

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 309**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/64** (2007.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2019 PCT/EP2019/058226**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2019 WO19192979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2019 E 19713507 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024 EP 3773735**

54 Título: **Conjugado de fármaco citotóxico y forma de profármaco de dicho conjugado**

30 Prioridad:

**03.04.2018 EP 18305390**

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

**26.11.2024**

73 Titular/es:

**SYNDIVIA (100.0%)  
8 Allée Gaspard Monge  
67083 Strasbourg, FR**

72 Inventor/es:

**KONIEV, OLEKSANDR;  
KOLODYCH, SERGII y  
BONNEFOY, JEAN-YVES**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 989 309 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conjugado de fármaco citotóxico y forma de profármaco de dicho conjugado

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un conjugado específico de fármacos citotóxicos y a formas de profármaco de dicho conjugado, para su uso en el tratamiento del cáncer y enfermedades inflamatorias.

## 10 Antecedentes técnicos

El cáncer y las enfermedades inflamatorias se encuentran entre las enfermedades más frecuentes en la actualidad. En particular, el cáncer es una de las causas más importantes de muerte en los países industrializados, y el número de personas diagnosticadas con cáncer continúa creciendo en el momento actual.

15 Hasta la fecha se han desarrollado varios modos de tratamiento, sin embargo la quimioterapia sigue siendo el único que se puede usar contra tumores circulantes, tales como linfomas y leucemias, y las metástasis.

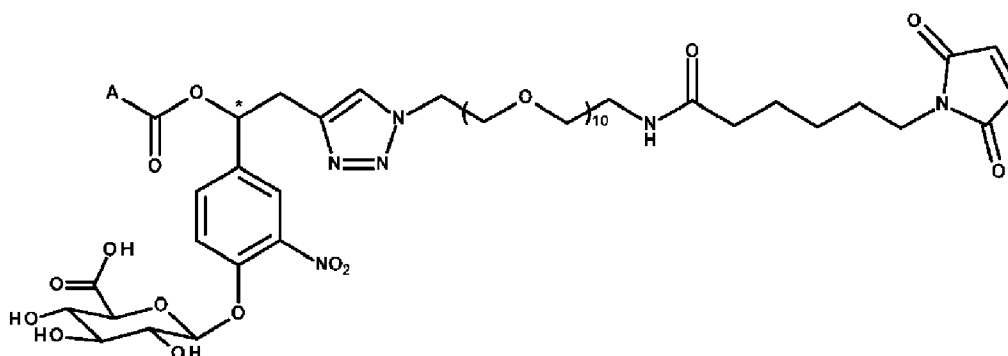
20 En quimioterapia, una estrategia se basa en inhibir la polimerización de tubulina y prevenir así la división celular (antimitóticos). Esto puede lograrse usando compuestos de la familia de la dolastatina, en particular, dolastatina 10 natural, que puede aislarse de la liebre de mar del Océano Índico *Dolabella auricularia* y consiste en cuatro aminoácidos, siendo tres específicos de la misma. También existen derivados sintéticos de dolastatina 10 tales como auristatina PE, auristatina E y monometil auristatina E (MMAE), que han demostrado ser inhibidores eficaces. El principal defecto de dichos compuestos reside en la falta de selectividad hacia las células cancerosas, lo que da como resultado la destrucción de tejidos sanos y, por lo tanto, efectos secundarios intensos, tales como pérdida de cabello o náuseas. El desarrollo de conjugados de proteína-fármaco de dichos principios activos ha surgido como una estrategia elegante y eficaz para superar la falta de selectividad.

30 Los conjugados de proteína-fármaco son, con diferencia, la clase de principios farmacéuticos activos muy potentes de crecimiento más rápido. Los constructos de conjugados de proteína-fármaco generalmente implican una proteína, tal como un anticuerpo, unida covalentemente a un extremo de un grupo enlazador, cuyo otro extremo es una citotoxina, es decir, una toxina citotóxica muy potente. El componente proteico de la biomolécula proporciona especificidad a la diana. Una vez que el conjugado penetra en la célula, la toxina se libera, por ejemplo, por la acción de enzimas celulares. La mayor parte de los conjugados de proteína-fármaco están dirigidos de hecho al tratamiento del cáncer. Además de la trastuzumab emtansina comercializada (denominada T-DM1 o Kadcyla®) y la brentuximab vedotina (Adcetris®), en la actualidad varios conjugados de proteína-fármaco se están sometiendo a ensayos clínicos para una diversidad de indicaciones de cáncer.

40 Uno de los requisitos previos principales para la actividad de dichos conjugados es la liberación eficaz del fármaco citotóxico tras su internalización por células cancerosas, mientras que el enlazador entre la proteína y el fármaco debe ser estable en la circulación sanguínea antes de que el conjugado alcance su diana biológica.

A este respecto, se logró un avance real mediante la introducción de enlazadores escindibles por enzimas en el constructo de conjugado.

45 Así, el documento WO 2015/118497 describe el conjugado de unión a albúmina sensible a la  $\beta$ -glucuronidasa de fórmula (I),



(I),

50 en la que A es normalmente MMAE. Se pretende que su resto maleimida terminal proporcione un acoplamiento selectivo con la albúmina circulante después de su administración intravenosa. Un resto glucurónido, que es sensible

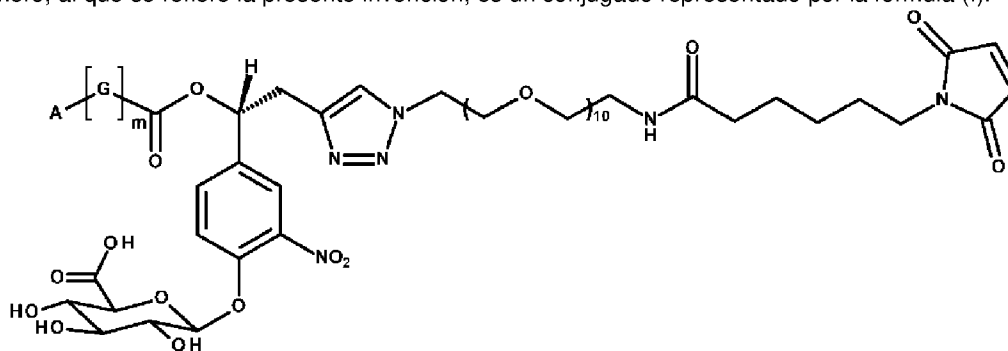
a la glucuronidasa, también está presente en la molécula y está unido a un brazo autorreactivo. Dado que la albúmina se acumula en los tumores y la  $\beta$ -glucuronidasa está presente en el entorno tumoral, el compuesto alcanza el sitio tumoral en el que la enzima cataliza la escisión del enlace glucósido y después desencadena la liberación del fármaco (MMAE). El conjugado se presenta como una mezcla 1:1 de dos isómeros, cuyo centro estereogénico variable se encuentra en el brazo autorreactivo (marcado con una estrella en la fórmula (I)). Legigan et al. (J. Med. Chem 2012, 55, 9, 4516-4520) también describen un racemato de un conjugado particular de fórmula (I) tal como se ha representado anteriormente, y su uso para el tratamiento del cáncer.

#### Sumario de la invención

Los inventores han demostrado que los dos isómeros del conjugado anterior, que no podían separarse por medio de técnicas convencionales, podrían obtenerse a partir de la separación enantiomérica por HPLC de un intermedio temprano. Se demostró que los dos isómeros aislados eran estables, especialmente en plasma humano, pero el isómero cuyo centro estereogénico variable tiene una configuración R mostró una cinética de escisión enzimática superior al otro. Esta cinética superior observada en un isómero es tanto más inesperada dado que el centro estereogénico no forma parte del farmacóforo reconocido por la enzima. Esta característica inesperada puede ser particularmente beneficiosa para pacientes que tienen una expresión enzimática más baja.

Los inventores también han demostrado que la inserción de un resto autoinmolante en la estructura, más específicamente entre el fármaco citotóxico y el resto del conjugado, puede aumentar la estabilidad del conjugado, a la vez que se conserva su capacidad para escindirse (es decir, para liberar el fármaco citotóxico).

Dicho isómero, al que se refiere la presente invención, es un conjugado representado por la fórmula (I):



(I),

en la que

A representa un radical derivado de un fármaco citotóxico,

G es un resto autoinmolante, y

m es 0 o 1,

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

La invención proporciona también un proceso para preparar un conjugado tal como se ha definido anteriormente, que comprende las etapas siguientes

a) preparar *rac*-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol a partir de 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído;

b) separar y aislar (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol, preferentemente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento quiral;

c) hacer reaccionar (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol con un derivado de ácido glucurónico, tal como acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronato de metilo, en condiciones básicas;

d) hacer reaccionar el compuesto obtenido en la etapa (c) con cloroformiato de 4-nitrofenilo;

e) acoplar el compuesto obtenido en la etapa (d) con un fármaco citotóxico o con un resto A-G-H, en el que A representa un radical que se deriva de un fármaco citotóxico y G representa un resto autoinmolable;

f) desproteger el resto glucurónido del compuesto obtenido en la etapa (e), preferentemente en condiciones básicas;

y

g) acoplar el compuesto obtenido en la etapa (f) con una azida de fórmula  $N_3-(CH_2-CH_2-O)_{10}-(CH_2)_2-NH-(CO)-(CH_2)_5-X$ , en la que X es un grupo maleimida.

5 La invención se refiere también a un profármaco que comprende al menos una molécula del conjugado tal como se ha definido anteriormente, estando unida dicha molécula del conjugado mediante un enlace covalente a una molécula proteica, preferentemente albúmina, o un fragmento de la misma, en la que un "profármaco" se refiere a al menos un conjugado unido covalentemente a una macromolécula.

10 Se refiere además a una composición farmacéutica que comprende al menos una cantidad eficaz de al menos un conjugado tal como se ha definido anteriormente o al menos un profármaco tal como se ha definido anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La presente invención se refiere además independientemente a un conjugado tal como se ha definido anteriormente, a un profármaco tal como se ha definido anteriormente o a una composición farmacéutica tal como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de un cáncer y/o una enfermedad inflamatoria.

20 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura molecular del compuesto **R1a** a partir de cristalografía de rayos X. Los elipsoides de desplazamiento se dibujan con un nivel de probabilidad del 50%.

25 La figura 2 muestra la cinética de la liberación inducida por  $\beta$ -glucuronidasa de MMAE en soluciones plasmáticas de los compuestos **R5** y **S5**.

La figura 3 muestra la cinética de la liberación inducida por  $\beta$ -glucuronidasa de MMAF en soluciones plasmáticas de los compuestos **R6** y **S6**.

30 La figura 4 muestra la cinética de la liberación inducida por  $\beta$ -glucuronidasa de SN-38 en soluciones plasmáticas de los compuestos **R7** y **S7**.

35 La figura 5 muestra la cinética de la liberación inducida por  $\beta$ -glucuronidasa de doxorubicina en soluciones plasmáticas de los compuestos **R8** y **S8**.

La figura 6 muestra la estabilidad de los compuestos **R5** y **S5** en PBS a pH 7,4.

La figura 7 muestra la cinética de unión en plasma de los compuestos **R5** y **S5**.

40 La figura 8 muestra la estabilidad en plasma de la unión a albúmina de **R5** y **S5**.

La figura 9 muestra el perfil de HPLC de la mezcla 1: 1 de **R5** y **S5**.

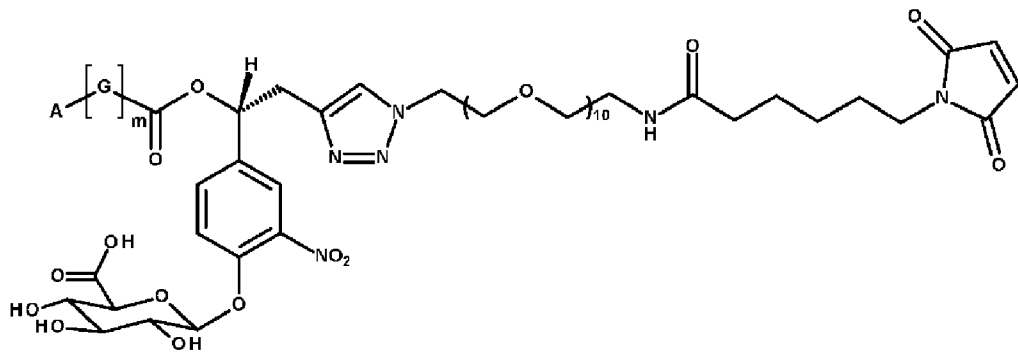
45 La figura 10 muestra el perfil de HPLC de la mezcla 1: 1 de **R4** y **S4**.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

50 Conjugados

La invención se refiere a un conjugado que tiene la fórmula (I) siguiente:



(I),

en la que

A representa un radical derivado de un fármaco citotóxico,

G es un resto autoinmolante, y

m es 0 o 1,

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En el contexto de la invención, una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un conjugado o de un profármaco o de un fármaco según la invención, y de un metal alcalino, de un metal alcalinotérreo, o de amonio, que comprende las sales obtenidas con bases de amonio orgánicas, o sales de un conjugado, o de un profármaco o de un fármaco según la invención, y de un ácido orgánico o inorgánico.

Las sales más particularmente adecuadas para la invención pueden ser sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, sales de amonio cuaternario tales como tetrametilamonio o tetraetilamonio, y sales de adición con amoniaco y aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, tales como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, trietilamina, etanolamina o tris(2-hidroxiethyl)amina.

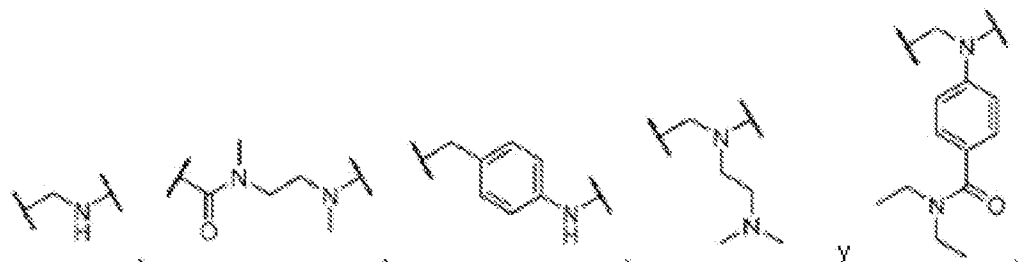
Las sales de un conjugado, o de un profármaco o de un fármaco según la invención, y de un ácido inorgánico que son adecuadas para la invención se pueden obtener con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido fosfórico.

Las sales de un conjugado, o de un profármaco o de un fármaco según la invención, y de un ácido orgánico que son adecuadas para la invención se pueden obtener con ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido succínico, ácido malónico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico o ácido p-toluenosulfónico.

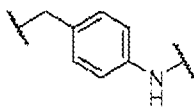
Según la invención, un "resto autoinmolante" denota un grupo químico divalente que conecta el radical que se deriva de un fármaco citotóxico con el resto del conjugado, y que se vuelve lábil tras la activación (por ejemplo, escisión enzimática del residuo de glucurónido), lo que da lugar a la liberación de los restos libres, en particular del fármaco citotóxico. Los restos autoinmolantes son bien conocidos por el experto en la técnica (Polym. Chem. 2011, 2, 773-790).

En una forma de realización, m es 0.

En otra forma de realización, m es 1 y G está representado por una fórmula seleccionada de entre:



En una forma de realización preferida, G está representado por la fórmula siguiente:



5 Según la invención, un "radical que se deriva de un fármaco citotóxico" denota un resto que consiste en un fármaco citotóxico desprovisto de uno o más átomos de uno de sus grupos funcionales (por ejemplo, un átomo de H) que ha reaccionado con el resto del conjugado.

10 El fármaco según la invención es un fármaco citotóxico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fármaco citotóxico" se refiere a una molécula que cuando entra en contacto con una célula, opcionalmente tras su internalización en la célula, altera una función celular (por ejemplo, el crecimiento y/o la proliferación y/o la diferenciación y/o el metabolismo celular tal como la síntesis de proteínas y/o ADN) de una manera perjudicial u ocasiona la muerte celular. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fármaco citotóxico" abarca toxinas, en particular citotoxinas. En principio, un fármaco citotóxico se define como una molécula de ATC de LO1 ("Sistema de clasificación anatómica, terapéutica, química" en el que LO1 es un subgrupo que define agentes antineoplásicos e inmunomoduladores definidos por el Centro de colaboración de la OMS para la metodología de estadística de fármacos).

20 El fármaco citotóxico según la invención se puede seleccionar de entre dolastatinas tales como dolastatina 10, dolastatina 15, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatina F (MMAF), monometilauristatina-D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE), éster de AE del ácido 5-benzoilvalérico (AEVB) o derivados de los mismos.

25 Las dolastatinas preferidas son MMAF, MMAD, MMAE, o derivados de las mismas.

Las dolastatinas más preferidas son MMAE, MMAF o derivados de las mismas.

30 En una forma de realización particular, el fármaco citotóxico según la invención es una antraciclina tal como doxorubicina, idarrubicina, epirubicina, daunorrubicina o valrubicina, preferentemente doxorubicina.

35 En otra forma de realización particular, el fármaco citotóxico según la invención es un fármaco de la familia de las camptotecinas (también denominado en el presente documento "análogo de camptotecina"), tal como camptotecina, SN-38, topotecán, irinotecán, exatecán, silatecán, cositecán, lurtotecán, gimitecán, belotecán o rubitecán, preferentemente SN-38, exatecán, belotecán y de forma más preferida SN-38.

40 En una forma de realización preferida, el fármaco citotóxico se selecciona de entre doxorubicina, SN-38, MMAE, MMAF, MMAD y derivados de los mismos.

45 Las dolastatinas son una familia de compuestos que tienen una estructura de al menos 4 aminoácidos, preferentemente de 4 aminoácidos, siendo al menos 3 de ellos específicos de las mismas, ya que son diferentes de los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en la naturaleza. Según la invención, un derivado de dolastatina presenta una estructura química muy relacionada con al menos un compuesto de la familia de las dolastatinas y presenta propiedades antimitóticas similares. Las diferencias estructurales entre dicho derivado y un compuesto de la familia de la dolastatina pueden consistir en una sustitución en al menos una cadena lateral de al menos un aminoácido por cualquier sustituyente adecuado encontrado comúnmente. Por ejemplo, dicho sustituyente puede ser:

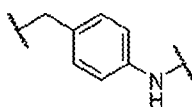
- un grupo alquilo, es decir una cadena de hidrocarburo saturada lineal o ramificada, tal como un grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo;
- un grupo heteroalquilo, es decir, una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada interrumpida por uno o varios heteroátomos, principalmente O, N y S, tal como un grupo metoxi o etoxi;
- un grupo arilo, es decir, un grupo carbocíclico aromático, tal como un grupo fenilo o naftilo, que puede estar opcionalmente sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero sin limitación: -COOH, -SO<sub>3</sub>H, -OCH<sub>3</sub>, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CN;
- un grupo heteroarilo, es decir un grupo aromático que contiene uno o más heteroátomos, tales como un grupo piridilo, oxazolilo, furanilo o tiazolilo; o
- un átomo de halógeno, tal como -F, -Cl, -Br, -I.

60 La diferencia estructural puede consistir igualmente en una modificación de una dolastatina tal como dolastatina 10, dolastatina 15, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatina F (MMAF), monometil auristatina D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE) o éster de AE del ácido 5-benzoilvalérico (AEVB), por ejemplo al nivel de su amina terciaria en la posición N-terminal, de forma que se haga compatible esta función con el establecimiento de un enlace covalente con el brazo enlazador en cuestión.

El experto en la técnica es capaz de seleccionar modificaciones adecuadas, en particular sustituyentes adecuados, para estos fines.

5 Según otra forma de realización, el fármaco puede seleccionarse de entre mitansinas tales como DM1 y DM4, antraciclinas tales como doxorubicina, nemorrubicina y PNU-159682, caliqueamicinas, duocarmicinas tales como CC-1065 y duocarmicina A, pirrolobenzodiazepinas, dímeros de pirrolobenzodiazepina, indolino-benzodiazepinas, dímeros de indolino-benzodiazepina,  $\alpha$ -amanitinas, eribulina, acalabrutinib, bleomicina, beritinib, cladribina, clofarabina, cobimetinib, copanlisib, crizotinib, citarabina, dabrafenib, dactinomicina, daunorrubicina, decitabina, epirubicina, ibrutinib, idarrubicina, lapatinib, lenalidomida, mitomicina C, mitoxantrona, nelarabina, niraparib, paclitaxel, niraparib, panobinostat, pomalidomida, prednisona, ribociclib, palbociclib, rolapitant, rucaparib, sonidegib, tamoxifeno, temsirolimus, topotecán, trabectina, valrubicina, vinblastina, vincristina, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 En una forma de realización particular, el fármaco citotóxico es SN-38, m es 1 y G es



20 En otra forma de realización particular, el fármaco citotóxico es una dolastatina o una antraciclina, y m es 0.

#### Proceso

25 El término "disolvente" se refiere a un disolvente orgánico, un disolvente inorgánico tal como agua, o una mezcla de los mismos. Los ejemplos de disolventes orgánicos incluyen, pero sin limitación, hidrocarburos alifáticos tales como pentano o hexano, hidrocarburos alicíclicos tales como ciclohexano, hidrocarburos aromáticos tales como benceno, estireno, tolueno, *orto*-xileno, *meta*-xileno o *para*-xileno, hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, cloroformo o clorobenceno, disolventes basados en nitrógeno tales como piridina, acetonitrilo o trietilamina, disolventes basados en oxígeno, en particular cetonas tales como acetona, éteres tales como dietil éter, terc-butil metil éter (TBME), ciclopentil metil éter (CPME), tetrahidrofurano (THF) o metil-tetrahidrofurano (Me-THF), y alcoholes tales como metanol o etanol, ésteres tales como acetato de n-butilo, o amidas tales como dimetilformamida (DMF), y mezclas de los mismos.

35 "Condiciones ácidas" se refiere a condiciones en las que se usan uno o más ácidos. Los ejemplos de ácido incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido fluorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido hexafluorofosfórico, ácido tetrafluorobórico, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido sulfónico tal como ácido metanosulfónico, ácido mono- o policarboxílico, o mezclas de los mismos, preferentemente ácido clorhídrico.

40 "Condiciones básicas" se refiere a condiciones en las que se usan una o más bases. Los ejemplos de base incluyen, pero sin limitación, hidróxido de litio o hidróxido de sodio, carbonatos tales como carbonato de potasio, carbonato de sodio o hidrogenocarbonato de sodio, alcóxidos tales como metóxido de sodio, aminas tales como trietilamina, y bases cíclicas basadas en nitrógeno, tales como imidazol, N-metilimidazol, piridina o dimetil-amino-piridina (DMAP), preferentemente hidróxido de litio.

45 El conjugado según la invención puede prepararse a partir de 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído comercial, a través de una síntesis de múltiples etapas, que incluye una etapa de separación enantiomérica del intermedio *rac*-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) quiral.

50 Las condiciones (temperatura, concentración, disolventes, reactivos, equivalentes de los reactivos) descritas a continuación para cada etapa pueden ajustarse por el experto en la técnica usando su experiencia general en síntesis orgánica. Cada intermedio o producto obtenido al final de una etapa puede aislarse y opcionalmente purificarse, o alternativamente, pueden llevarse a cabo varias etapas en un único recipiente sin aislar dicho intermedio o producto. El orden de las etapas del proceso descritas a continuación puede modificarse.

#### 55 *Etapa (a)*

60 En una forma de realización, el *rac*-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol puede prepararse en una etapa a partir de 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído. La reacción consiste en introducir un grupo propargilo por adición de este último en la función aldehído del 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído. Normalmente, dicha reacción se puede realizar haciendo reaccionar 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído con un grupo propargilo nucleófilo, es decir, cualquier forma aniónica u organometálica del grupo propargilo, que pueda añadirse a un sitio electrófilo. Dicha reacción puede asistirse con un

catalizador, tal como HgCh. Dicho grupo propargilo nucleófilo puede formarse *in situ* o prepararse de antemano en un recipiente aparte, a partir de cualquier fuente de propargilo tal como bromuro de propargilo. En una forma de realización preferida, la reacción se realiza con 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído y bromuro de propargilo en presencia de aluminio metálico y HgCl<sub>2</sub>.

5

#### Etapa (b)

A continuación, los dos enantiómeros de *rac*-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol puede separarse por medio de una técnica tal como HPLC quirral, formación y separación de sales diastereoisoméricas, cristalización, resolución catalítica o resolución enzimática, o combinaciones de las mismas. Preferentemente, los dos enantiómeros se separan por HPLC quirral. La HPLC quirral es una técnica de cromatografía cuya fase estacionaria es quirral. La fase estacionaria quirral puede ser una fase basada en amilosa, basada en ciclodextrina o basada en celulosa. Preferentemente, la fase estacionaria quirral es una fase a base de amilosa.

Esta etapa de separación enantiomérica permite aislar (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol. La pureza enantiomérica de (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol después de la etapa de separación es ventajosamente superior al 90%, preferentemente superior al 95%. La pureza enantiomérica se puede medir por medio de HPLC quirral analítica.

#### Etapa (c)

Con el fin de introducir el resto glucurónido, puede hacerse reaccionar (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol con un derivado de ácido glucurónico, en condiciones que permitan la O-glucuronidación selectiva del grupo fenol. Preferentemente, dicho derivado de ácido glucurónico es un ácido glucurónico totalmente protegido, normalmente un glucuronato acetilado, y está funcionalizado de forma que pueda reaccionar con el grupo fenol. Dicho derivado de ácido glucurónico es preferentemente un acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronato de alquilo, de forma más preferida acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronato de metilo. En una forma de realización preferida, la O-glucuronidación del grupo fenol se lleva a cabo en condiciones básicas. Por ejemplo, la reacción puede llevarse a cabo en presencia de Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y HMTTA (1,1,4,7,10,10-hexametiltrietilentetramina).

30

#### Etapa (d)

El producto de O-glucuronidación obtenido en la etapa (c) puede transformarse para el fin de la etapa de acoplamiento (e). Para este fin, la función alcohol secundaria de dicho producto puede hacerse reaccionar con un cloroformiato, preferentemente cloroformiato de 4-nitrofenilo, lo que da lugar a la formación de un carbonato. La reacción puede catalizarse mediante un nucleófilo, que también puede actuar como una base, tal como piridina.

35

#### Etapas (e), (f) y (g)

En la etapa (e), el compuesto obtenido en la etapa (d) se une a continuación a un fármaco citotóxico tal como se ha definido anteriormente (tal como MMAE), o con un resto A-G-H, en el que A representa un radical que se deriva de un fármaco citotóxico y G representa un resto autoinmolante. En una primera forma de realización, cuando el fármaco citotóxico está directamente unido al compuesto obtenido en la etapa (d), el grupo amina (o grupo hidroxilo) de dicho fármaco citotóxico reacciona con el carbonato del compuesto obtenido en la etapa (d) para generar un grupo amida. Se puede usar un agente de activación, tal como HOAt, HOBt, HOCT. Preferentemente, dicho agente de activación es HOBt.

45

La implementación de las etapas (f) y (g) tal como se describe a continuación, posteriormente a dicha primera forma de realización, da lugar a un conjugado de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en el que m es 0.

50

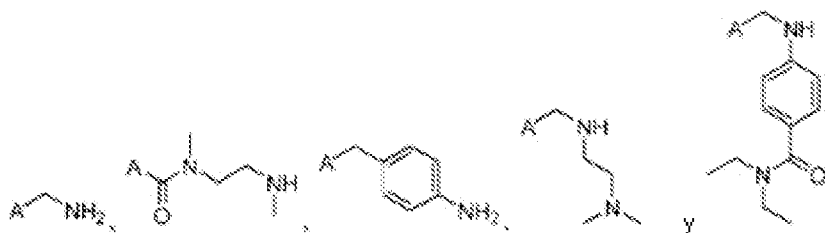
En una segunda forma de realización, en la que el fármaco citotóxico está unido al compuesto obtenido en la etapa (d) a través de un resto autoinmolante, el compuesto obtenido en la etapa (d) se hace reaccionar con un resto A-G-H, en el que A representa un radical que deriva de un fármaco citotóxico y G representa un resto autoinmolante.

A-G-H se conecta al compuesto obtenido en la etapa (d) a través de un grupo funcional, que es ventajosamente -NH<sub>2</sub> o -NH-.

55

Los ejemplos de restos A-G-H incluyen, pero sin limitación:





Dicho resto A-G-H puede prepararse normalmente haciendo reaccionar un fármaco citotóxico con un compuesto de fórmula X-G-H, en la que X representa un grupo saliente, tal como un sulfonato (por ejemplo, metanosulfonato, trifluorometanosulfonato, toluenosulfonato, nitrobenzenosulfonato) o un halógeno (por ejemplo, un cloro, un bromo, un yodo). Preferentemente, X es bromo. El fármaco citotóxico reacciona normalmente con X-G-H, por medio de su grupo amina o hidroxilo (o uno de sus grupos amino o hidroxilo), para formar A-G-H tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización particular, X-G-H se encuentra en una forma protegida cuando reacciona con el fármaco citotóxico. Una "forma protegida" se refiere a una forma en la que uno o más grupos funcionales reactivos del compuesto se presentan en una forma no reactiva, tal como un grupo NH<sub>2</sub> protegido en forma de grupo N<sub>3</sub>. Después de hacer reaccionar X-G-H con el fármaco citotóxico, se obtiene A-G-H y puede estar también en una "forma protegida". Dicho A-G-H puede "desprotegerse" con el fin de liberar el o los grupos funcionales reactivos (por ejemplo, convirtiendo un grupo N<sub>3</sub> en un grupo NH<sub>2</sub>).

La implementación de las etapas (f) y (g) tal como se describe a continuación, posteriormente a dicha segunda forma de realización, da lugar a un conjugado de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente, en el que m es 1.

En una forma de realización, la desprotección de las funciones acetilo y éster en el resto glucurónido para dar funciones hidroxilo y ácido carboxílico, respectivamente, se lleva a cabo después en la etapa (f). Dicha etapa (f) de desprotección del resto glucurónido del compuesto obtenido en la etapa (e) se lleva a cabo preferentemente en condiciones básicas, y de forma más preferida en condiciones básicas a baja temperatura. Alternativamente, dicha etapa (f) se puede llevar a cabo en condiciones ácidas, y en cualquier disolvente orgánico, tal como acetonitrilo. La función alquino del compuesto obtenido en la etapa (f) se acopla a continuación con una azida de fórmula N<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>10</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-X, en la que X es un grupo maleimida, en condiciones de química de clic bien conocidas, que permiten la formación selectiva del regioisómero de triazol 1,4-disustituido y, por lo tanto, la formación de un conjugado de la invención.

La azida de fórmula N<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>10</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-X, en la que X es un grupo maleimida, se puede obtener normalmente haciendo reaccionar N<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>10</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> con 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo.

En otra forma de realización, la etapa (f) consiste en acoplar el compuesto obtenido en la etapa (e) con la azida de fórmula N<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>10</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> en condiciones de química de clic, permitiendo la formación selectiva del regioisómero de triazol 1,4-disustituido. En la etapa (g), el grupo -NH<sub>2</sub> se convierte en una alquilamida sustituida con un grupo maleimida en el extremo de la cadena de alquilo, normalmente haciendo reaccionar el compuesto obtenido en la etapa (f) con 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo. Se lleva a cabo a continuación una desprotección final del resto glucurónido del compuesto obtenido en la etapa (g). Esta desprotección se lleva a cabo preferentemente en condiciones básicas, y de forma más preferida en condiciones básicas a baja temperatura.

El proceso según la invención permite acceder a un conjugado que se presenta en forma de isómero único, cuya pureza es ventajosamente superior al 90%, preferentemente superior al 95%.

#### Profármaco

El conjugado según la invención contiene un grupo maleimida muy reactivo frente a los grupos nucleófilos, y más particularmente frente a un grupo tiol (-SH). Tales grupos se añaden normalmente al resto maleimida por medio de una adición de Michael. El grupo maleimida es, por lo tanto, un grupo reactivo elegido para acoplar un conjugado de la invención con una macromolécula. En el contexto de la invención, la macromolécula es preferentemente una molécula endógena.

Según la invención, un profármaco se refiere a al menos un conjugado unido covalentemente a una macromolécula, más específicamente una proteína. Dicho profármaco es capaz de transportar, en una forma inactivada, un fármaco citotóxico en un organismo, y de liberar dicho fármaco en un órgano, un tejido o células, al que (o a los que) está específicamente dirigido, bajo la acción de una β-glucuronidasa. El profármaco puede formarse *in vivo* o *in vitro* mediante reacción con una macromolécula, más específicamente una proteína.

En particular, la proteína se selecciona de aquellas que se unen específicamente a una molécula presente en la membrana de una célula cancerosa, preferentemente una molécula seleccionada del grupo que consiste en proteínas,

glicoproteínas, glicolípidos, carbohidratos, o una combinación de los mismos, de forma incluso más preferida la proteína se une específicamente a una proteína presente en la membrana de una célula cancerosa. La molécula de membrana a la que la proteína es capaz de unirse es una molécula principal o exclusivamente presente en la membrana de una célula cancerosa. En una forma de realización particular, la molécula de membrana reconocida por la proteína es una proteína sobreexpresada en la membrana de una célula cancerosa. En una forma de realización preferida, la proteína puede seleccionarse del grupo que consiste en anticuerpos y albúminas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, así como variantes de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. En particular, el anticuerpo según la invención puede corresponder a un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano), o un fragmento de anticuerpo monoclonal. El término anticuerpo se refiere a anticuerpos clásicos así como a anticuerpos de cadena pesada y fragmentos de los mismos tales como fragmentos (VHH)<sub>2</sub> y anticuerpos de dominio único.

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Los fragmentos de anticuerpo son porciones de unión a antígeno de un anticuerpo, tales como F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, scFv y similares. Otros fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación: los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab', que pueden generarse reduciendo puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab' (Huse et al., 1989, Science, 246:1274-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab' monoclonales con la especificidad deseada.

Los anticuerpos según la invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación. Los anticuerpos de la invención pueden obtenerse produciendo y cultivando hibridomas. Véase también el documento WO 2015/063331 para la producción de anticuerpos sintéticos de dominio único.

El anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo monomérico o un anticuerpo multimérico y puede comprender al menos un dominio variable, en particular cuando el anticuerpo es multimérico. Preferentemente, el anticuerpo según la invención es IgG, preferentemente los subtipos IgG1 o IgG4, por ejemplo trastuzumab o rituximab.

En una forma de realización más preferida de la presente invención, la proteína es una molécula de albúmina, que tiene funciones tiol libres. Se puede considerar una albúmina endógena o exógena, y en particular una albúmina sérica humana, una albúmina recombinante o un fragmento de una albúmina.

Se sabe que la albúmina endógena se acumula por medio del efecto "EPR" ("Permeabilidad y retención potenciadas") en el microentorno de los tumores sólidos; por lo tanto, el acoplamiento *in situ* de un conjugado según la invención con una molécula de albúmina endógena permite dirigir la entidad acoplada así formada, también llamada profármaco, al microentorno tumoral y, por lo tanto, superar la falta de selectividad de las formas libres de algunos derivados de fármacos citotóxicos, tales como dolastatinas. Debe observarse que dicho efecto "EPR" se aplica al microentorno de los tejidos inflamados.

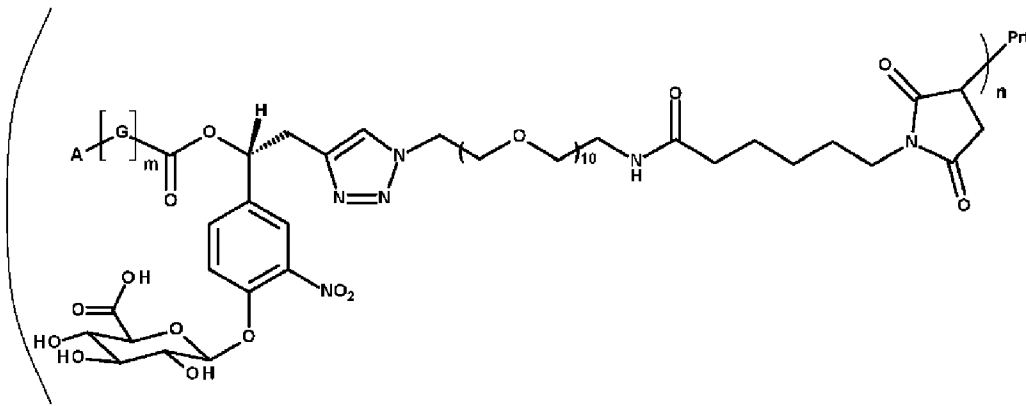
De este modo, se puede obtener un profármaco mediante la formación selectiva, *in vivo*, de un enlace covalente entre el conjugado, a través de su grupo maleimida reactivo, y una función reactiva libre y complementaria, normalmente una función tiol, de una proteína, preferentemente una molécula de albúmina endógena, de forma más preferida una albúmina sérica humana. Dicho profármaco puede comprender al menos una molécula del conjugado según la invención, unida covalentemente a una molécula proteica o un fragmento de la molécula.

En el caso de la albúmina, dicho enlace covalente puede establecerse con la función tiol de la cisteína en la posición 34 de la albúmina.

En una forma de realización particular, el profármaco de la invención puede prepararse antes de su administración. El profármaco de la invención puede formarse *in vitro* por medio de la formación de un enlace covalente entre al menos un conjugado de la invención y una función libre y complementaria, normalmente una función tiol, de una proteína tal como una molécula de albúmina, una molécula de albúmina recombinante o un fragmento de la misma. Dicho enlace covalente puede establecerse con la función tiol de la cisteína en la posición 34 de la albúmina.

En el contexto de la invención, "fragmento de una molécula de albúmina" denota un fragmento de una molécula de albúmina que tiene un tamaño suficiente para garantizar una biodisponibilidad satisfactoria, permeabilidad con respecto a los tejidos tumorales e impermeabilidad con respecto a la barrera endotelial de los tejidos sanos, del profármaco así generado. En una forma de realización particular, el fragmento de una molécula de albúmina contiene la cisteína correspondiente a la cisteína 34 de la secuencia de albúmina endógena.

El profármaco según la invención puede representarse por la fórmula (II):



(II),

en la que A, G y m son tal como se han definido anteriormente,

Prt representa un radical que se deriva de una proteína,

n está comprendido entre 0,1 y 16, preferentemente entre 0,1 y 8,

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En una forma de realización particular, Prt representa un radical derivado de un anticuerpo y n es el número medio de conjugados unidos a dicho anticuerpo y está comprendido entre 0,1 y 16, preferentemente entre 0,1 y 8.

En otra forma de realización particular, Prt representa un radical que se deriva de albúmina y n es 1. n puede medirse por espectrometría de masas (EM) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).

Según la invención, un "radical que se deriva de una proteína" denota un resto que consiste en una proteína desprovista de uno o más átomos de uno de sus grupos funcionales que ha reaccionado con el resto del conjugado. Más específicamente, un "radical que se deriva de una proteína" denota una proteína que comprende al menos un resto cisteína que se ha desprovisto del átomo de hidrógeno de su grupo -SH.

#### Composiciones farmacéuticas

Los conjugados o profármacos de la presente invención pueden administrarse en una composición farmacéutica que comprende al menos una cantidad eficaz de al menos un conjugado de la invención o al menos un profármaco de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede encontrarse en estado sólido o líquido y puede estar en cualquiera de las formas farmacéuticas comúnmente utilizadas en medicina humana y/o veterinaria, por ejemplo en forma de comprimidos simples o recubiertos de azúcar, de píldoras, de pastillas, de cápsulas de gel, de gotas, de gránulos, de preparaciones inyectables, de pomadas, de cremas o de geles. La composición farmacéutica puede prepararse según los procedimientos habituales.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier ingrediente excepto principios activos (concretamente a cualquier excipiente) que está presente en una composición farmacéutica. Su adición puede tener como objetivo conferir una consistencia particular u otras propiedades físicas o gustativas al producto final. Un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable debe estar desprovisto de cualquier interacción, en particular química, con los principios activos. Los excipientes convencionales pueden usarse según técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un principio activo, que previene, elimina o reduce los efectos perjudiciales de la enfermedad.

#### Usos

Los conjugados de la invención o profármacos de la invención pueden usarse para tratar cáncer y/o una enfermedad inflamatoria.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento", "tratar" o "que trata" se refiere a cualquier acto destinado a mejorar el estado de salud de pacientes tales como terapia, prevención, profilaxis y retraso de la enfermedad. En determinadas formas de realización, tal término se refiere a la mejora o erradicación de una enfermedad o síntomas asociados con una enfermedad. En otras formas de realización, este término se refiere a

minimizar la propagación o el empeoramiento de la enfermedad como resultado de la administración de uno o más agentes terapéuticos a un sujeto con dicha enfermedad.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se utilizan indistintamente y se refieren a un animal, preferentemente a un mamífero, de forma incluso más preferida a un ser humano. Sin embargo, el término "sujeto" también puede referirse a animales no humanos, en particular mamíferos. El sujeto según la invención es un animal, preferentemente un mamífero, de forma incluso más preferida un ser humano. El sujeto puede ser un animal no humano, en particular seleccionado de mamíferos tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos, entre otros. Preferentemente, el sujeto es un ser humano, preferentemente un adulto, de forma más preferida un adulto de al menos 40 años de edad, de forma aún más preferida un adulto de al menos 50 años de edad, de forma incluso más preferida un adulto de al menos 60 años de edad.

La invención también se refiere al uso de un conjugado según la invención, un profármaco según la invención o una composición farmacéutica según la invención, para la preparación de un medicamento. Preferentemente, se refiere a un conjugado según la invención, un profármaco según la invención o una composición farmacéutica según la invención, para la preparación de un medicamento para tratar cáncer y/o una enfermedad inflamatoria en un sujeto.

Se refiere además a un procedimiento para tratar en un sujeto un cáncer y/o una enfermedad inflamatoria, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado según la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco según la invención o una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica según la invención, se administra a dicho sujeto que padece un cáncer y/o una enfermedad inflamatoria.

También se refiere a un procedimiento para tratar en un sujeto un cáncer y/o una enfermedad inflamatoria, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado según la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco según la invención o una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica según la invención, se administra a dicho sujeto que padece un cáncer y/o una enfermedad inflamatoria, en combinación con otro tratamiento elegido de un grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, tratamiento con al menos un agente antiinflamatorio y combinaciones de los mismos.

El conjugado según la invención, el profármaco según la invención o la composición farmacéutica según la invención se pueden administrar por cualquier vía conveniente a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, puede administrarse por vía sistémica, en particular mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica, preferentemente mediante inyección intravenosa. El conjugado según la invención, el profármaco según la invención o la composición farmacéutica según la invención se pueden administrar como una dosis única o en dosis múltiples. El conjugado según la invención, el profármaco según la invención o la composición farmacéutica según la invención se pueden administrar entre cada día y cada mes, preferentemente cada semana o cada dos semanas, de forma más preferida cada semana. La duración del tratamiento con un conjugado según la invención, un profármaco según la invención o una composición farmacéutica según la invención, está comprendida preferentemente entre 1 y 20 semanas, preferentemente entre 1 y 10 semanas. Alternativamente, el tratamiento puede durar siempre que los síntomas de la enfermedad persistan. La cantidad de conjugado según la invención, profármaco según la invención o composición farmacéutica según la invención que se va a administrar debe determinarse por un procedimiento estándar bien conocido por los expertos en la técnica. Deben tenerse en cuenta los datos fisiológicos del paciente (por ejemplo, edad, tamaño y peso) y las vías de administración para determinar la dosificación apropiada, de modo que se administre al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz.

#### Cáncer

El término "cáncer" o "tumor", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a la presencia de células que poseen características típicas de las células que causan cáncer, tales como proliferación incontrolada y/o inmortalidad y/o potencial metastásico y/o velocidad rápida de crecimiento y/o proliferación y/o determinados rasgos morfológicos característicos. Este término se refiere a cualquier tipo de neoplasia maligna (primaria o metástasis) en cualquier tipo de sujeto. Puede referirse a tumor sólido así como a tumor hematopoyético.

Preferentemente, el cáncer según la invención se selecciona del grupo que consiste en el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer gástrico, el cáncer de riñón, el cáncer de ovario, el cáncer hepatocelular, el osteosarcoma, el melanoma, el cáncer de hipofaringe, el cáncer esofágico, el cáncer de endometrio, el cáncer de cuello uterino, el cáncer pancreático, el cáncer hepático, el cáncer de colon o colorrectal, los tumores neuroendocrinos, el tumor maligno del músculo, el cáncer adrenal, el cáncer de tiroides, el cáncer uterino, el cáncer de piel, el cáncer de vejiga, el cáncer de cabeza y cuello, el linfoma y la leucemia.

Los conjugados de la presente invención, los profármacos de la presente invención o las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen como objetivo particularmente tratar cánceres de mama, colon, ovario, próstata, pancreático y pulmón.

Los conjugados de la presente invención, profármacos de la presente invención o composiciones farmacéuticas pueden emplearse para su uso en la prevención y/o el tratamiento de metástasis.

Enfermedades inflamatorias

5 El término "enfermedad inflamatoria", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en particular a afecciones patológicas crónicas del intestino o afecciones patológicas reumatoides.

**Ejemplos**

10 La presente invención se entenderá mejor a la luz de los siguientes ejemplos, que se proporcionan únicamente con fines ilustrativos.

## Procedimiento 1 - HPLC preparativa

15 El sistema de HPLC preparativa consistía en dos bombas Shimadzu LC-8A, un detector SPD-10A VP (Shimadzu), un controlador SCL-10A VP (Shimadzu), un automuestreador SIL-10A, un bucle de muestras de 2 ml y una columna SunFire C18 (150 mm × 19 mm d.i., 5 µm, Waters). La muestra se inyectó en el bucle de muestras y se eluyó a un caudal de 17 ml/min (50 min de ejecución, detección a 254 nm; tampón A: H<sub>2</sub>O miliQ + 0,05% de TFA; tampón B: acetonitrilo; gradiente: 40 min - 5% a 95% de B, 5 min - 95% de B, 5 min - 5% de B).

## 20 Procedimiento 2 - HPLC analítica

La HPLC analítica se realizó en módulos de separación Waters 2695 equipados con detector UV Waters 2487 y columna Gemini-NX, 5 µm, C18, 150 × 4,6 mm. El caudal fue de 1 ml/min. Disolvente A: TFA al 0,05% en agua. Disolvente B: TFA al 0,05% en acetonitrilo. Ejecución del gradiente: 0-1 min - 30% de B; 1-11 min - 30% a 80% de B; 25 11-12 min - 80 a 95% de B; 12-14,5 min - 95% de B; 14,5-14,7 min - 95% a 30% de B; 14,7-17 min - 30% de B.

## Procedimiento 3 - CL-EM

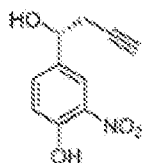
30 La CL-EM se realizó en módulos de separación Waters 2695 equipados con detector UV Waters 2487, detector de masas Waters Acquity QDa y columna CORTECS, 2,7 µm, C18, 50 × 4,6 mm El caudal fue de 1 ml/min. Disolvente A: HCOOH al 0,05% en agua. Disolvente B: HCOOH al 0,05% en acetonitrilo. Ejecución del gradiente: : 0-5 min - 5% a 95% de B; 5-6 min - 95% de B; 6-7,8 min - 5% de B. El detector de masas se operó en modo de barrido de EM positivo con una temperatura de sonda de 600 °C, un voltaje capilar de 1,5 kV y un voltaje de cono de 10 V.

## 35 Procedimiento 4 - HPLC quiral

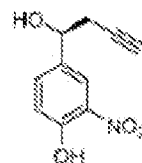
La HPLC quiral se realizó en un sistema Shimadzu SCL-10AVP equipado con un automuestreador Shimadzu SIL-10A, detector de UV Shimadzu SCL-10AVP (ajustado a 254 nm), dos bombas Shimadzu LC-8A, columna semipreparativa CHIRALPAK® IG (5 µm, DI 20 mm × L 250 mm) y un bucle de muestras de 2 ml. El caudal fue de 20 ml/min. El eluyente fue diclorometano. La separación se llevó a cabo durante 5 minutos.

## Procedimiento 5 - HPLC quiral

45 La HPLC quiral se realizó en un sistema Shimadzu SCL-10AVP equipado con un automuestreador Shimadzu SIL-10A, detector de UV Shimadzu SCL-10AVP (ajustado a 254 nm), dos bombas Shimadzu LC-8A, columna semipreparativa CHIRALPAK® IG (5 µm, DI 20 mm × L 250 mm) y un bucle de muestras de 2 ml. El caudal fue de 20 ml/min. El eluyente fue una mezcla de heptano y etanol (70:30). La separación se llevó a cabo durante 25 minutos.

50 Síntesis de la mezcla racémica de los compuestos **R1** y **S1****R1**

(R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol

**S1**

(S)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol

55 En un matraz equipado con un refrigerante y un embudo de adición, se cubrieron aluminio en polvo (6,17 eq., 14156 mg, 524 mmol) y una cantidad catalítica de HgCl<sub>2</sub> (0,00248 eq., 57,2 mg, 0,211 mmol) con THF anhidro (218 ml). A continuación se añadió gota a gota bromuro de propargilo (6,2 eq., 78439 mg, 58,8 ml, 527 mmol) solución al 80% en tolueno (atención: una reacción exotérmica; el pico de la exotermia y su intensidad dependen de la dispersidad del aluminio en polvo). Cuando la adición terminó, la mezcla de reacción resultante se sometió a reflujo durante 6 horas. La solución se enfrió después a 0 °C y se añadió gota a gota una solución de 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (1 eq.,

14210 mg, 85 mmol) en THF (109 ml). Después de 30 min de agitación, el aldehído desapareció completamente (controlado por TLC) y la reacción se enfrió a 0 °C. La mezcla de reacción se inactivó mediante una adición gota a gota de HCl 1 N (10 ml) y después se extrajo 3 veces con EtOAc. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y después se evaporó para proporcionar un aceite de color marrón, que se purificó por cromatografía ultrarrápida (ciclohexano/EtOAc - 70/30). Para eliminar trazas de subproducto de reacción de Wurtz, el aceite de color amarillo resultante se solubilizó en DCM (655 ml), la capa orgánica se extrajo 3 veces con solución de NaOH 1 N (1/3 de volumen de DCM cada vez). A la capa acuosa combinada obtenida se añadió después DCM (volumen igual). La mezcla de reacción se acidificó con HCl concentrado hasta pH 1. La fase acuosa se extrajo 3 veces más con DCM (1/3 del volumen de la solución acuosa cada vez). La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó para proporcionar la mezcla racémica de (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol y (S)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol (7927 mg, 38,3 mmol, 45%).

RMN de <sup>1</sup>H (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 10,63 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,73 (dd, J = 8,5, 1,5 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,97 (t, J = 6,1 Hz, 1H), 2,67 - 2,97 (m, 3H), 2,20 (t, J = 2,5 Hz, 1H).

RMN de <sup>13</sup>C (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 154,6, 135,2, 135,0, 133,3, 122,3, 120,1, 79,6, 71,9, 70,8, 29,3.

EM (ESI, Procedimiento 3) *m/z*: 230,1 [M+Na]<sup>+</sup>

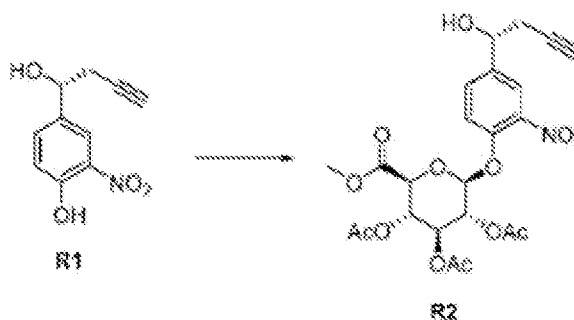
## 20 Separación de los enantiómeros **R1** y **S1**

Los enantiómeros **R1** y **S1** se separaron usando cromatografía quiral. La cromatografía quiral se realizó en el sistema Shimadzu SCL-10AVP equipado con un automuestreador Shimadzu SIL-10A, detector UV Shimadzu SCL-10AVP (ajustado a 254 nm), colector de fracciones Shimadzu FRC-10A, dos bombas Shimadzu LC-8A, columna semipreparativa CHIRALPAK<sup>®</sup> IG (5 μm, DI 20 mm × L 250 mm) y un bucle de muestras de 2 ml. La purificación se realizó a un caudal de 20 ml/min usando una mezcla de heptano y etanol (70:30) como eluyente. A 250 mg de la mezcla de R1 y S1 se añadieron 0,15 ml de etanol y 0,35 ml de heptano. La mezcla resultante se inyectó en el bucle de muestras y la purificación se llevó a cabo durante 25 minutos. Se recogió una primera fracción que contenía isómero R1 puro entre 4 min y 8 min. Se recogió una segunda fracción que contenía isómero S1 puro entre 10 min y 22 min. El eluyente se evaporó y los enantiómeros puros R1 y S1 se usaron en las etapas siguientes. La pureza enantiomérica de R1 y S1 se confirmó por HPLC quiral (Procedimiento 5).

HPLC del compuesto R1 (Procedimiento 5) TR: 6,53 min

35 HPLC del compuesto S1 (Procedimiento 5) TR: 16,79 min

Compuesto **R2**



Una solución de HMTTA (0,7 eq., 2,11 g, 2,5 ml, 9,17 mmol; 1,1,4,7,10,10-hexametiltriiletentetramina, CAS 3083-10-1) y Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,7 eq., 13,4 g, 48,5 mmol) se agitó en acetonitrilo anhidro (20 ml) durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió solución de (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol (1 eq., 2,71 g, 13,1 mmol) y triacetato de (2R,3R,4S,5S,6S)-2-bromo-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (1,1 eq., 5,7 g, 14,3 mmol) en acetonitrilo (11,9 ml) a 0 °C, y la mezcla resultante se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con agua, seguida de la adición de EtOAc (50 ml). La mezcla de reacción obtenida se agitó durante 3 minutos, y después se filtró para eliminar las sales de plata. Se realizó la extracción con 4 porciones más de Et<sub>2</sub>O; las fracciones orgánicas unidas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron. El material bruto resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de ciclohexano/EtOAc del 0-100% de EtOAc en 20 minutos; 30 volúmenes de columna) para proporcionar metil **R2** (3428 mg, 6,55 mmol, 50%) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

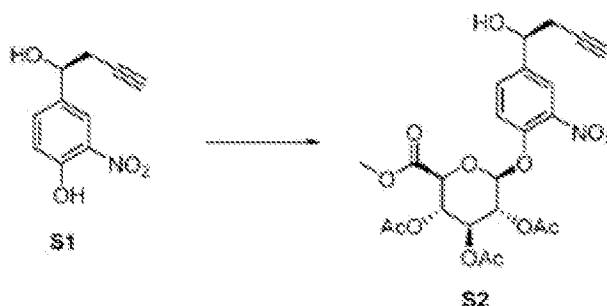
50 RMN de <sup>1</sup>H (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 7,86 (dd, J = 6,1, 1,9 Hz, 1H), 7,49 - 7,65 (m, 1H), 7,36 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 5,25 - 5,39 (m, 3H), 5,17 - 5,25 (m, 1H), 4,90 (t, J = 6,1 Hz, 1H), 4,21 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,53 - 2,70 (m, 2H), 1,98 - 2,20 (m, 10H).

RMN de <sup>13</sup>C (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 170,0, 169,3, 169,3, 166,7, 148,5, 141,2, 138,9, 131,2, 122,6, 120,0,

99,8, 90,3, 79,4, 72,6, 72,0, 71,2, 70,7, 70,2, 68,8, 53,0, 29,4, 20,6, 20,5.

EM (ESI, Procedimiento 3)  $m/z$ : 546,2 [M+Na]<sup>+</sup>

Compuesto **S2**

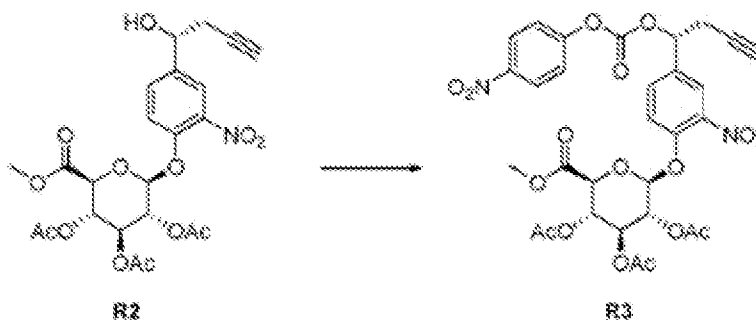


5 Una solución de HMTTA (0,7 eq., 3,4 g, 4 ml, 14,76 mmol; 1,1,4,7,10,10-hexametiltriétilentetramina, CAS 3083-10-1) y  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (3,7 eq., 21,5 g, 78 mmol) se agitó en acetonitrilo anhidro (30 ml) durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió (S)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitrofenol (1 eq., 4,37 g, 21,1 mmol) y (2R,3R,4S,5S,6S)-2-bromo-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil-triacetato de metilo (1,1 eq., 10 g, 25,3 mmol) en acetonitrilo (20 ml) a 0 °C, y la mezcla resultante se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con agua, seguida de la adición de EtOAc (80 ml). La mezcla de reacción obtenida se agitó durante 3 minutos, y después se filtró para eliminar las sales de plata. Se realizó la extracción con 4 porciones más de  $\text{Et}_2\text{O}$ ; las fracciones orgánicas unidas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporaron. El material bruto resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de ciclohexano/EtOAc del 0-100% de EtOAc en 20 minutos; 30 volúmenes de columna) para proporcionar **S2** (6100 mg, 11,6 mmol, 55%) en forma de un sólido de color amarillo pálido. RMN de  $^1\text{H}$  (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 7,86 (dd,  $J = 6,1, 1,9$  Hz, 1H), 7,49 - 7,65 (m, 1H), 7,36 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 5,25 - 5,39 (m, 3H), 5,17 - 5,25 (m, 1H), 4,90 (t,  $J = 6,1$  Hz, 1H), 4,21 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,53 - 2,70 (m, 2H), 1,98 - 2,20 (m, 10H).

15 RMN de  $^{13}\text{C}$  (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 170,0, 169,3, 169,3, 166,7, 148,5, 141,2, 138,9, 131,2, 122,6, 120,0, 99,8, 90,3, 79,4, 72,6, 72,0, 71,2, 70,7, 70,2, 68,8, 53,0, 29,4, 20,6, 20,5.

EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 546,3 [M+Na]<sup>+</sup>

Compuesto **R3**



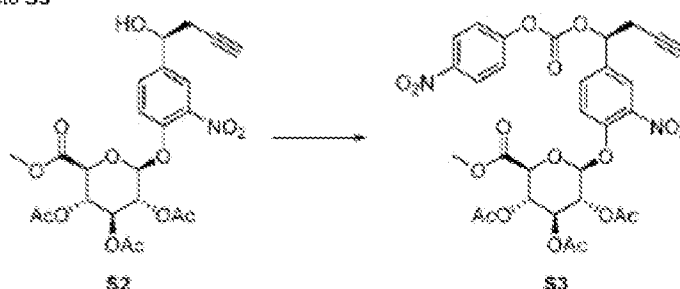
25 A una solución de **R2** (1 eq., 1600 mg, 3,05 mmol) y cloroforniato de 4-nitrofenilo (2 eq., 1230 mg, 6,1 mmol) en DCM seco (30 ml) se añadió piridina (2,5 eq., 0,62 ml, 7,62 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó 1 hora a temperatura ambiente y después se inactivó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado. La mezcla se extrajo tres veces con DCM (igual que el volumen de reacción) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se concentraron al vacío. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente de ciclohexano/EtOAc del 0-100% de EtOAc en 20 minutos; 30 volúmenes de columna) proporcionó **R3** (1469 mg, 2,13 mmol, 70%) en forma de un sólido de color blanquecino.

30 RMN de  $^1\text{H}$  (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 8,17 - 8,34 (m, 2H), 7,94 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 7,65 (dd,  $J = 8,7, 2,1$  Hz, 1H), 7,43 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,33 - 7,40 (m, 2H), 5,81 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 5,21 - 5,43 (m, 4H), 4,25 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,78 - 3,02 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 2,09 - 2,12 (m, 1H), 2,02 - 2,09 (m, 6H).

35 RMN de  $^{13}\text{C}$  (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 169,9, 169,2, 169,1, 166,7, 155,2, 151,5, 149,5, 145,6, 141,2, 133,4, 132,1, 125,3, 123,6, 121,7, 119,9, 99,5, 72,7, 72,5, 71,0, 70,2, 68,6, 53,0, 26,3, 20,6, 20,5, 20,5.

40 EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 711,2 [M+Na]<sup>+</sup>

HPLC (Procedimiento 4) TR: 2,77 min

Compuesto **S3**

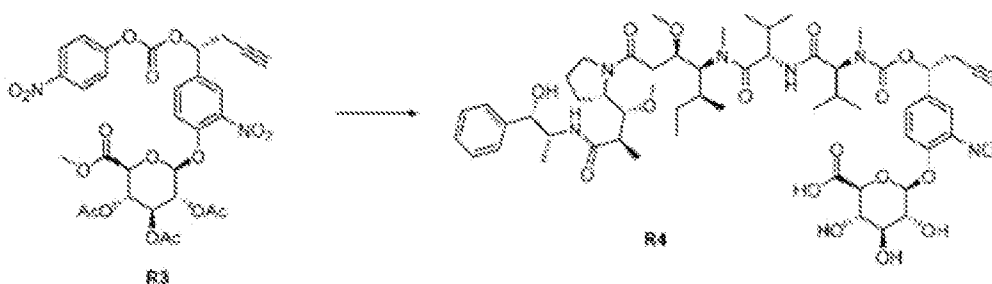
- 5 A una solución de **S2** (1 eq., 2600 mg, 5,0 mmol) y cloroformato de 4-nitrofenilo (2 eq., 2000 mg, 9,9 mmol) en DCM seco (50 ml) se añadió piridina (2,5 eq., 1 ml, 12,42 mmol) a 0 °C. La mezcla se agitó 1 hora a temperatura ambiente y se inactivó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado. La mezcla se extrajo tres veces con DCM (igual que el volumen de reacción) y la capa orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. La purificación por  
10 cromatografía ultrarrápida en ciclohexano/acetato de etilo (gradiente de ciclohexano/EtOAc del 0-100% de EtOAc en 20 minutos; 30 volúmenes de columna) proporcionó **S3** (2300 mg, 2,13 mmol, 68%) en forma de un sólido de color blanquecino.

15 RMN de <sup>1</sup>H (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 8,17 - 8,34 (m, 2H), 7,94 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,65 (dd, J = 8,7, 2,1 Hz, 1H), 7,43 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,33 - 7,40 (m, 2H), 5,81 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 5,21 - 5,43 (m, 4H), 4,25 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,78 - 3,02 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 2,09 - 2,12 (m, 1H), 2,02 - 2,09 (m, 6H).

RMN de <sup>13</sup>C (CLOROFORMO-d) Desplazamiento: 170,0, 169,3, 169,2, 166,7, 155,2, 151,5, 149,5, 145,6, 141,1, 133,4, 132,1, 125,4, 123,7, 121,7, 119,9, 99,5, 72,6, 72,5, 71,0, 70,2, 68,6, 53,1, 26,2, 20,6, 20,6, 20,5.

20 EM (Procedimiento 3) *m/z*: 711,2 [M+Na]<sup>+</sup>

HPLC (Procedimiento 4) TR: 2,84 min

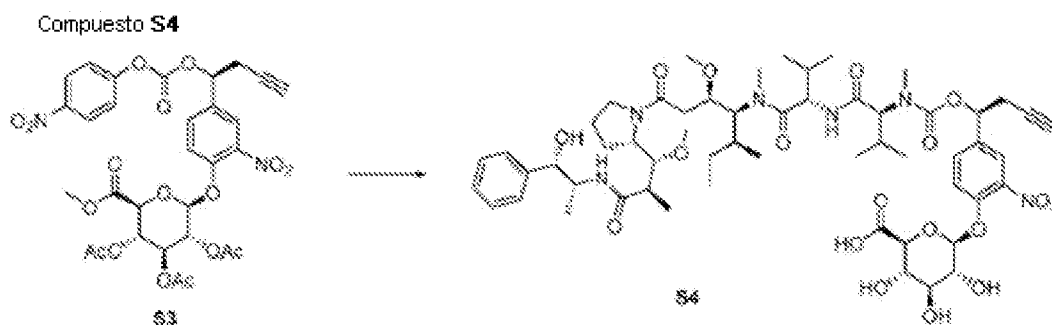
Compuesto **R4**

- 25 A la solución de **R3** (1 eq., 41,3 mg, 0,06 mmol) y **MMAE** (1 eq., 43,1 mg, 0,06 mmol) en DMF (1,15 ml) se añadió una solución de HOBt (1 eq., 8,11 mg, 0,06 mmol) en piridina (0,287 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, después se diluyó con MeOH (11,5 ml) y se enfrió a 0 °C. A la solución resultante se añadió LiOH (10  
30 eq., 1 M en H<sub>2</sub>O, 0,6 ml, 0,6 mmol) y la mezcla se incubó durante 16 h a 4 °C. La solución resultante se inactivó con HCOOH (20 eq., 1 M en H<sub>2</sub>O, 1, 2 ml, 1, 2 mmol) y se concentró hasta 3 ml a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **R4** (41,9 mg, 0,0372 mmol, 62%) en forma de un sólido de color amarillo pálido

HPLC (Procedimiento 2) TR: 7,81 min

35 EM (Procedimiento 3) *m/z*: 1127,7 [M+H]<sup>+</sup>

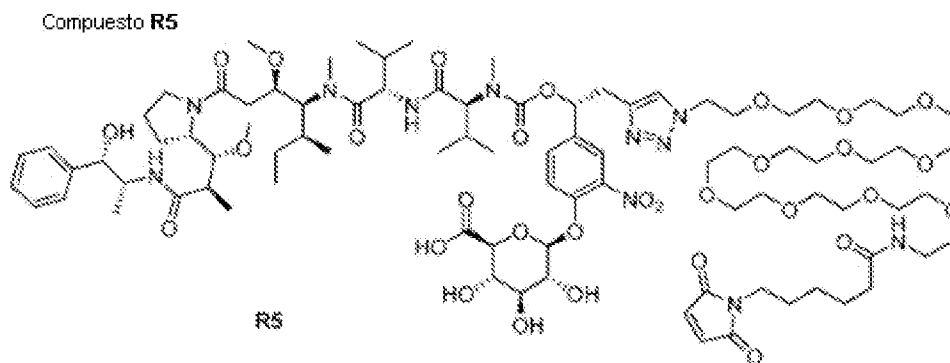




A la solución de **S3** (1 eq., 37,9 mg, 0,055 mmol) y **MMAE** (1 eq., 39,5 mg, 0,055 mmol) en DMF (1,05 ml) se añadió una solución de HOBt (1 eq., 7,43 mg, 0,055 mmol) en piridina (0,263 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, después se diluyó con MeOH (10,5 ml) y se enfrió a 0 °C. A la solución resultante se añadió LiOH (10 eq., 1 M en H<sub>2</sub>O, 0,55 ml, 0,55 mmol) y la mezcla se incubó durante 16 h a 4 °C. La solución resultante se inactivó con HCOOH (20 eq., 1 M en H<sub>2</sub>O, 1, 1 ml, 1, 1 mmol) y se concentró hasta 3 ml a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **S4** (36,6 mg, 0,0325 mmol, 59%) en forma de un sólido de color amarillo pálido

HPLC (Procedimiento 2) TR: 7,66 min

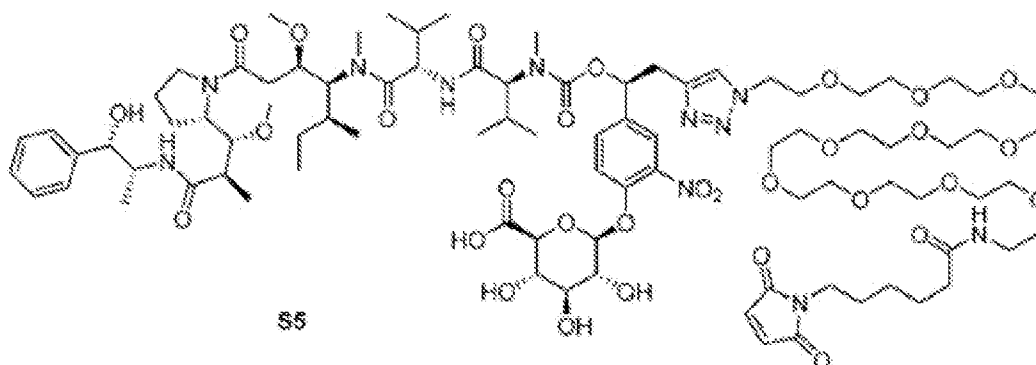
EM (Procedimiento 3) *m/z*: 1127,9 [M+H]<sup>+</sup>



A la solución de 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amina (1,2 eq., 19 mg, 0,036 mmol) en DMF seca (0,5 ml) se añadió 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,2 eq., 11,1 mg, 0,036 mmol). La mezcla se agitó a 21 °C durante 1 hora y después se añadió **R4** (1 eq., 33,8 mg, 0,03 mmol). Se preparó un complejo de TBTA-Cu(II) mezclando tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (0,2 eq., 0,2 M en DMF, 0,03 ml, 0,006 mmol) y sulfato de cobre pentahidratado (0,2 eq., 0,2 M en H<sub>2</sub>O, 0,03 ml, 0,006 mmol) e incubando a 21 °C durante 2 minutos. El complejo TBTA-Cu(II) (0,2 eq., 0,1 M en DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 0,06 ml, 0,006 mmol) se añadió a la mezcla de reacción seguido de ascorbato sódico (1 eq., 1 M en H<sub>2</sub>O, 0,03 ml, 0,03 mmol). La mezcla resultante se incubó a 21 °C durante 1 hora y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar **R5** (30,5 mg, 0,0165 mmol, 55%) en forma de un sólido de color blanco.

HPLC (Procedimiento 2) TR: 6,85 min

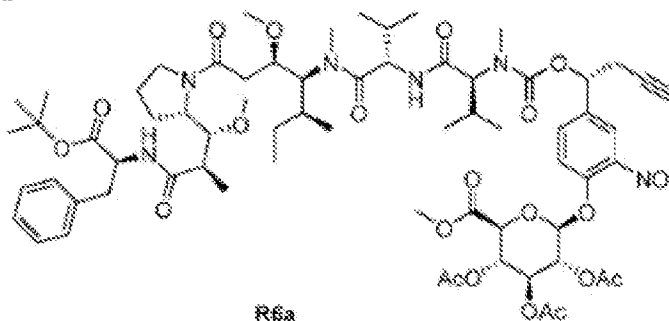
EM (Procedimiento 3) *m/z*: 924,2 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

Compuesto **S5**

5 A la solución de 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amina (1,2 eq., 15,8 mg, 0,03 mmol) en DMF seca (0,417 ml) se añadió 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,2 eq., 9,25 mg, 0,03 mmol). La mezcla se agitó a 21 °C durante 1 hora y después se añadió **S4** (1 eq., 28,2 mg, 0,025 mmol). Se preparó un complejo de TBTA-Cu(II) mezclando tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (0,2 eq., 0,2 M en DMF, 0,025 ml, 0,005 mmol) y sulfato de cobre pentahidratado (0,2 eq., 0,2 M en H<sub>2</sub>O, 0,025 ml, 0,005 mmol) e incubando a 21 °C durante 2 minutos. El complejo TBTA-Cu(II) (0,2 eq., 0,1 M en DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 0,05 ml, 0,005 mmol) se añadió a la mezcla de reacción seguido de ascorbato sódico (1 eq., 1 M, 0,025 ml, 0,025 mmol). La mezcla  
10 resultante se incubó a 21 °C durante 1 hora y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar **S5** (26,8 mg, 0,0145 mmol, 58%) en forma de un sólido de color blanco.

HPLC (Procedimiento 2) TR: 6,65 min

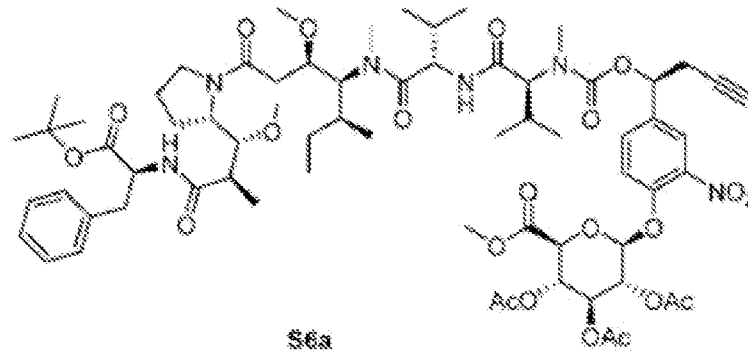
15 EM (Procedimiento 3) *m/z*: 924,1 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

Compuesto **R6a**

20 A la solución de **R3** (1 eq., 41,5 mg, 0,06 mmol) y **MMAF** (1 eq., 47,5 mg, 0,06 mmol) en DMF (1,3 ml) se añadió una solución de HOBt (1 eq., 8,14 mg, 0,06 mmol) en piridina (0,291 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 66 h, se inactivó con HCOOH (3 eq., 6,8 µl, 0,18 mmol) y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **R6a** (57 mg, 0,043 mmol, rendimiento del 71%) en forma de un sólido de color blanco.

25 HPLC (Procedimiento 2) TR: 6,0 min

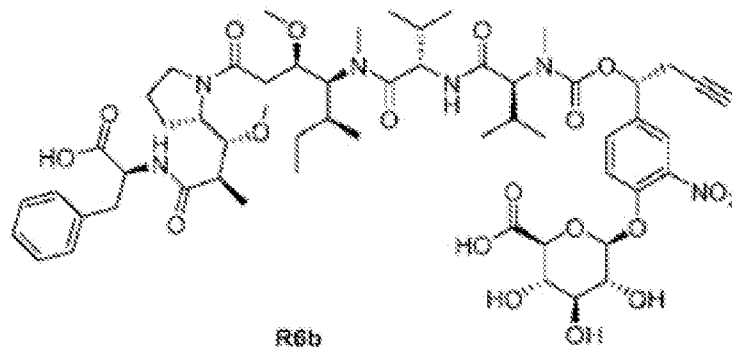
EM (Procedimiento 3) *m/z*: 669,5 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

Compuesto **S6a****S6a**

A la solución de **S3** (1 eq., 41,5 mg, 0,06 mmol) y **MMAF** (1 eq., 47,5 mg, 0,06 mmol) en DMF (1,3 ml) se añadió una solución de HOBt (1 eq., 8,14 mg, 0,06 mmol) en piridina (0,291 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 66 h, se inactivó con HCOOH (3 eq., 6,8  $\mu$ l, 0,18 mmol) y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **S6a** (26,6 mg, 0,02 mmol, rendimiento del 33%) en forma de un sólido de color blanco.

HPLC (Procedimiento 2) TR: 6,0 min

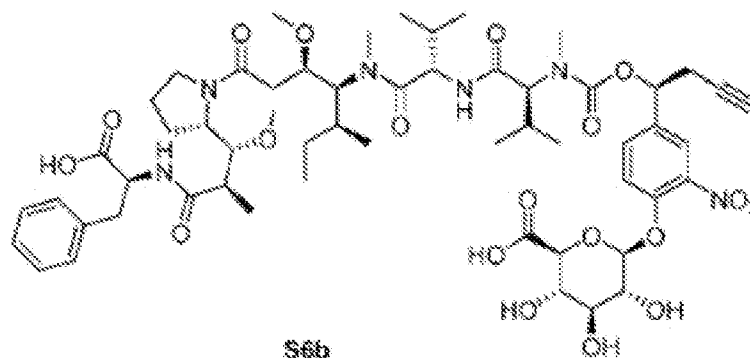
EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 669,4  $[M+2H]^{2+}/2$

Compuesto **R6b****R6b**

A la solución de **R6a** (1 eq., 26,5 mg, 0,02 mmol) en MeCN (233  $\mu$ l) se añadió HCl acuoso concentrado (233  $\mu$ l) y la solución se agitó a 40 °C durante 20 h. La mezcla se diluyó después con 0,5 ml de MeCN y se centrifugó para separar el precipitado. El sobrenadante se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **R6b** (6,7 mg, 5,9  $\mu$ mol, 30% de rendimiento) en forma de un sólido blanquecino.

HPLC (Procedimiento 2) TR: 4,4 min

EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 1141,6  $[M+H]^+$

Compuesto **S6b****S6b**

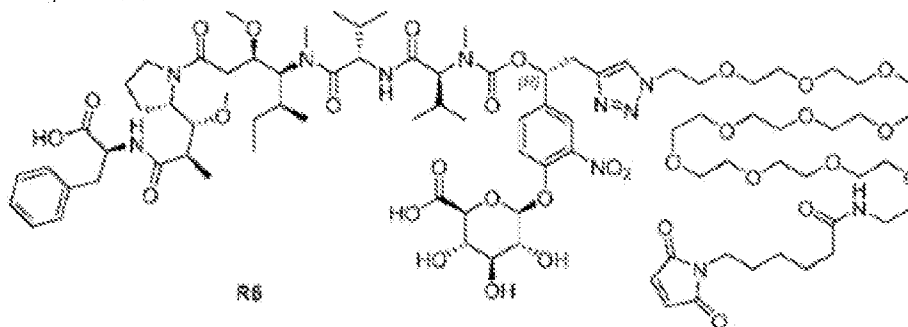
A la solución de **S6a** (1 eq., 26,5 mg, 0,02 mmol) en MeCN (233  $\mu$ l) se añadió HCl acuoso concentrado (233  $\mu$ l) y la solución se agitó a 40 °C durante 20 h. La mezcla se diluyó después con 0,5 ml de MeCN y se centrifugó para separar

el precipitado. El sobrenadante se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **S6b** (10,4 mg, 9,1  $\mu\text{mol}$ , 46% de rendimiento) en forma de un sólido blanquecino.

HPLC (Procedimiento 2) TR: 4,4 min

EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 1141,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$

Compuesto **R6**

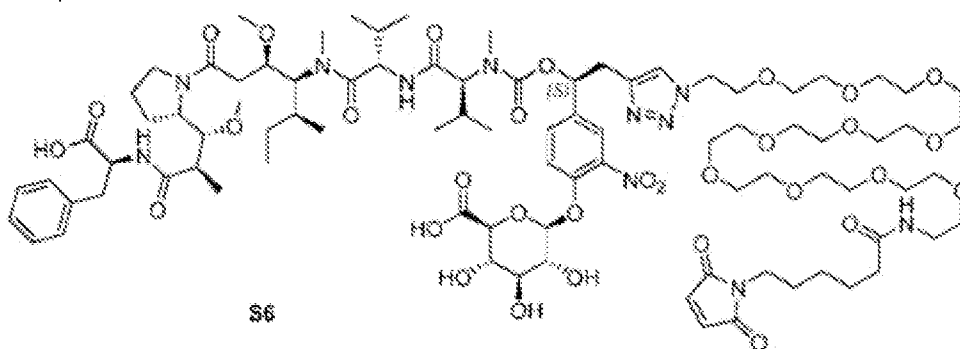


A la solución de 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amina (1,2 eq., 3,53 mg, 6,7  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,15 ml) se añadió una solución de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,2 eq., 2,07 mg, 6,7  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,15 ml). La mezcla se agitó a 21 °C durante 1 hora y después se añadió **R6b** (1 eq., 6,4 mg, 5,6  $\mu\text{mol}$ ) en DMSO (0,15 ml). Se preparó un complejo de THPTA-Cu(II) mezclando tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (1,5 eq., 0,1 M en DMF, 0,084 ml, 8,4  $\mu\text{mol}$ ) y sulfato de cobre pentahidratado (1,5 eq., 0,1 M en H<sub>2</sub>O, 0,084 ml, 8,4  $\mu\text{mol}$ ) e incubando a 21 °C durante 1 minuto. El complejo THPTA-Cu(II) (1,5 eq., 0,05 M en DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 0,168 ml, 8,4  $\mu\text{mol}$ ) se añadió a la mezcla de reacción seguido de ascorbato sódico (7,46 eq., 0,5 M en H<sub>2</sub>O, 0,084 ml, 41,5  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla resultante se incubó a 21 °C durante 15 min y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **R6** (3,7 mg, 1,99  $\mu\text{mol}$ , 36%) en forma de un sólido de color blanco.

HPLC (Procedimiento 2) TR: 4,18 min

EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 931,1  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$

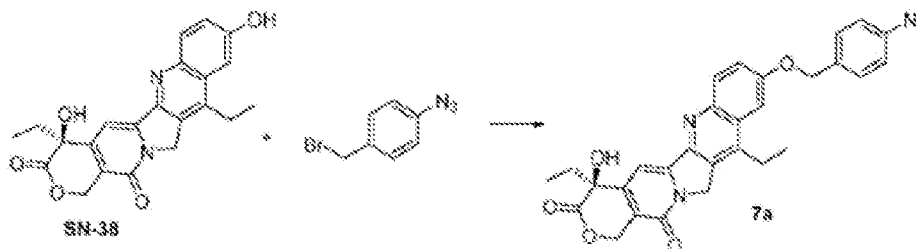
Compuesto **S6**



A la solución de 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amina (1,2 eq., 4,63 mg, 8,8  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,15 ml) se añadió una solución de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,2 eq., 2,71 mg, 8,8  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,15 ml). La mezcla se agitó a 21 °C durante 1 hora y después se añadió **S6b** (1 eq., 8,3 mg, 7,3  $\mu\text{mol}$ ) en DMSO (0,15 ml). Se preparó un complejo de THPTA-Cu(II) mezclando tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (1,5 eq., 0,1 M en DMF, 0,109 ml, 10,9  $\mu\text{mol}$ ) y sulfato de cobre pentahidratado (1,5 eq., 0,1 M en H<sub>2</sub>O, 0,109 ml, 10,9  $\mu\text{mol}$ ) e incubando a 21 °C durante 1 minuto. El complejo THPTA-Cu(II) (1,5 eq., 0,05 M en DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 0,218 ml, 10,9  $\mu\text{mol}$ ) se añadió a la mezcla de reacción seguido de ascorbato sódico (7,46 eq., 0,5 M en H<sub>2</sub>O, 0,109 ml, 54,4  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla resultante se incubó a 21 °C durante 15 min y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **S6** (6,2 mg, 3,33  $\mu\text{mol}$ , 46%) en forma de un sólido de color blanco.

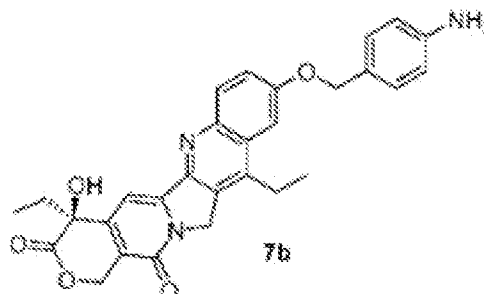
HPLC (Procedimiento 2) TR: 4,14 min

EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 931,1  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$

Compuesto **7a**

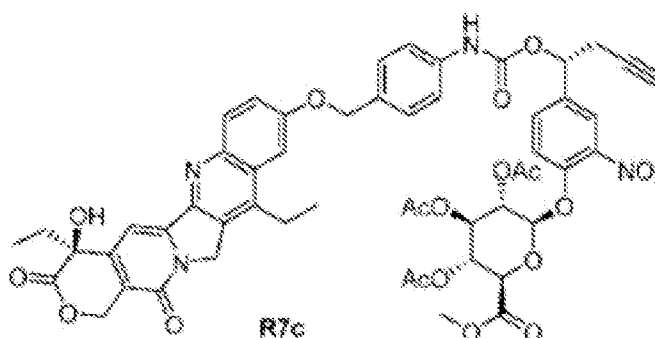
5 A una solución de SN-38 (1 eq., 72,2 mg, 0,18 mmol) y 1-azido-4-(bromometil)benceno (1 eq., 39 mg, 0,18 mmol) en DMF (7,22 ml) se añadió  $K_2CO_3$  (3 eq., 76,3 mg, 0,55 mmol). La solución resultante se purgó con nitrógeno y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente para permitir la formación de **7a**. El **7a** bruto (92 mg, 0,18 mmol, 96%) se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

EM (Procedimiento 3) m/z: 524,2 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **7b**

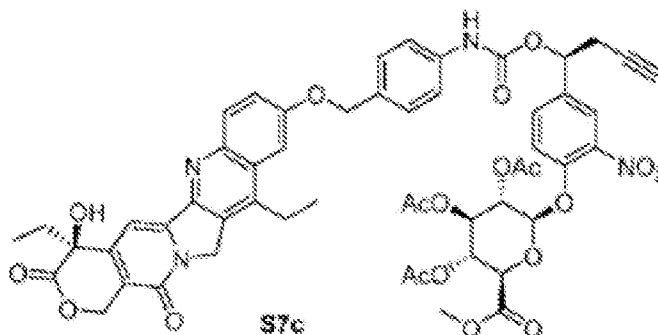
10 A una solución de **7a** (1 eq., 96 mg, 0,18 mmol) en DMF (3 ml) se añadió clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 1,3 eq., 68,33 mg, 0,24 mmol), seguido de la adición de  $K_2CO_3$  (3 eq., 76 mg, 0,55 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora, después se añadieron 5x volúmenes de EtOAc, seguidos de 1x volumen de agua. La capa orgánica se separó, y la capa acuosa se extrajo con otros 5x volúmenes de EtOAc. La capa orgánica combinada se secó sobre  $MgSO_4$  y se concentró al vacío para proporcionar **7b** (90 mg, 0,18 mmol, 99%) en forma de un sólido de color amarillo pálido. El **7b** bruto se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

EM (Procedimiento 3) m/z: 498,2 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **R7c**

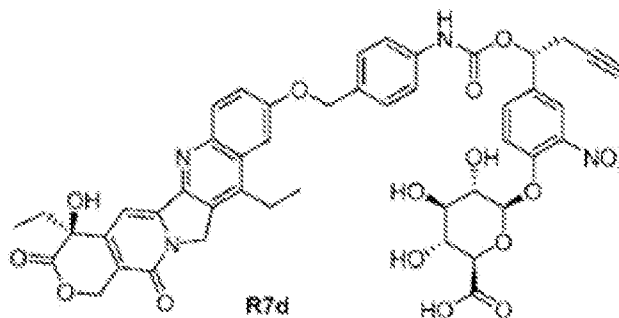
20 Una solución de **R3** (1 eq., 82 mg, 0,12 mmol), **7b** (1 eq., 59 mg, 0,12 mmol) y HOBT (1 eq., 16 mg, 0,12 mmol) se agitó en DMF (2,4 ml) a 25 °C durante 16 horas. La mezcla resultante se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **R7c** (45 mg, 0,043 mmol, 36%) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

25 EM (Procedimiento 3) m/z: 1047,3 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **S7c**

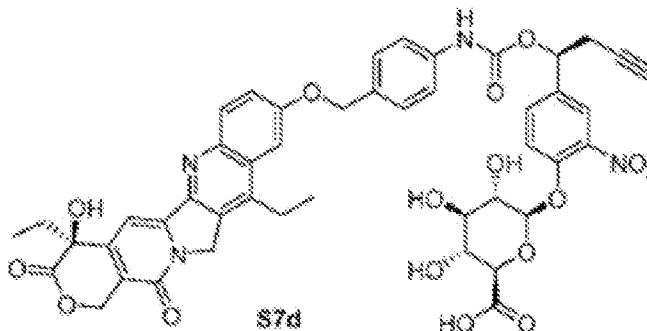
5 Una solución de **S3** (1 eq., 82 mg, 0,12 mmol), **7b** (1 eq., 59 mg, 0,12 mmol) y HOBT (1 eq., 16 mg, 0,12 mmol) se agitó en DMF (2,4 ml) a 25 °C durante 16 horas. La mezcla resultante se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **S7c** (63 mg, 0,06 mmol, 50%) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

EM (Procedimiento 3) m/z: 1047,3 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **R7d**

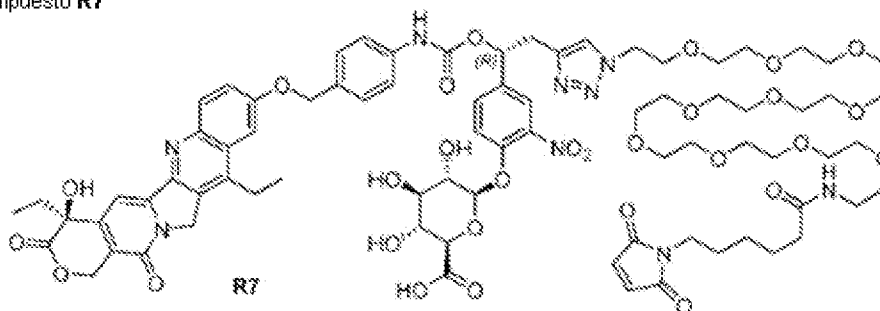
10 A una solución de **R7c** (1 eq., 23 mg, 22 μmol) en MeOH (20 ml) se añadió una solución acuosa 1 M de LiOH (200 eq., 4,4 ml, 4,4 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a 25 °C durante 4 h y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar **R7d** (16 mg, 0,018 mmol, 80%) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

15 EM (Procedimiento 3) m/z: 907,3 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **S7d**

20 A una solución de **S7c** (1 eq., 23 mg, 22 μmol) en MeOH (20 ml) se añadió una solución acuosa 1 M de LiOH (200 eq., 4,4 ml, 4,4 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a 25 °C durante 4 h y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar **S7d** (13,9 mg, 0,016 mmol, 69,6%) en forma de un sólido de color amarillo pálido.

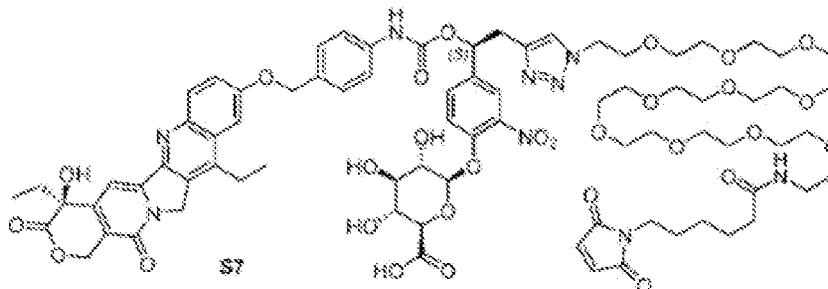
EM (Procedimiento 3) m/z: 907,3 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **R7**

5 A la solución de 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amina (1,5 eq., 5,92 mg, 11,3  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,1 ml) se añadió una solución de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,5 eq., 3,47 mg, 11,3  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,1 ml). La mezcla se agitó a 21 °C durante 1 hora y después se añadió **R7d** (1 eq., 6,8 mg, 7,5  $\mu\text{mol}$ ) en DMSO (0,1 ml). Se preparó un complejo de THPTA-Cu(II) mezclando tris(3-hidroxiopropiltriazolilmetil)amina (0,5 eq., 0,1 M en DMF, 37,5  $\mu\text{l}$ , 3,75  $\mu\text{mol}$ ) y sulfato de cobre pentahidratado (0,5 eq., 0,1 M en H<sub>2</sub>O, 37,5  $\mu\text{l}$ , 3,75  $\mu\text{mol}$ ) e incubando a 21 °C durante 1 minuto. El complejo THPTA-Cu(II) (0,5 eq., 0,05 M en DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 37,5  $\mu\text{l}$ , 3,75  $\mu\text{mol}$ ) se añadió a la mezcla de reacción seguido de ascorbato sódico (2,5 eq., 0,5 M en H<sub>2</sub>O, 37,5  $\mu\text{l}$ , 18,75  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla resultante se incubó a 21 °C durante 15 min y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **R7** (6,95 mg, 4,28  $\mu\text{mol}$ , 57%) en forma de un sólido de color blanco.

HPLC (Procedimiento 2) TR: 3,92 min

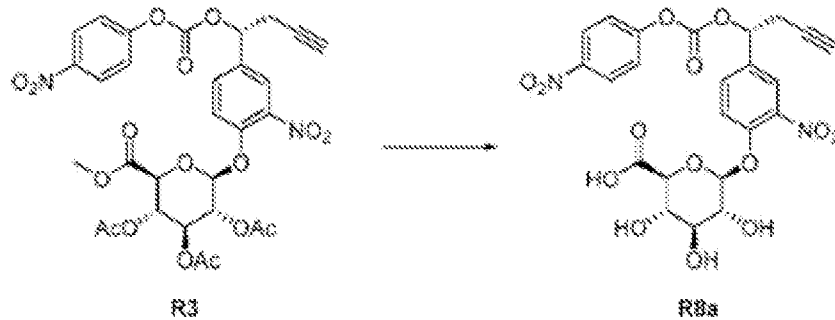
15 EM (Procedimiento 3) *m/z*: 813,9 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

Compuesto **S7**

20 A la solución de 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amina (1,5 eq., 5,92 mg, 11,3  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,1 ml) se añadió una solución de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,5 eq., 3,47 mg, 11,3  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,1 ml). La mezcla se agitó a 21 °C durante 1 hora y después se añadió **S7d** (1 eq., 6,8 mg, 7,5  $\mu\text{mol}$ ) en DMSO (0,1 ml). Se preparó un complejo de THPTA-Cu(II) mezclando tris(3-hidroxiopropiltriazolilmetil)amina (0,5 eq., 0,1 M en DMF, 37,5  $\mu\text{l}$ , 3,75  $\mu\text{mol}$ ) y sulfato de cobre pentahidratado (0,5 eq., 0,1 M en H<sub>2</sub>O, 37,5  $\mu\text{l}$ , 3,75  $\mu\text{mol}$ ) e incubando a 21 °C durante 1 minuto. El complejo THPTA-Cu(II) (0,5 eq., 0,05 M en DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 37,5  $\mu\text{l}$ , 3,75  $\mu\text{mol}$ ) se añadió a la mezcla de reacción seguido de ascorbato sódico (2,5 eq., 0,5 M en H<sub>2</sub>O, 37,5  $\mu\text{l}$ , 18,75  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla resultante se incubó a 21 °C durante 15 min y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **S7** (7,44 mg, 4,58  $\mu\text{mol}$ , 61%) en forma de un sólido de color blanco.

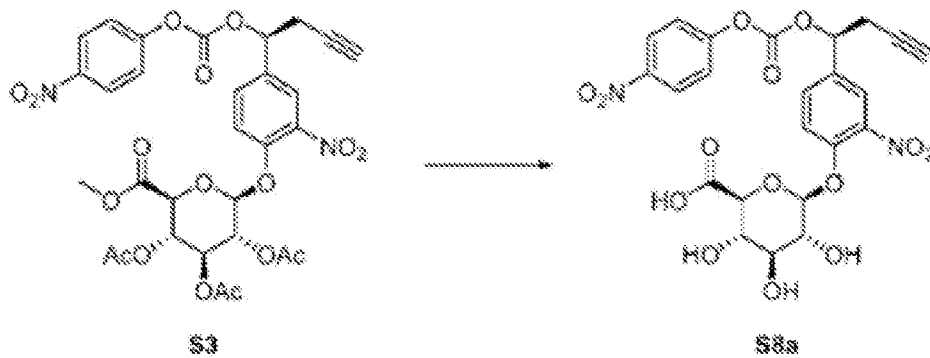
HPLC (Procedimiento 2) TR: 3,95 min

30 EM (Procedimiento 3) *m/z*: 813,9 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

Compuesto **R8a**

5 A una solución de **R3** (1 eq., 317 mg, 0,46 mmol) en acetonitrilo (2 ml) se añadió HCl concentrado (52,2 eq., 2 ml, 24 mmol) y la mezcla se agitó a 37 °C durante 16 h. A la mezcla resultante se añadió EtOAc (8 ml), seguido de la adición de agua (8 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo tres veces con EtOAc. La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para proporcionar el **R8a** bruto (250 mg, 0,46 mmol, 99%), que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

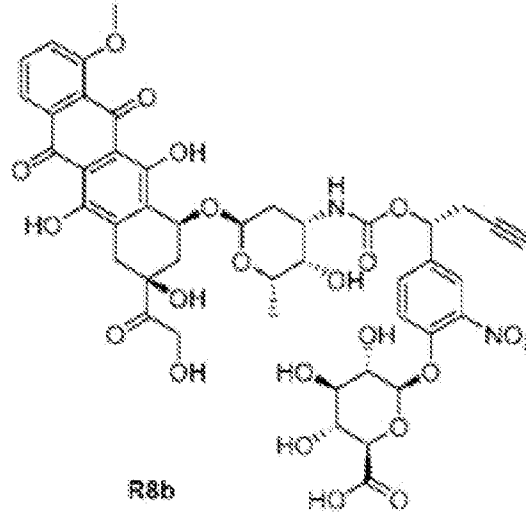
EM (Procedimiento 3) m/z: 549,1 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **S8a**

10 A una solución de **S3** (1 eq., 317 mg, 0,46 mmol) en acetonitrilo (2 ml) se añadió HCl concentrado (52,2 eq., 2 ml, 24 mmol) y la mezcla se agitó a 37 °C durante 16 h. A la mezcla resultante se añadió EtOAc (8 ml), seguido de la adición de agua (8 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo tres veces con EtOAc. La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para proporcionar el **S8a** bruto (247 mg, 0,45 mmol, 98%), que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

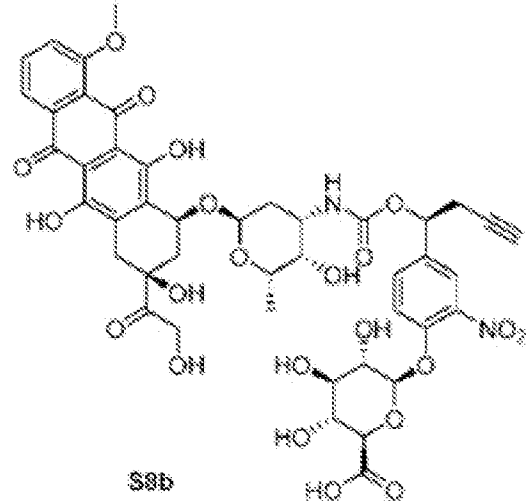
15 EM (Procedimiento 3) m/z: 549,1 [M+H]<sup>+</sup>



Compuesto **R8b****R8b**

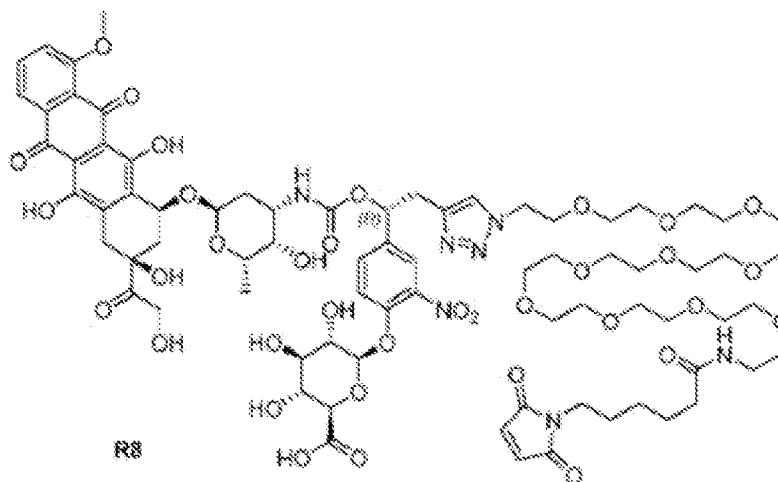
5 A una solución de clorhidrato de doxorubicina (1 eq., 10 mg, 0,017 mmol) en DMF (0,35 ml) se añadió una solución de TEA (2 eq., 0,35 ml, 0,1 M en DMF, 0,035 mmol), seguido de la adición de **R8a** (1 eq., 9,5 mg, 0,017 mmol). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 16 h y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **R8b** (12,2 mg, 0,013 mmol, 74%) en forma de un sólido de color rojo.

EM (Procedimiento 3) m/z: 953,3 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **S8b****S8b**

10 A una solución de clorhidrato de doxorubicina (1 eq., 10 mg, 0,017 mmol) en DMF (0,35 ml) se añadió una solución de TEA (2 eq., 0,35 ml, 0,1 M en DMF, 0,035 mmol), seguido de la adición de **S8a** (1 eq., 9,5 mg, 0,017 mmol). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 16 h y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **S8b** (13,2 mg, 0,014 mmol, 80%) en forma de un sólido de color rojo.

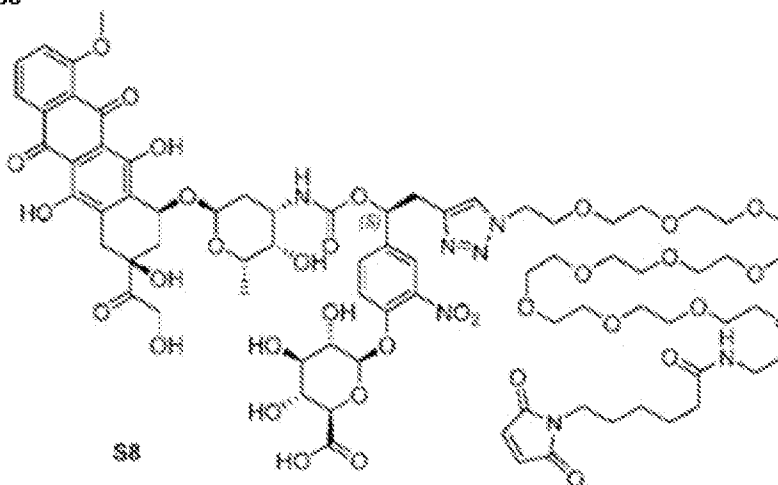
15 EM (Procedimiento 3) m/z: 953,3 [M+H]<sup>+</sup>

Compuesto **R8**

5 A la solución de 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amina (1,5 eq., 11,82 mg, 22,45  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,2 ml) se añadió una solución de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,5 eq., 6,92 mg, 22,45  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,2 ml). La mezcla se agitó a 21 °C durante 1 hora y después se añadió **R8b** (1 eq., 12 mg, 14,97  $\mu\text{mol}$ ) en DMSO (0,2 ml). Se preparó un complejo de THPTA-Cu(II) mezclando tris(3-hidroxiopropiltriazolilmetil)amina (1 eq., 0,1 M en DMF, 150  $\mu\text{l}$ , 14,97  $\mu\text{mol}$ ) y sulfato de cobre pentahidratado (1 eq., 0,1 M en H<sub>2</sub>O, 150  $\mu\text{l}$ , 14,97  $\mu\text{mol}$ ) e incubando a 21 °C durante 1 minuto. El complejo THPTA-Cu(II) (1 eq., 0,05 M en DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 300  $\mu\text{l}$ , 14,97  $\mu\text{mol}$ ) se añadió a la mezcla de reacción seguido de ascorbato sódico (2 eq., 0,5 M en H<sub>2</sub>O, 60  $\mu\text{l}$ , 29,94  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla resultante se incubó a 21 °C durante 15 min y se purificó por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **R8** (14,35 mg, 9,43  $\mu\text{mol}$ , 63%) en forma de un sólido de color rojo.

15 HPLC (Procedimiento 2) TR: 3,70 min

EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 836,9  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2$

Compuesto **S8**

Fórmula química:  $\text{C}_{78}\text{H}_{112}\text{N}_7\text{O}_{35}$   
Masa exacta: 1671,63

20 A la solución de 32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontan-1-amina (1,5 eq., 11,82 mg, 22,45  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,2 ml) se añadió una solución de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,5 eq., 6,92 mg, 22,45  $\mu\text{mol}$ ) en DMF seca (0,2 ml). La mezcla se agitó a 21 °C durante 1 hora y después se añadió **S8b** (1 eq., 12 mg, 14,97  $\mu\text{mol}$ ) en DMSO (0,2 ml). Se preparó un complejo de THPTA-Cu(II) mezclando tris(3-hidroxiopropiltriazolilmetil)amina (1 eq., 0,1 M en DMF, 150  $\mu\text{l}$ , 14,97  $\mu\text{mol}$ ) y sulfato de cobre pentahidratado (1 eq., 0,1 M en H<sub>2</sub>O, 150  $\mu\text{l}$ , 14,97  $\mu\text{mol}$ ) e incubando a 21 °C durante 1 minuto. El complejo THPTA-Cu(II) (1 eq., 0,05 M en DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 300  $\mu\text{l}$ , 14,97  $\mu\text{mol}$ ) se añadió a la mezcla de reacción seguido de ascorbato sódico (2 eq., 0,5 M en H<sub>2</sub>O, 60  $\mu\text{l}$ , 29,94  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla resultante se incubó a 21 °C durante 15 min y se purificó

25

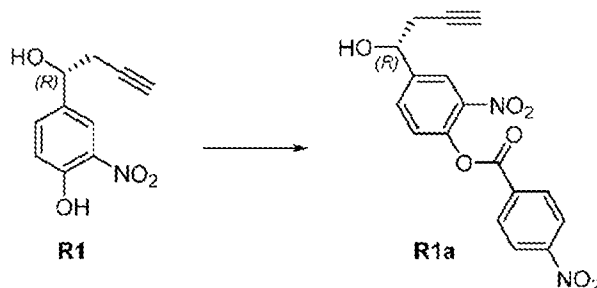
por HPLC preparativa (procedimiento 1) para proporcionar **S8** (15,5 mg, 10,18  $\mu$ mol, 68%) en forma de un sólido de color rojo.

HPLC (Procedimiento 2) TR: 3,65 min

EM (Procedimiento 3)  $m/z$ : 836,9  $[M+2H]^{2+}/2$

Determinación de la configuración absoluta de R1 a R1a, mediante cristalografía de rayos X

#### 1) Preparación de R1a



Para determinar la configuración absoluta de **R1**, se sintetizó el éster **R1a**, se cristalizó y se analizó mediante cristalografía de rayos X. A una solución enfriada a 0 °C de **R1** (1 eq., 111 mg, 0,536 mmol) y trietilamina (2 eq., 108 mg, 0,149 ml, 1,07 mmol) en THF (3,61 ml) se añadió gota a gota una solución de cloruro de 4-nitrobenzoilo (1,5 eq., 149 mg, 0,804 mmol) en THF (3,61 ml). La solución resultante se calentó a temperatura ambiente y se dejó durante 30 minutos. Se añadió acetato de etilo (22 ml) seguido de la adición de 7 ml de agua. La capa orgánica se separó y se lavó con solución saturada de NaCl. La capa orgánica se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de ciclohexano/EtOAc del 0-100% de EtOAc en 20 minutos; 30 volúmenes de columna) para proporcionar **R1a** (60,5 mg, 0,17 mmol, 88% de rendimiento).

#### 2) Determinación de la configuración absoluta de R1a mediante cristalografía de rayos X

Se disolvió R1a (60 mg) en 3 ml de diclorometano y se diluyó con 3 ml de heptano. La mezcla se dejó evaporar lentamente durante un periodo de 2 semanas, induciendo la formación de cristales de **R1a**. Los cristales se colocaron en aceite, y se seleccionó un monocristal de placa incoloro de dimensiones 0,50 × 0,40 × 0,18 mm, se montó en una fibra de vidrio y se dispuso en una corriente de N<sub>2</sub> a baja temperatura. La recogida de datos de difracción de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro Bruker APEX II DUO Kappa-CCD equipado con un dispositivo de N<sub>2</sub> líquido Oxford Cryosystem, usando radiación Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54178$  Å). La distancia cristal-detector fue de 40 mm. Los parámetros de la celda se determinaron (programa informático APEX3) a partir de reflexiones tomadas de tres conjuntos de 20 marcos, cada uno a una exposición de 10 s. La estructura se resolvió usando el programa SHELXT-2014. El refinamiento y todos los cálculos adicionales se llevaron a cabo usando SHELXL-2014. El átomo de hidrógeno de un grupo OH se localizó a partir de la diferencia de Fourier. Los otros átomos H se incluyeron en posiciones calculadas y se trataron como átomos montados (*riding atoms*) usando parámetros por defecto de SHELXL. Los átomos distintos de H se refinaron anisotrópicamente, usando mínimos cuadrados ponderados de matriz completa en F<sup>2</sup>. Se aplicó una corrección de absorción semiempírica usando SADABS en APEX3; factores de transmisión:  $T_{\min}/T_{\max} = 0,6111/0,7528$ .

Los resultados de la cristalografía de rayos X se presentan en la figura 1.

#### Medición de la cinética de la liberación de MMAE inducida por $\beta$ -glucuronidasa

- La solución de muestra del isómero R se preparó añadiendo 10  $\mu$ l de **R5** (10 mM en DMSO) a 990  $\mu$ l de plasma humano e incubando a 37 °C durante 20 min.
- La solución de muestra del isómero S se preparó añadiendo 10  $\mu$ l de **S5** (10 mM en DMSO) a 990  $\mu$ l de plasma humano e incubando a 37 °C durante 20 min.
- La solución de inactivación (**Q**) se preparó añadiendo 50  $\mu$ l de HCl acuoso 1 M a 1,5 ml de acetonitrilo.
- La solución de  $\beta$ -glucuronidasa (**Glu**) se preparó añadiendo 20  $\mu$ l de solución acuosa en glicerol de  $\beta$ -glucuronidasa de *Escherichia coli* (6,5 mg/ml) a 180  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.
- La solución de referencia (**Ref**) se preparó añadiendo 10  $\mu$ l de **MMAE** (10 mM en DMSO) a 990  $\mu$ l de plasma humano e incubando a 37 °C durante 20 min.

A 1 ml de cada isómero y solución de referencia se añadieron 40,9  $\mu$ l de **Glu**. Las mezclas resultantes se incubaron a 37 °C. Se inactivaron partes alícuotas de 45  $\mu$ l de cada solución con 155  $\mu$ l de **Q** en los siguientes puntos temporales: 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min y 7 min. Las partes alícuotas inactivadas se centrifugaron a 15000 g durante 5 min y el sobrenadante se analizó por CL-EM (Procedimiento 3) con un conjunto de registro iónico seleccionado de

719 Da (correspondiente a [MMAE+H]<sup>+</sup>). La cantidad de MMAE liberada en cada punto temporal se calculó como (área del pico de la muestra)/(área del pico de referencia) × 100% (figura 2).

Procedimiento general para la medición de la cinética de la liberación inducida por β-glucuronidasa de un fármaco citotóxico

- La solución de muestra de isómeros R se preparó añadiendo 5 µl de compuestos **R6**, **R7** o **R8** (10 mM en DMSO) a 500 µl de una mezcla 50/50 de plasma humano y tampón de fosfato de potasio (0,1 M, pH 7,0) e incubando a 37 °C durante 20 min.
- La solución de muestra de isómeros S se preparó añadiendo 5 µl de compuestos **S6**, **S7** o **S8** (10 mM en DMSO) a 500 µl de una mezcla 50/50 de plasma humano y tampón de fosfato de potasio (0,1 M, pH 7,0) e incubando a 37 °C durante 20 min.
- La solución de inactivación (**Q**) se preparó añadiendo 50 µl de HCl acuoso 1 M a 1,5 ml de acetonitrilo.
- La solución de β-glucuronidasa (**Glu**) se preparó añadiendo 20 µl de solución acuosa en glicerol de β-glucuronidasa de *Escherichia coli* (6,5 mg/ml) a 180 µl de H<sub>2</sub>O.
- La solución de referencia (**Ref**) se preparó añadiendo 5 µl de un fármaco citotóxico libre correspondiente (10 mM en DMSO) a 500 µl de una mezcla 50/50 de plasma humano y tampón de fosfato de potasio (0,1 M, pH 7,0) e incubando a 37 °C durante 20 min.

A cada muestra y solución de referencia se añadieron 10 µl de **Glu**. Las mezclas resultantes se incubaron a 25 °C. Se inactivaron partes alícuotas de 45 µl de cada solución con 155 µl de **Q** en los puntos temporales precisos indicados en los gráficos (figuras 3-5). Las partes alícuotas inactivadas se centrifugaron a 15000 g durante 5 min y el sobrenadante se analizó por CL-EM (procedimiento 3) con el registro iónico seleccionado ajustado a [M+H]<sup>+</sup>, en el que M corresponde a la masa molecular del agente citotóxico libre. La cantidad de agente citotóxico liberado en cada punto temporal se calculó como (área del pico de la muestra)/(área del pico de referencia) × 100%.

Los resultados se ilustran en las figuras 2 a 5:

Figura 2. La cinética de la liberación de MMAE inducida por la β-glucuronidasa en soluciones plasmáticas de **R5** y **S5** demuestra una escisión significativamente más rápida de **R5** unido a plasma, en comparación con **S5**: después de 7 minutos de incubación, se liberó el 24% de MMAE de **R5** unido a plasma y solo el 12% de **S5** unido a plasma.

Figura 3. La cinética de la liberación de MMAF inducida por la β-glucuronidasa en soluciones plasmáticas de **R6** y **S6** demuestra una escisión significativamente más rápida de **R6** unido a plasma, en comparación con **S6**: después de 40 minutos de incubación, se liberó el 86% de MMAF de **R6** unido a plasma y solo el 57% de **S6** unido a plasma.

Figura 4. La cinética de la liberación de SN-38 inducida por la β-glucuronidasa en soluciones plasmáticas de **R7** y **S7** demuestra una escisión más rápida de **R7** unido a plasma, en comparación con **S7**: después de 40 minutos de incubación, se liberó el 24% de SN-38 de **R7** unido a plasma y solo el 18% de **S7** unido a plasma.

Figura 5. La cinética de la liberación de doxorubicina inducida por la β-glucuronidasa en soluciones plasmáticas de **R8** y **S8** demuestra una escisión más rápida de **R8** unido a plasma, en comparación con **S8**: después de 40 minutos de incubación, se liberó el 99% de doxorubicina de **R8** unido a plasma y el 80% de **S8** unido a plasma.

Medición de la estabilidad de R5 y S5 en tampón acuoso a pH 7,4

- La solución de muestra de **R5-PBS** se preparó añadiendo 20 µl de **R5** (10 mM en DMSO) a 180 µl de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4).
- La solución de muestra de **S5-PBS** se preparó añadiendo 20 µl de **S5** (10 mM en DMSO) a 180 µl de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4).
- Las muestras se incubaron a 25 °C y se analizaron por CL-EM (procedimiento 3) con un conjunto de registro iónico seleccionado de 924 Da (correspondiente a [R5+2H]<sup>2+</sup>/2 y [S5+2H]<sup>2+</sup>/2) y a 933 Da (formándose la impureza principal correspondiente a los productos hidrolizados [R5+H<sub>2</sub>O+2H]<sup>2+</sup>/2 y [S5+H<sub>2</sub>O+2H]<sup>2+</sup>/2). Las muestras se inyectaron en los siguientes puntos temporales: 0 min, 99 min, 195 min, 291 min, 387 min, 543 min, 699 min, 855 min, 980 min. Las áreas de pico de las muestras inyectadas a los 0 min se consideraron como áreas de pico de referencia.
- El % de área de pico se calculó como (924 Da de área de pico)/((924 Da de área de pico) + (933 Da de área de pico)) × 100%.

Los resultados se ilustran en la figura 6. Para ambas muestras, se observó una hidrólisis lenta del compuesto (**R5** o **S5**) a pH 7,4: el 30-40% del compuesto se hidroliza después de 1000 minutos.

El mismo experimento se llevó a cabo en solución salina tamponada con fosfato a pH 6,0. No se observó degradación de **R5** o **S5** en estas condiciones en ningún punto temporal.

Cinética de unión a plasma de **R5** y **S5**

- 5 • La solución de inactivación (**Q**) se preparó añadiendo 50 µl de HCl acuoso 1 M a 1,5 ml de acetonitrilo.
- 5 • La solución de muestra de **R-Alb** se preparó añadiendo 10 µl de **R5** (10 mM en DMSO) a 990 µl de plasma humano e incubando a 37 °C.
- 10 • La solución de muestra de **S-Alb** se preparó añadiendo 10 µl de **S5** (10 mM en DMSO) a 990 µl de plasma humano e incubando a 37 °C.
- 10 • Se añadieron partes alícuotas de 45 µl de cada solución de muestra a 155 µl de la solución de inactivación en los siguientes puntos temporales: 0 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min.
- 10 • Las partes alícuotas inactivadas se centrifugaron a 15000 g durante 5 min y el sobrenadante se analizó por CL-EM (procedimiento 3) con un conjunto de registro iónico seleccionado de 924 Da (correspondiente a  $[R5+2H]^{2+}/2$  y  $[S5+2H]^{2+}/2$ ). Las áreas de pico de las partes alícuotas inactivadas a 0 min se consideraron como áreas de pico de referencia.
- 15 • El % de fármaco libre remanente en cada punto temporal se calculó como (área del pico de la muestra)/(área del pico de referencia) × 100%.

20 Ambos compuestos **R5** y **S5** se someten a una reacción de unión rápida con albúmina sérica, dando como resultado una disminución pronunciada de la concentración de su forma libre, tal como se muestra en la figura 7. Después de 2 minutos de incubación, aproximadamente el 90% de **S5** o **R5** se unió a albúmina de suero, y se obtuvo una conversión total después de 4 minutos.

Estabilidad plasmática de **R5** y **S5** unidos a albúmina

- 25 • La solución de muestra de **R5-Alb** se preparó añadiendo 10 µl de **R5** (10 mM en DMSO) a 990 µl de plasma humano.
- 25 • La solución de muestra de **S5-Alb** se preparó añadiendo 10 µl de **S5** (10 mM en DMSO) a 990 µl de plasma humano.
- 30 • La solución de inactivación (**Q**) se preparó añadiendo 50 µl de HCl acuoso 1 M a 1,5 ml de acetonitrilo.
- 30 • La solución de referencia (**Ref**) se preparó añadiendo 10 µl de **MMAE** (10 mM en DMSO) a 990 µl de plasma humano.
- 30 • Las soluciones de muestra y la solución de referencia se incubaron a 37 °C.
- 30 • Se añadieron partes alícuotas de 45 µl de cada solución de muestra a 155 µl de la solución de inactivación en los siguientes puntos temporales: 0 h, 8 h, 24 h, 48 h, 102 h, 192 h.
- 35 • Las partes alícuotas inactivadas se centrifugaron a 15000 g durante 5 min y el sobrenadante se analizó por CL-EM (procedimiento 3) con un conjunto de registro iónico seleccionado de 719 Da (correspondiente a  $[MMAE+H]^+$ ).
- 35 • El % de MMAE liberado en cada punto temporal se calculó como (área del pico de la muestra)/(área del pico de referencia) × 100%.

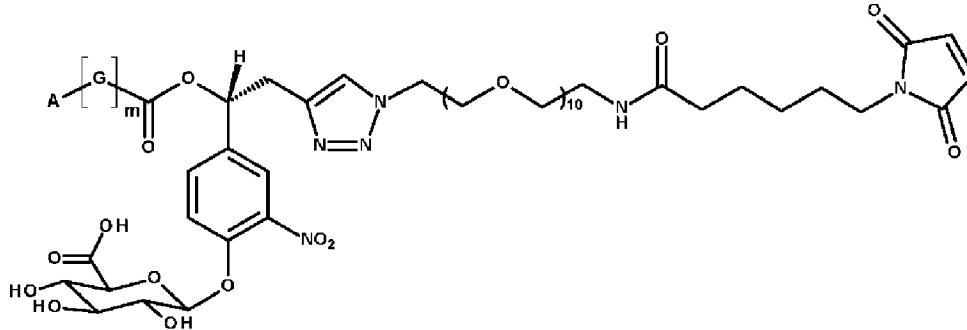
40 Tal como se muestra en la figura 8, **R5** y **S5** unidos a albúmina permanecen estables en plasma, ya que solo se liberaron cantidades traza del fármaco citotóxico (MMAE) tras la incubación a largo plazo (menos del 10% después de 192 horas, es decir, 8 días, de incubación).

Ensayos de separación

- 45 Se llevó a cabo un ensayo que tenía como objetivo separar los compuestos **R5** y **S5** en una mezcla 1:1 mediante HPLC según el procedimiento 2, pero demostró ser insatisfactorio: tal como se muestra en la figura 9, se obtuvieron TR muy próximas de 6,72 y 6,83 minutos.
- 50 Se llevó a cabo un ensayo similar con una mezcla 1:1 de **R4** y **S4**, pero la separación también demostró ser insatisfactoria, ya que se obtuvieron TR de 7,56 y 7,72 minutos (figura 10).

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado representado por la fórmula (I)



5

(I),

en la que

A representa un radical derivado de un fármaco citotóxico,

10

G es un resto autoinmolante, y

m es 0 o 1,

15

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

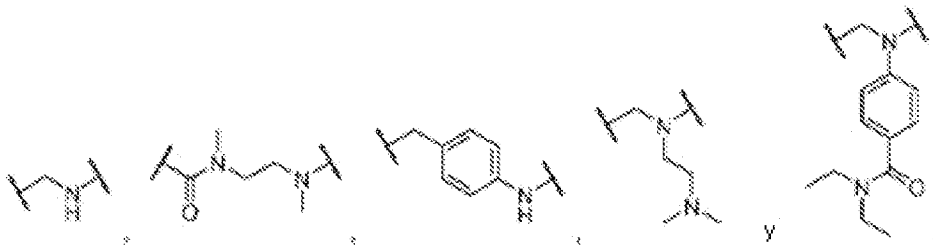
2. Un conjugado según la reivindicación 1, en el que el fármaco citotóxico se selecciona de entre antraciclinas, tales como doxorubicina, dolastatinas tales como dolastatina 10, dolastatina 15, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatina F (MMAF), monometil auristatina D (MMAD), monometil auristatina E (MMAE), éster de AE del ácido 5-benzoilvalérico (AEVB) y análogos de camptotecina elegidos de entre camptotecina, SN-38, topotecán, irinotecán, exatecán, silatecán, cositecán, lurtotecán, gimatecán, belotecán y rubitecán.

20

3. Un conjugado según la reivindicación 2, en el que el fármaco citotóxico se selecciona del grupo que consiste en SN-38, doxorubicina, MMAF, MMAE y MMAD.

25

4. Un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que G está representado por una fórmula seleccionada de:



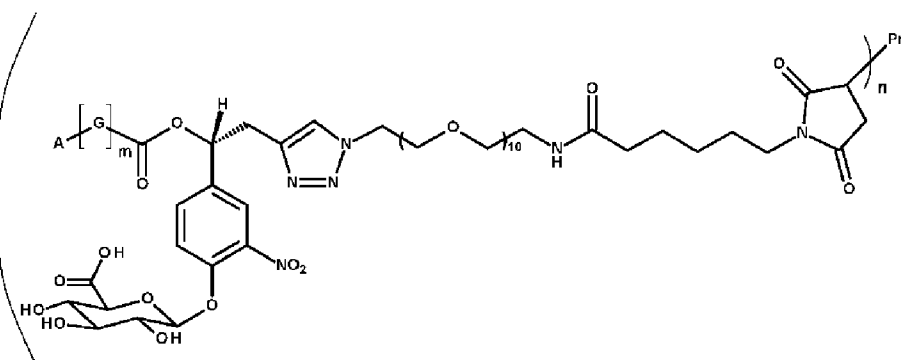
30

5. Un profármaco que comprende al menos una molécula del conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, estando unida dicha molécula del conjugado por un enlace covalente a una molécula proteica, preferentemente albúmina, o un fragmento de la misma, en la que un "profármaco" se refiere a al menos un conjugado unido covalentemente a una macromolécula.

35

6. El profármaco según la reivindicación 5, en el que el enlace covalente se establece con la función tiol de la cisteína en posición 34 de la albúmina.

7. El profármaco según la reivindicación 5, representado por la fórmula (II),



(II),

en la que

- 5 A representa un radical derivado de un fármaco citotóxico,  
 Prt representa un radical que se deriva de una proteína,  
 n está comprendido entre 0,1 y 16, preferentemente entre 0,1 y 8,  
 10 G es un resto autoinmolante, y  
 m es 0 o 1,  
 15 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
8. El profármaco según la reivindicación 7, en el que Prt representa un radical que se deriva de albúmina y n es 1.
9. Una composición farmacéutica que comprende al menos una cantidad eficaz de al menos un conjugado tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o al menos un profármaco tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 10. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de un cáncer y/o una enfermedad inflamatoria.
- 25 11. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para su uso en el tratamiento de un cáncer y/o una enfermedad inflamatoria.
- 30 12. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de un cáncer y/o una enfermedad inflamatoria.
13. Un proceso de preparación de un conjugado tal como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas siguientes:
- 35 a) preparar *rac*-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol a partir de 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído;  
 b) separar y aislar (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol, preferentemente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento quiral;  
 40 c) hacer reaccionar (R)-4-(1-hidroxibut-3-in-1-il)-2-nitro-fenol con un derivado de ácido glucurónico, tal como acetobromo- $\alpha$ -D-glucuronato de metilo, en condiciones básicas;  
 d) hacer reaccionar el compuesto obtenido en la etapa (c) con cloroformiato de 4-nitrofenilo;  
 45 e) acoplar el compuesto obtenido en la etapa (d) con un fármaco citotóxico o con un resto A-G-H, en el que A representa un radical que se deriva de un fármaco citotóxico y G representa un resto autoinmolable;  
 f) desproteger el resto glucurónido del compuesto obtenido en la etapa (e), preferentemente en condiciones básicas;  
 y  
 50 g) acoplar el compuesto obtenido en la etapa (f) con una azida de fórmula  $N_3-(CH_2-CH_2-O)_{10}-(CH_2)_2-NH-(CO)-(CH_2)_5-X$ , en la que X es un grupo maleimida.

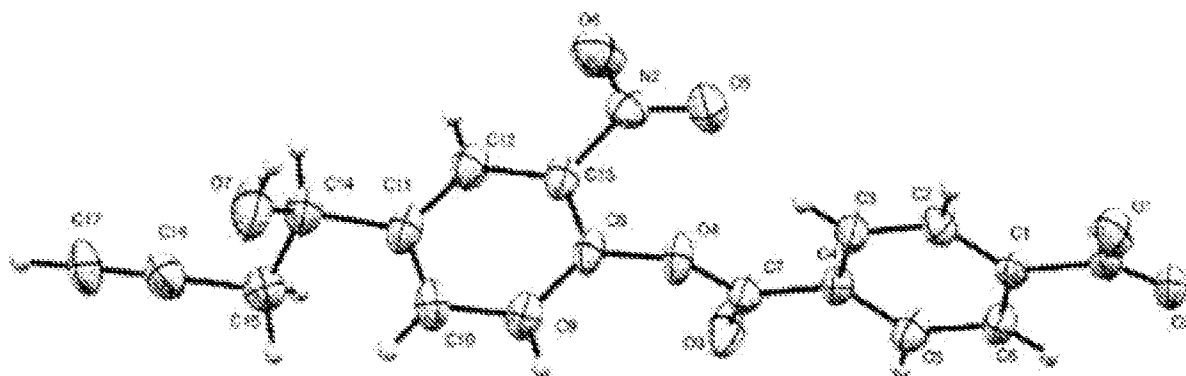


Figura 1

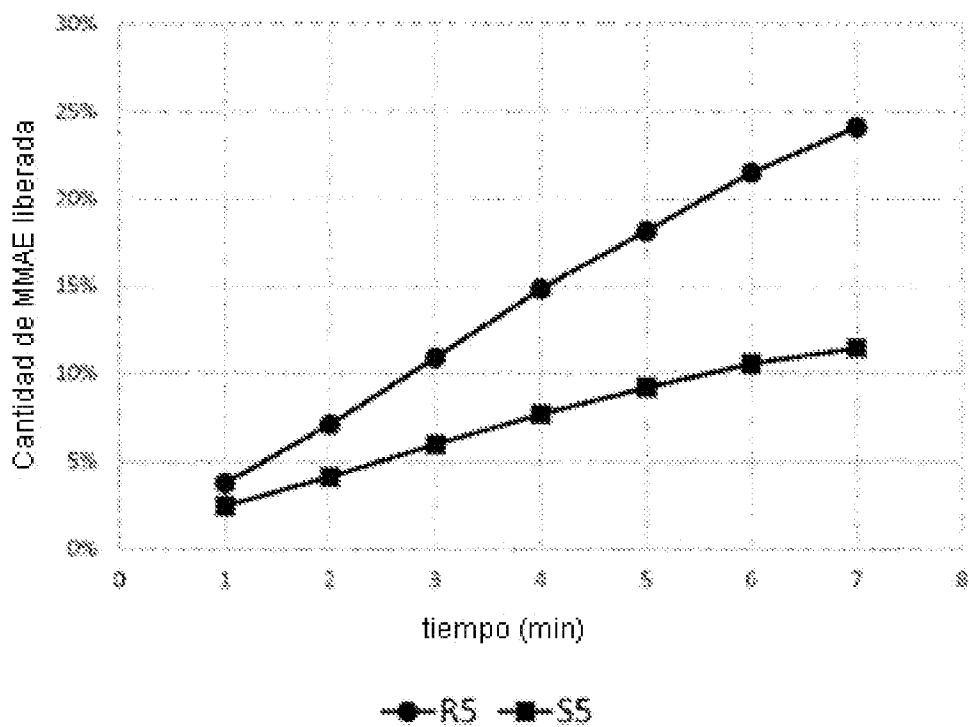


Figura 2



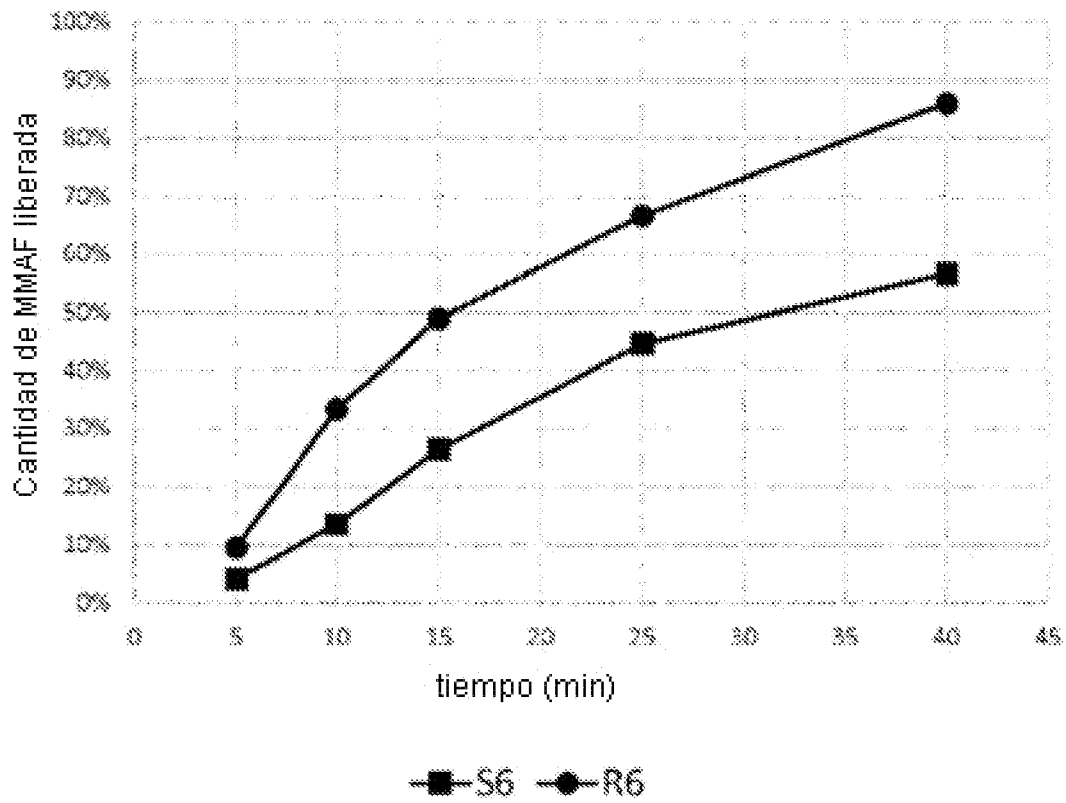


Figura 3

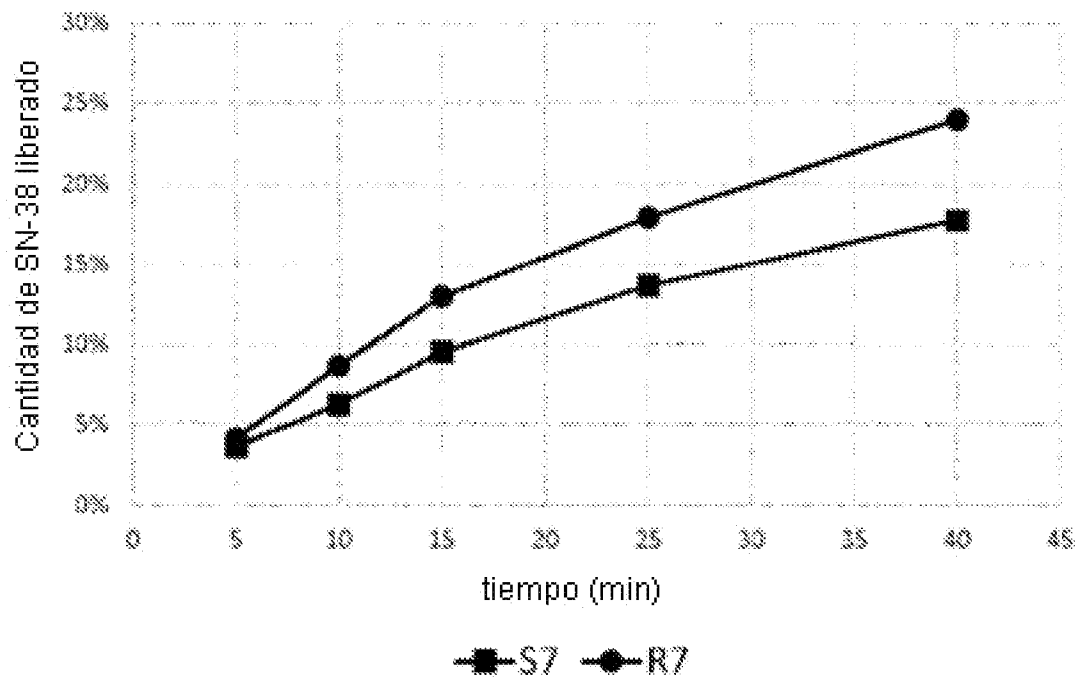


Figura 4

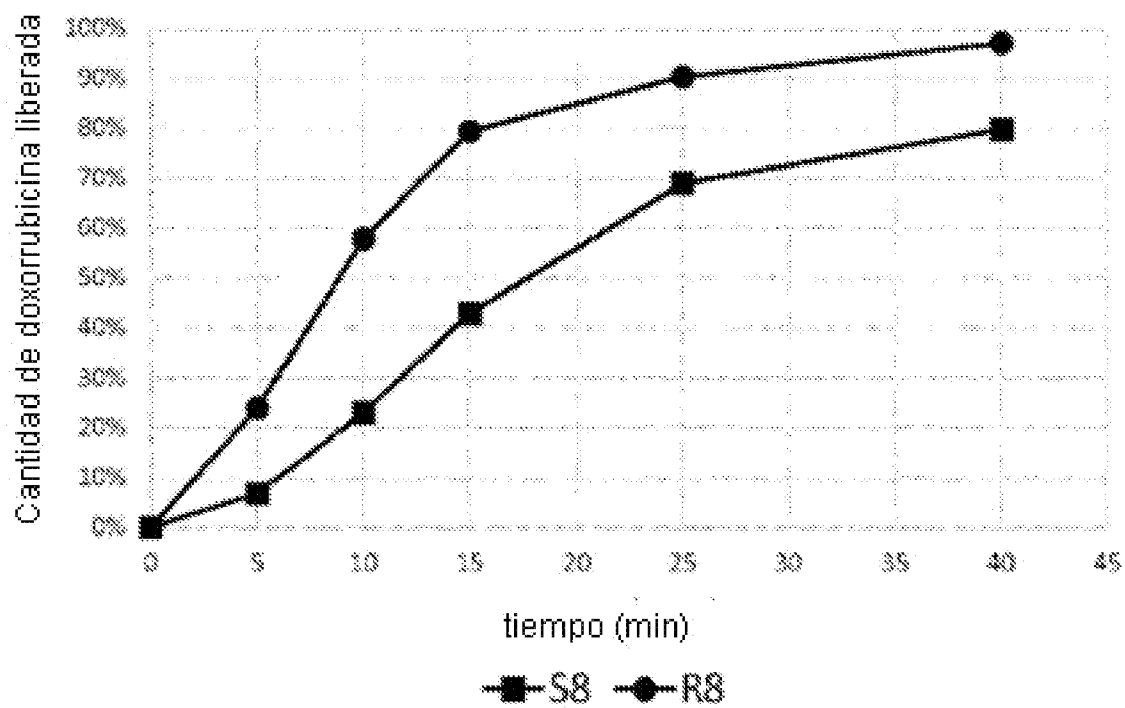


Figura 5

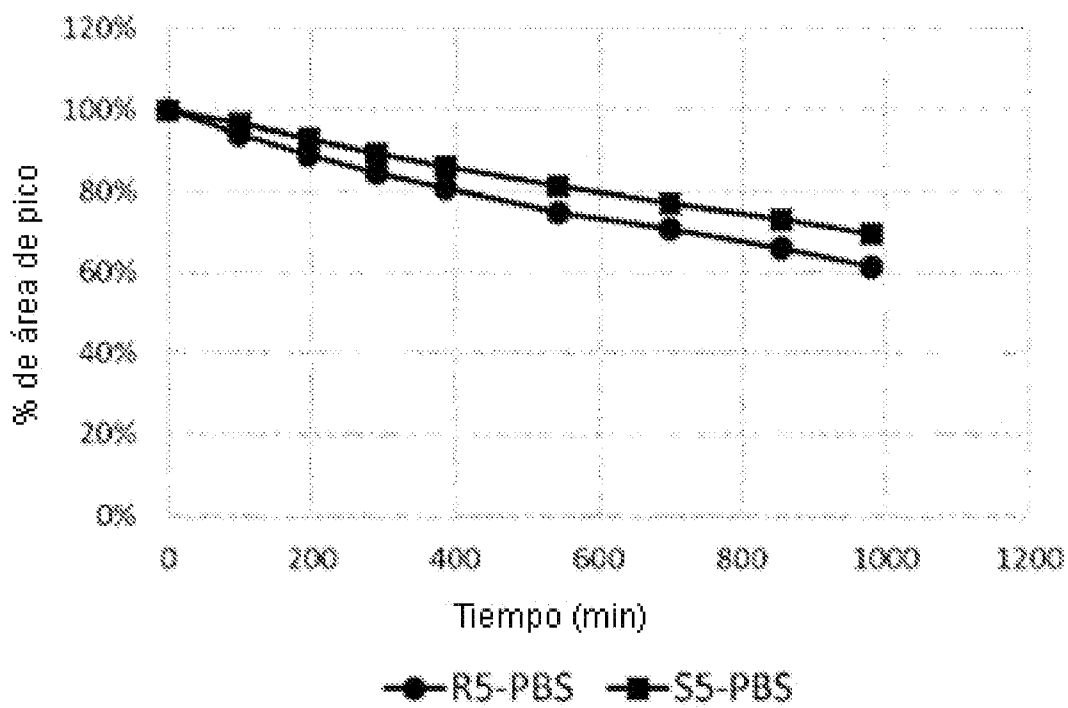


Figura 6

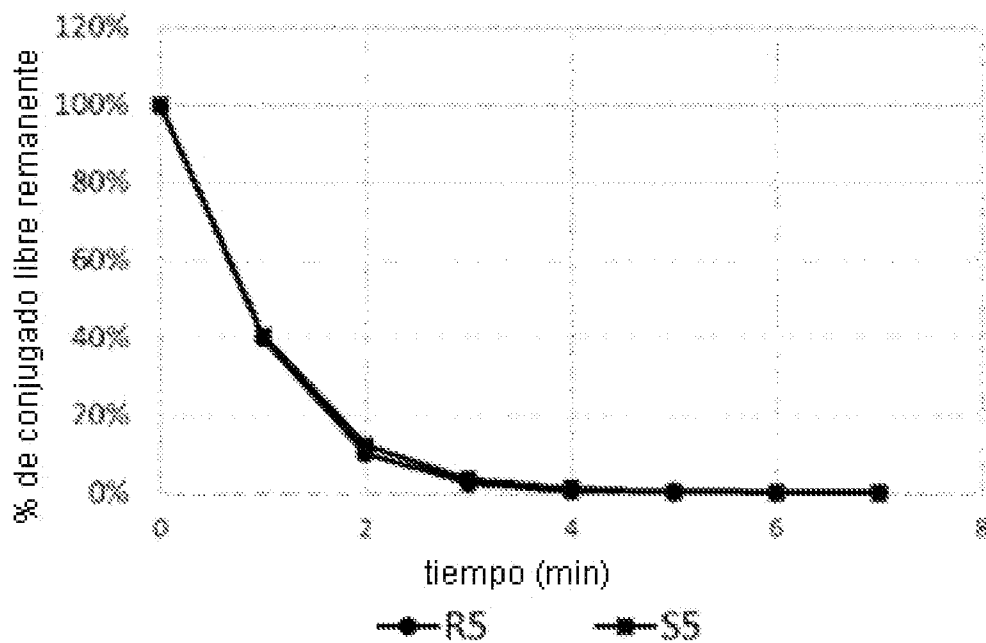


Figura 7

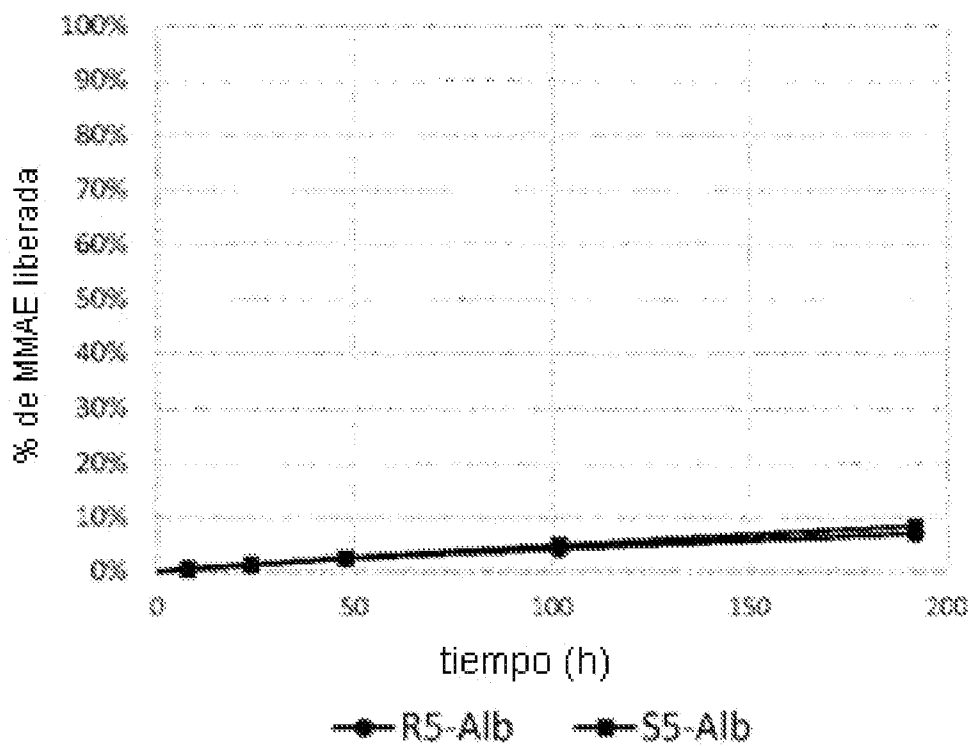


Figura 8

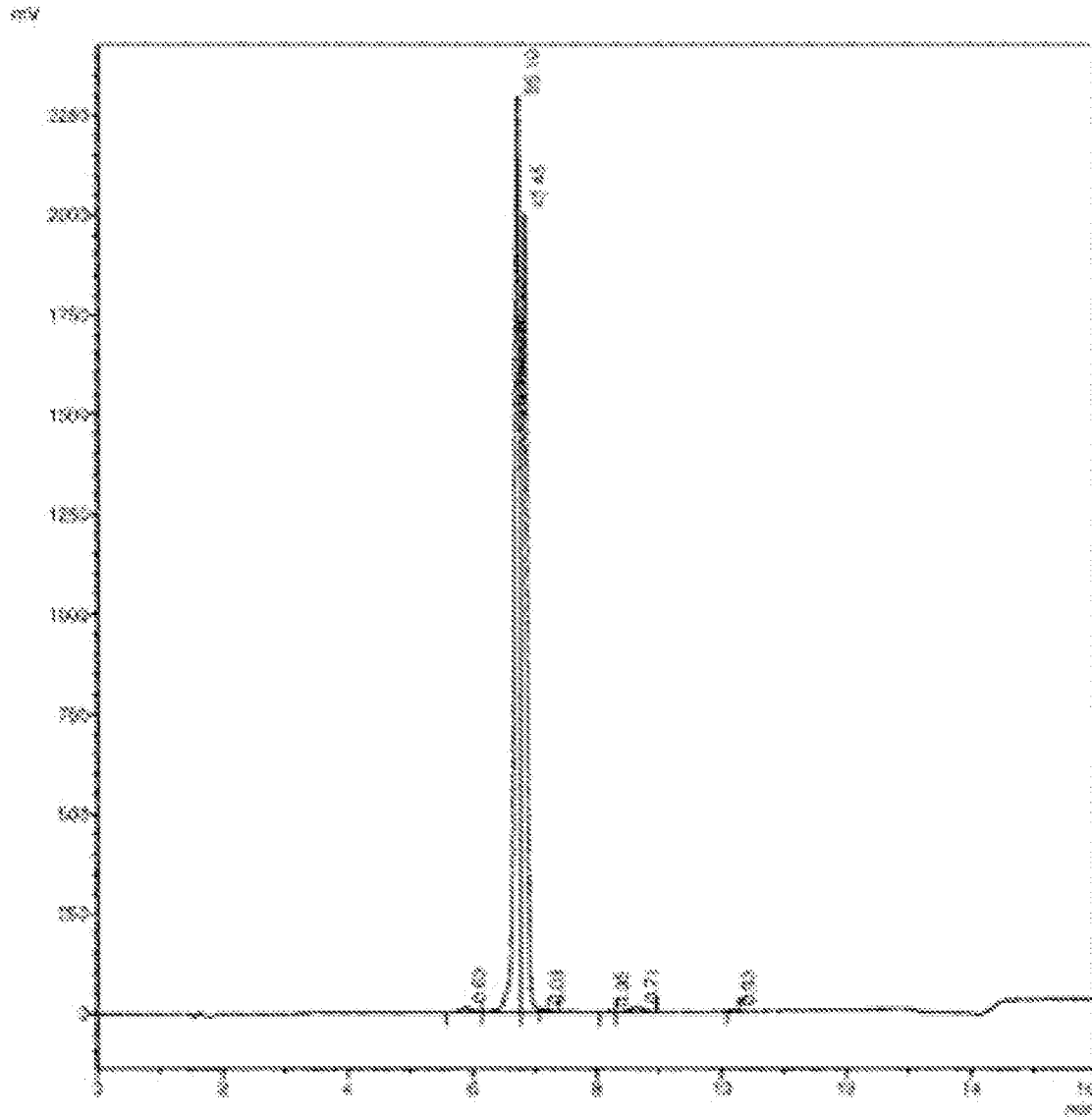


Figura 9

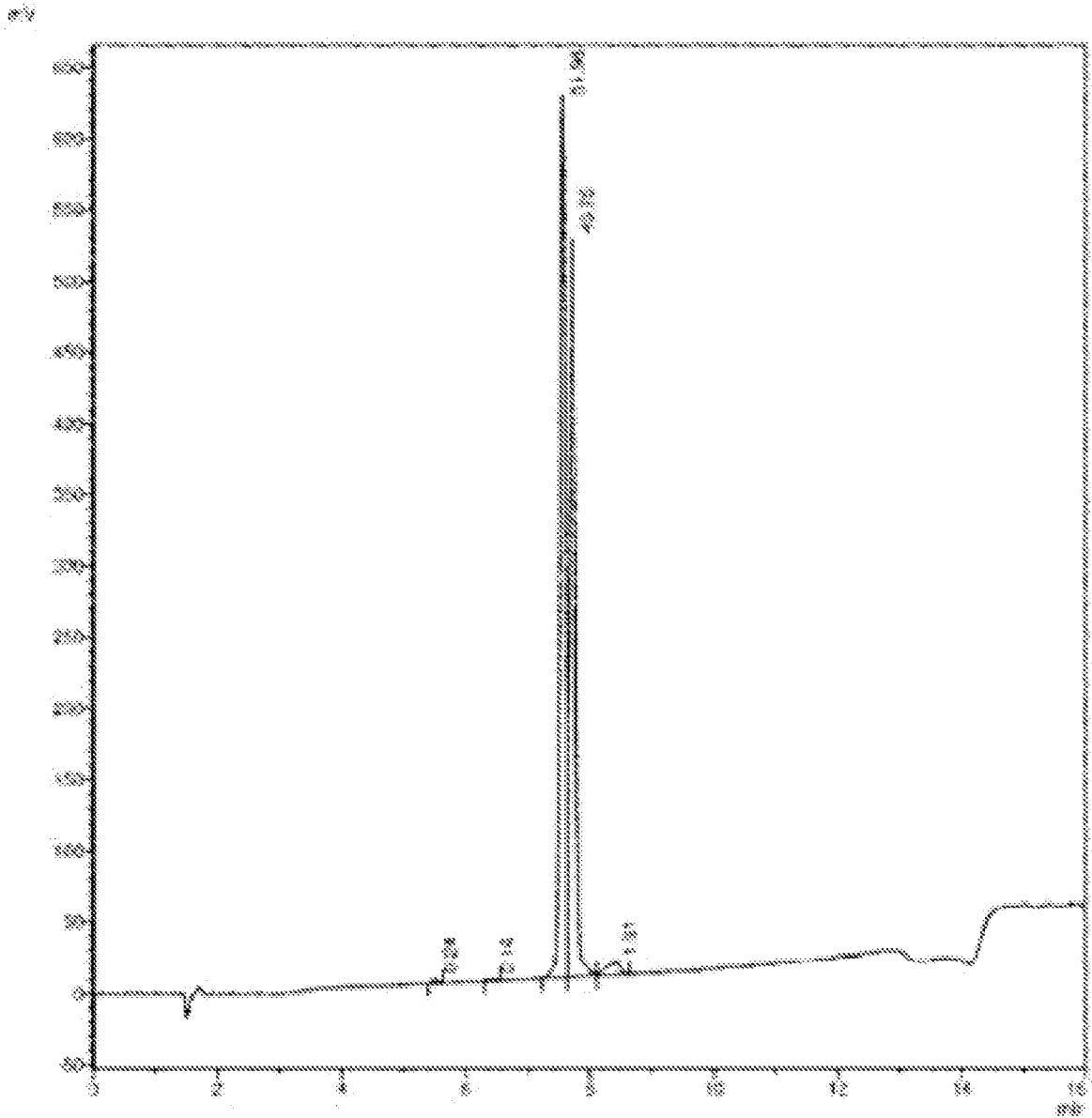


Figura 10