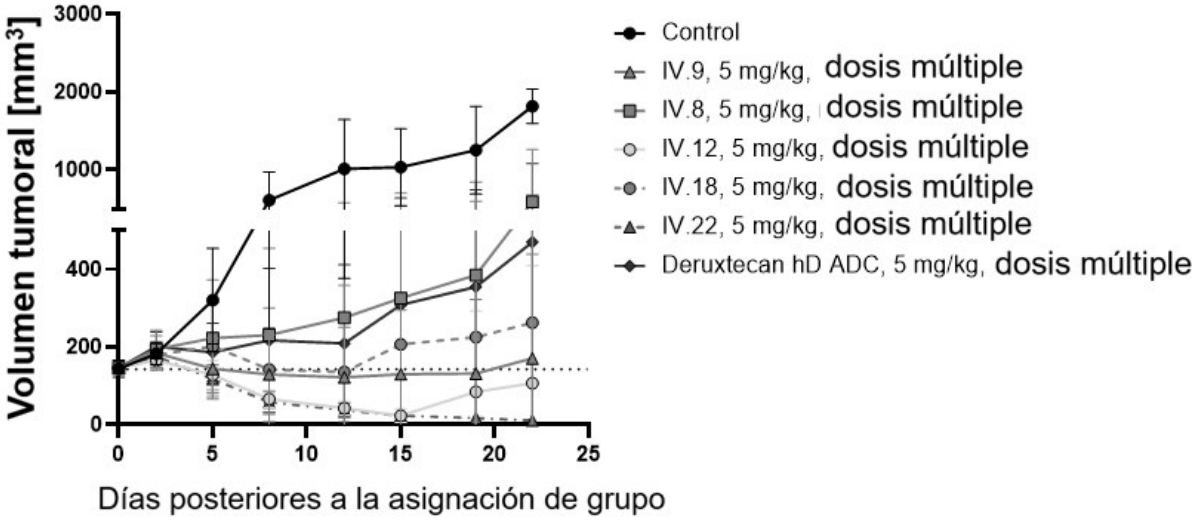


Figura 19

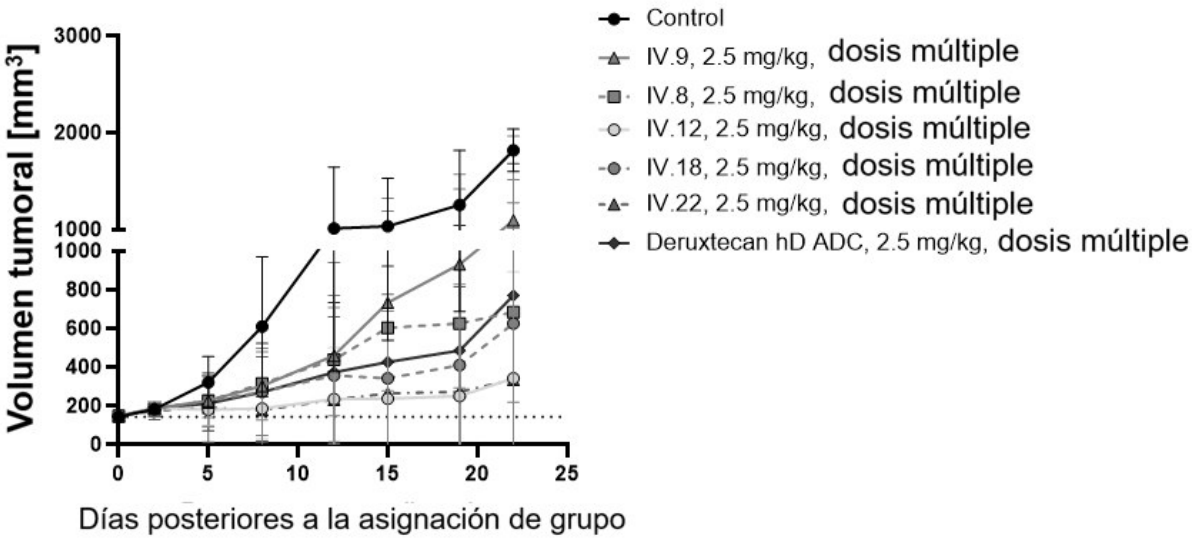


Figura 20

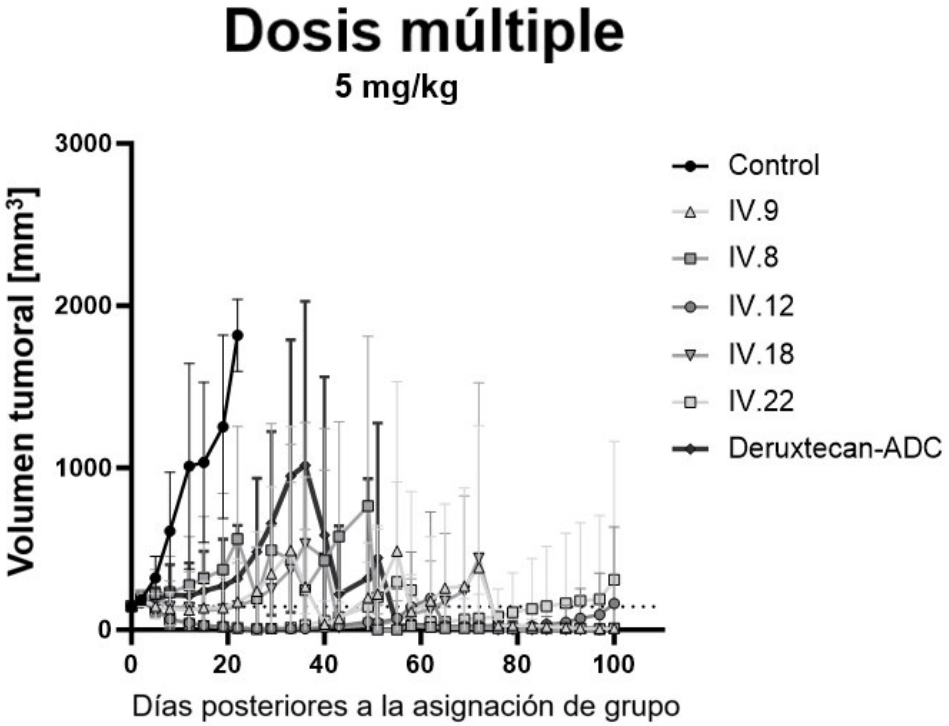

Dosis múltiple
5 mg/kg
Volumen tumoral [mm³]
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
Días posteriores a la asignación de grupo
Control
IV.9
IV.8
IV.12
IV.18
IV.22
Deruxtecan-ADC

Figura 21

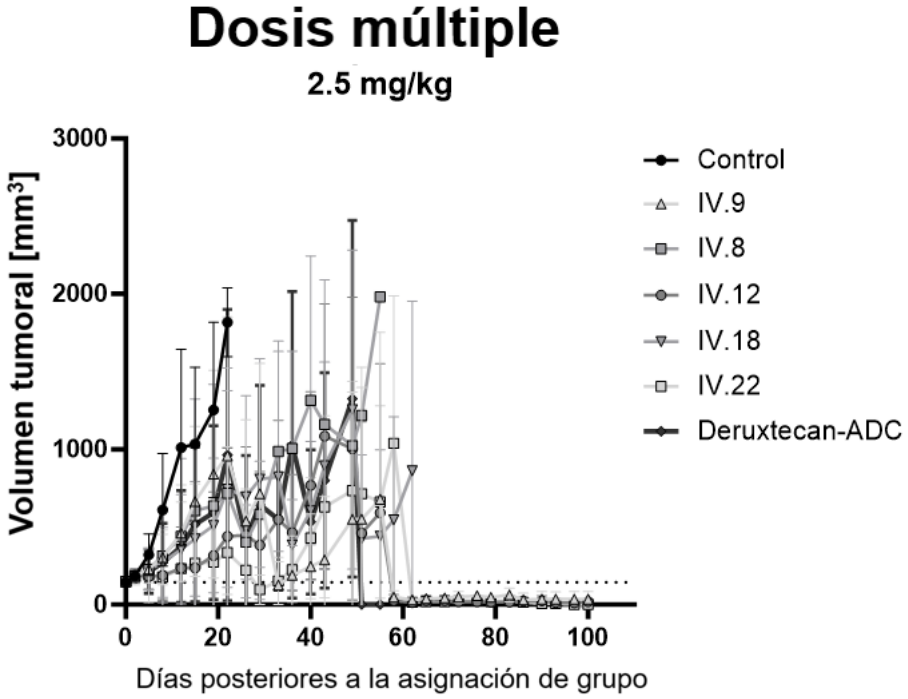

Dosis múltiple
2.5 mg/kg
Volumen tumoral [mm³]
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
Días posteriores a la asignación de grupo
Control
IV.9
IV.8
IV.12
IV.18
IV.22
Deruxtecan-ADC

Figura 22

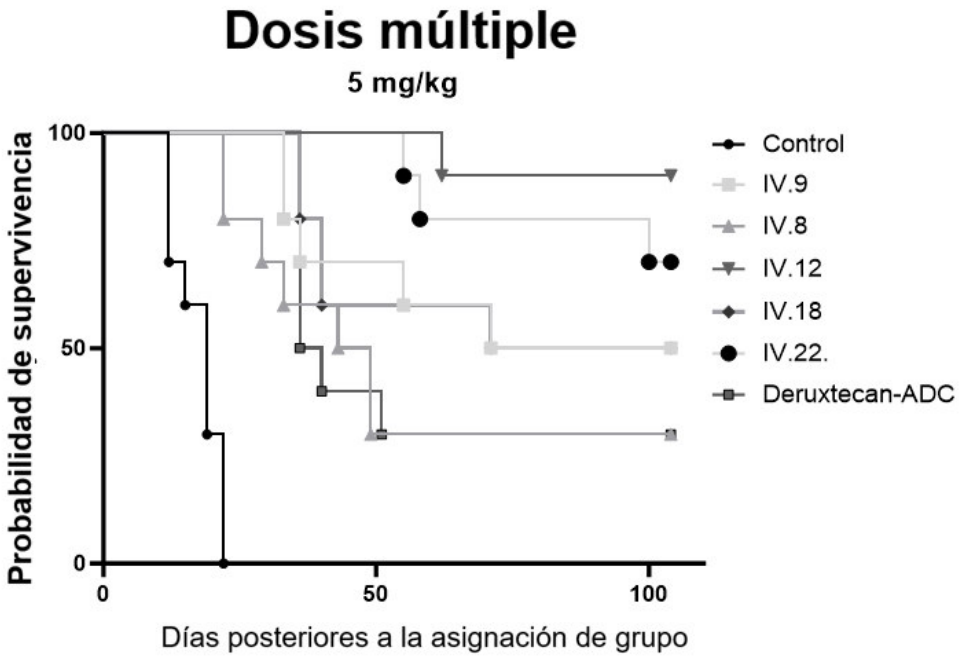

Dosis múltiple
5 mg/kg
Probabilidad de supervivencia
100
50
0
0
50
100
Días posteriores a la asignación de grupo
Control
IV.9
IV.8
IV.12
IV.18
IV.22.
Deruxtecan-ADC

Figura 23

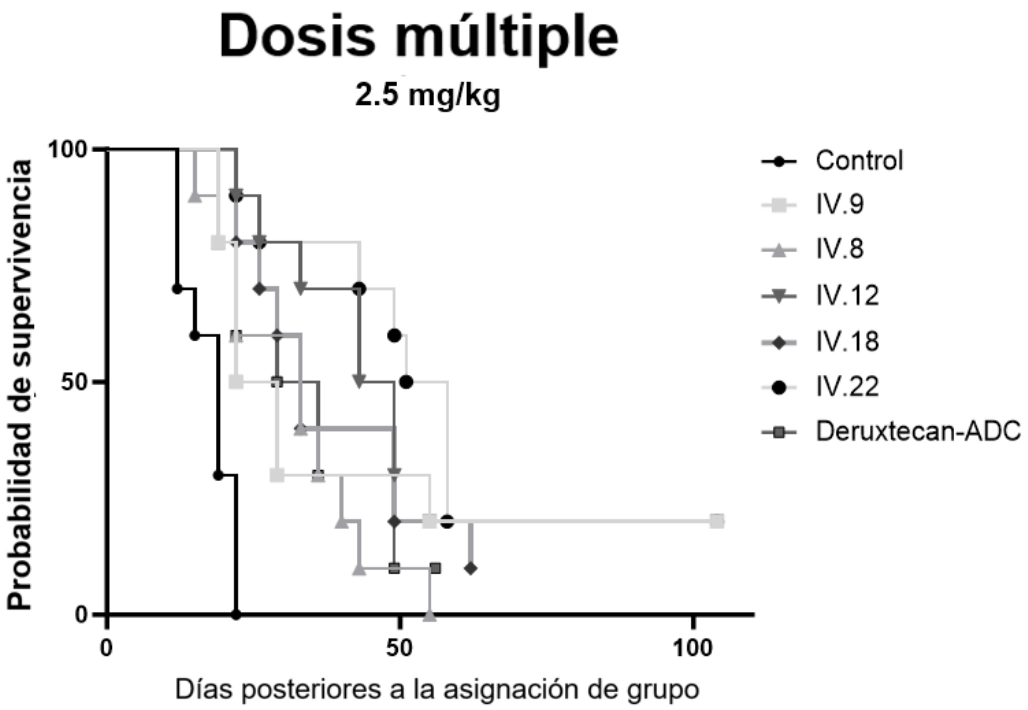

Dosis múltiple
2.5 mg/kg
Probabilidad de supervivencia
100
50
0
0
50
100
Días posteriores a la asignación de grupo
Control
IV.9
IV.8
IV.12
IV.18
IV.22
Deruxtecan-ADC

Figura 24

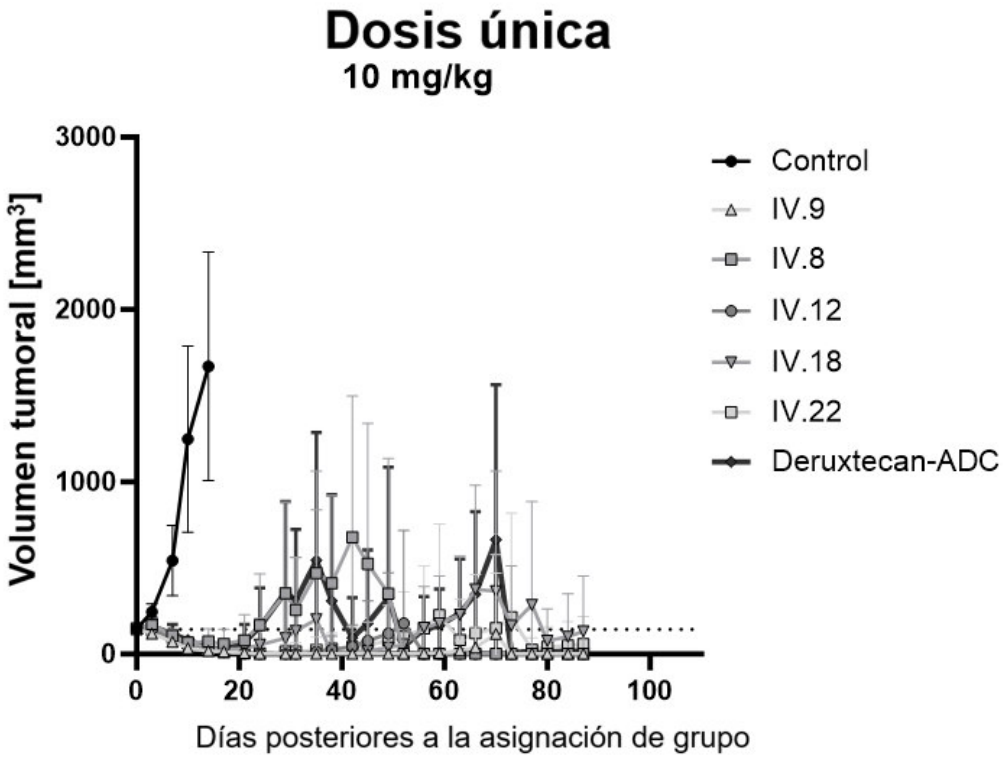

Dosis única
10 mg/kg
Volumen tumoral [mm³]
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
Días posteriores a la asignación de grupo
Control
IV.9
IV.8
IV.12
IV.18
IV.22
Deruxtecan-ADC

Figura 25

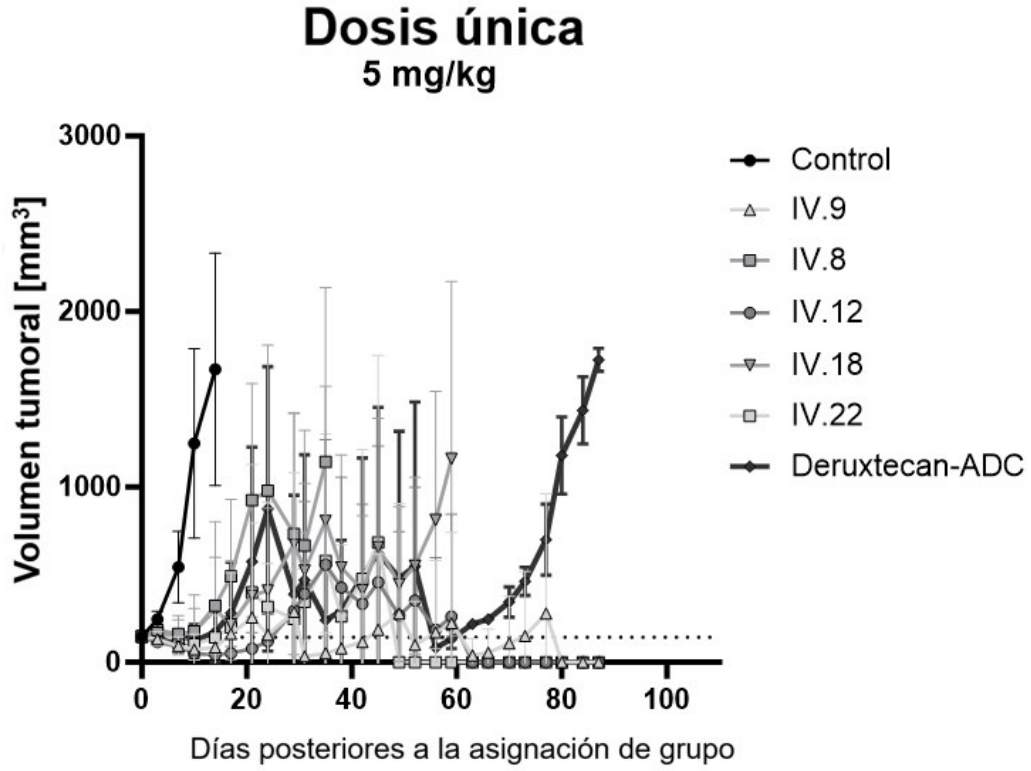

Dosis única
5 mg/kg
Volumen tumoral [mm³]
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
Días posteriores a la asignación de grupo
Control
IV.9
IV.8
IV.12
IV.18
IV.22
Deruxtecan-ADC

Figura 26

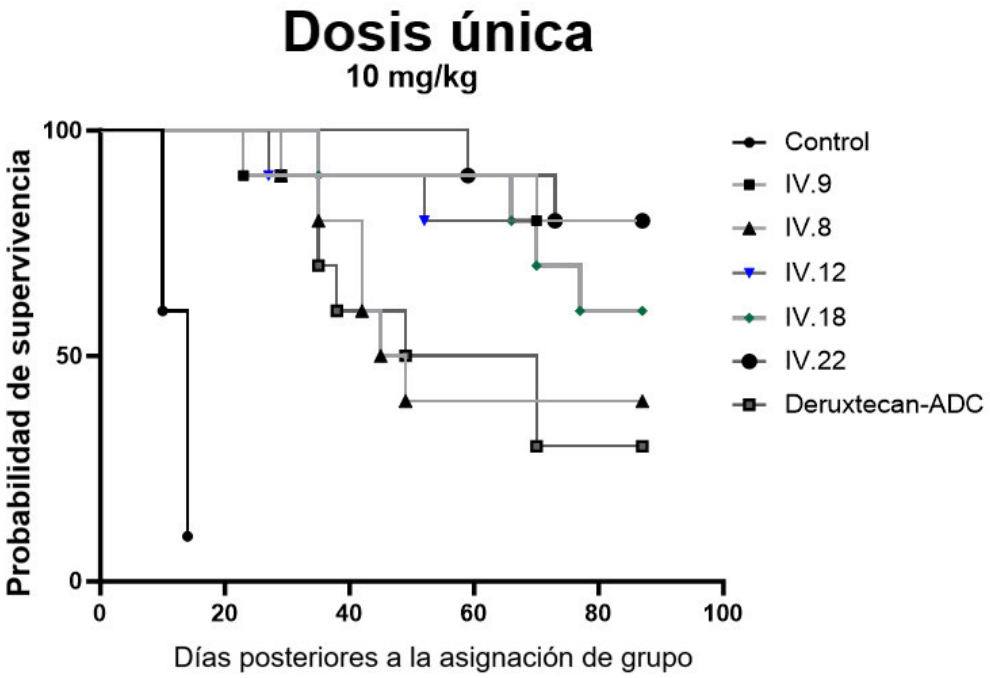

Dosis única
10 mg/kg
Probabilidad de supervivencia
100
50
0
0
20
40
60
80
100
Días posteriores a la asignación de grupo
Control
IV.9
IV.8
IV.12
IV.18
IV.22
Deruxtecan-ADC

Figura 27

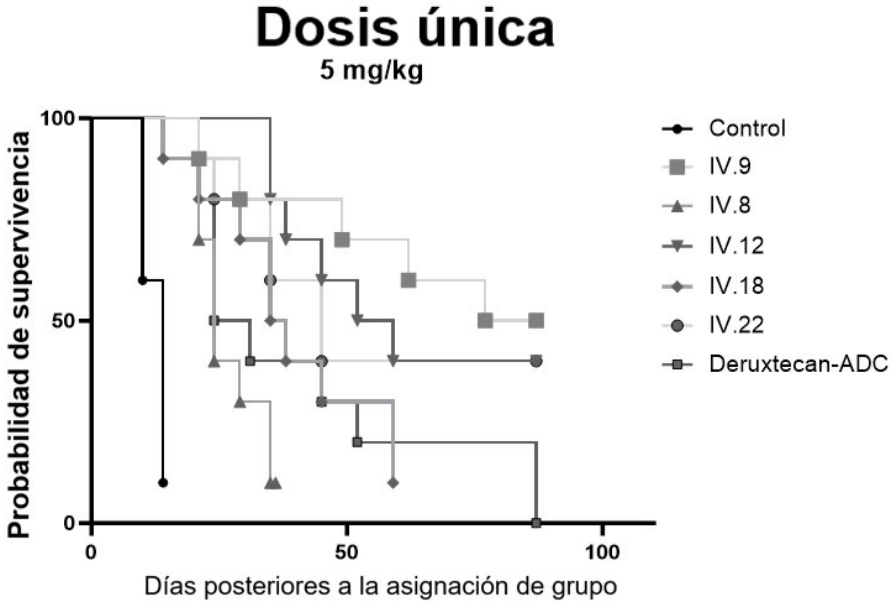

Dosis única
5 mg/kg
Probabilidad de supervivencia
100
50
0
0
50
100
Días posteriores a la asignación de grupo
Control
IV.9
IV.8
IV.12
IV.18
IV.22
Deruxtecan-ADC

Figura 28

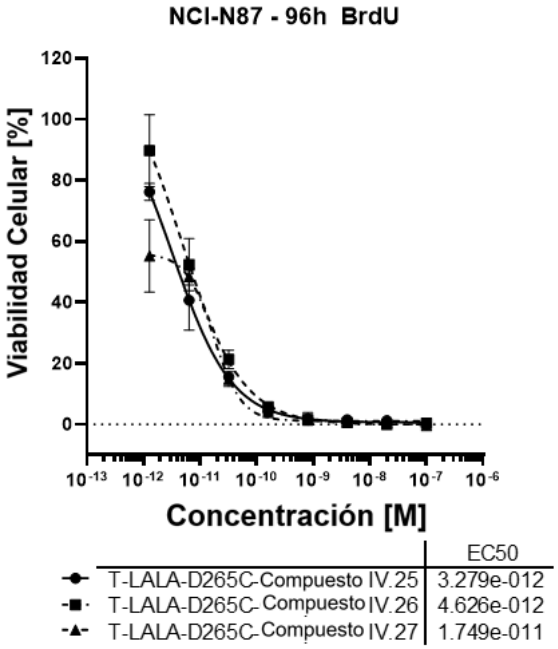

NCI-N87 - 96h BrdU
Viabilidad Celular [%]
120
100
80
60
40
20
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
Concentración [M]
EC50
T-LALA-D265C-Compuesto IV.25 3.279e-012
T-LALA-D265C-Compuesto IV.26 4.626e-012
T-LALA-D265C-Compuesto IV.27 1.749e-011

Figura 29

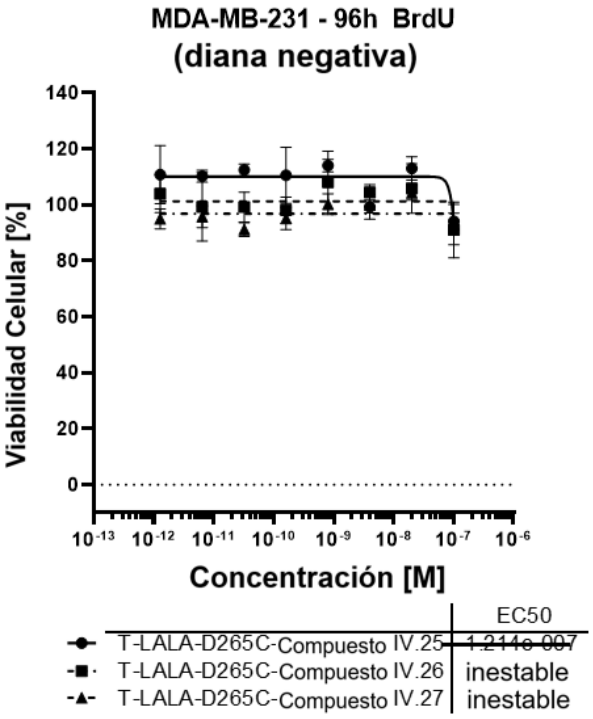

MDA-MB-231 - 96h BrdU
(diana negativa)
Viabilidad Celular [%]
140
120
100
80
60
40
20
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
Concentración [M]
EC50
T-LALA-D265C-Compuesto IV.25 1.214e-007
T-LALA-D265C-Compuesto IV.26 inestable
T-LALA-D265C-Compuesto IV.27 inestable

Figura 30

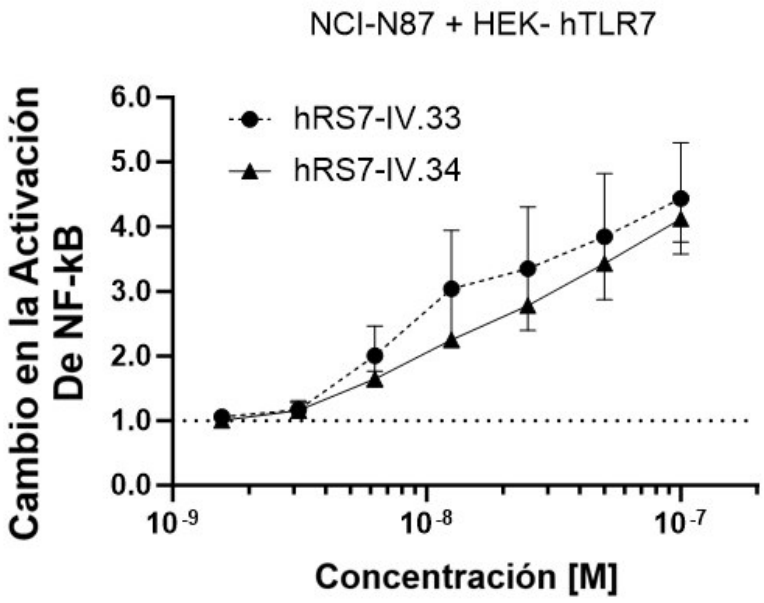

NCI-N87 + HEK- hTLR7
hRS7-IV.33
hRS7-IV.34
Cambio en la Activación De NF-kB
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
10-9
10-8
10-7
Concentración [M]

Figura 31 a

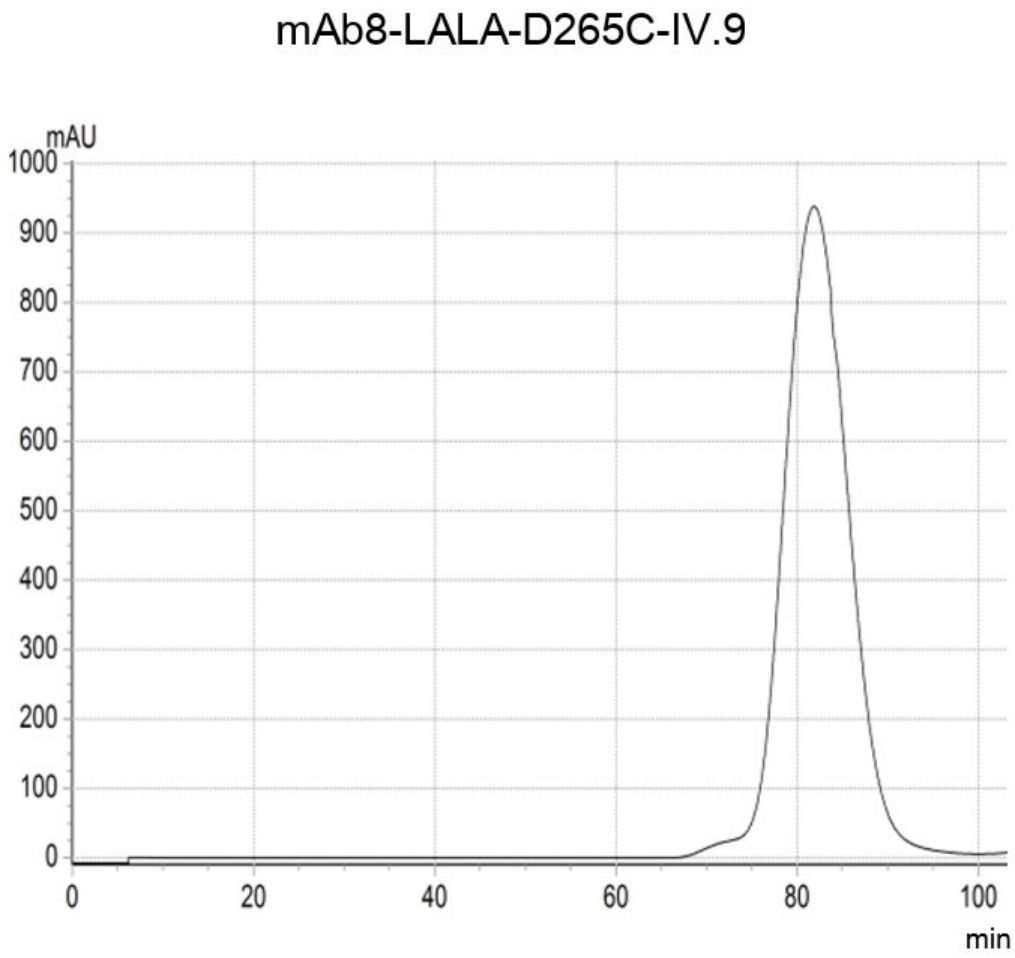
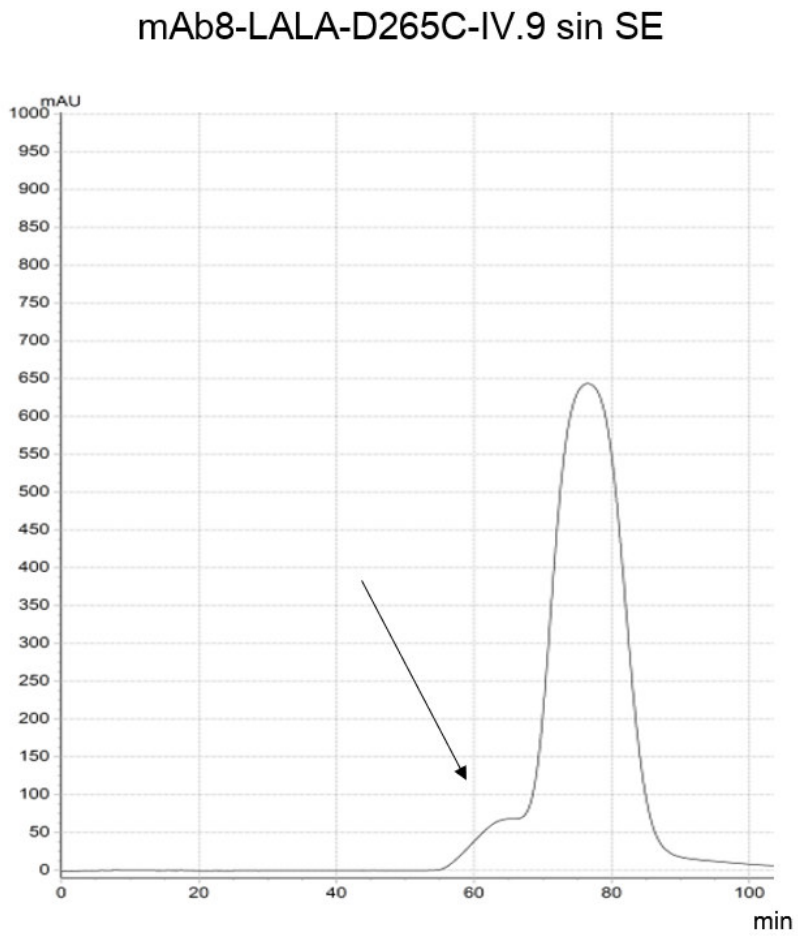

mAb8-LALA-D265C-IV.9
mAU
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
min

Figura 31 b


mAb8-LALA-D265C-IV.9 sin SE
mAU
1000
950
900
850
800
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
min