(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 374 964**

(51) Int. CI.:
C07D 487/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06290154 .1**
(96) Fecha de presentación: **25.01.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1813614**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

(54) Título: **AGENTES CITOTÓXICOS QUE COMPRENDEN NUEVOS DERIVADOS DE TOMAIMICINA.**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2012

(73) Titular/es:
SANOFI
174, Avenue de France
75013 Paris, FR

(72) Inventor/es:
Gauzy, Laurence;
Zhao, Robert;
Deng, Yonghong;
Li,Wei;
Bouchard, Hervé;
Chari, Ravi V.J. y
Commercon, Alain

(74) Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Agentes citotóxicos que comprenden nuevos derivados de tomaimicina

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a nuevos agentes citotóxicos y a su uso terapéutico. Más específicamente, la invención se refiere a nuevos agentes citotóxicos que comprenden derivados de tomaimicina y a su uso terapéutico. Estos nuevos agentes citotóxicos tienen utilidad terapéutica como resultado de la liberación de los derivados de tomaimicina en una población específica de células de una manera dirigida por medio de la asociación química del derivado de tomaimicina con un agente de unión a las células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se han descrito muchos intentos de dirigir específicamente conjugados anticuerpo-fármaco a células tumorales (Sela et al., en Immunoconjugates 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al., en Targeted Drugs 1-22 (E. Goldberg; ed. 1.983); Diener et al, en Antibody mediated delivery systems, 1-23 (J. Rodwell, ed. 1.988); Pietersz et al, en Antibody mediated delivery systems, 25-53 (J. Rodwell, ed. 1.988); Bumol et al, en Antibody mediated delivery systems, 55-79 (J. Rodwell, ed. 1.988); G.A. Pietersz & K. Krauer, 2, J. Drug Targeting, 183-215 (1.994); R. V. J. Chari, 31 Adv. Drug Delivery Revs., 89-104 (1998); W.A. Blattler & R.V.J. Chari, en Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy, 317-338, ACS Symposium Series 796; e I. Ojima et al eds, American Chemical Society 2001}. Todas las referencias y patentes citadas en la presente memoria se incorporan como referencia.

Se han conjugado fármacos citotóxicos, tales como: metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C y clorambucilo, con varios anticuerpos monoclonales murinos. En algunos casos, las moléculas del fármaco se unieron a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula portadora intermedia, tal como albúmina sérica (Garnett et al., 46 el Cancer Res. 2.407-2.412 (1.986); Ohkawa et al 23, Cancer Immunol. Immunother. 81-86 (1.986); Endo et al., 47 Cancer Res. 1076-1080 (1980)), dextrano (Hurwitz et al., 2 Appl. Biochem. 25-35 (1980); Manabi et al., 34 Biochem. Pharmacol. 289-291 (1.985); Dillman et al, 46 Cancer Res., 4.886-4.891 (1.986); Shoval et al, 85, Proc. Natl. Acad. Sci., 8.276-8.280 (1.988)) o ácido poliglutámico (Tsukada et al, 73, J. Natl. Canc. Inst., 721-729 (1.984); Kato et al 27 J. Med. Chem., 1602-1607 (1984); Tsukada et al, 52, Br. J. Cancer, 111-116 (1.985)).

Se ha empleado una amplia serie de tecnologías de enlazantes para la preparación de tales inmunoconjugados y se han investigado tanto enlazantes escindibles como no escindibles. En la mayoría de los casos, el potencial citotóxico total de los fármacos sólo podía observarse, sin embargo, si las moléculas de fármaco se podían liberar de los conjugados en el lugar diana de forma no modificada.

Uno de los enlazadores escindibles que se ha empleado para la preparación de conjugados anticuerpo-fármaco es un enlazador lábil a ácidos basado en el ácido cis-aconítico que se aprovecha del medio ácido de los diferentes compartimentos intracelulares, tales como los endosomas encontrados durante la endocitosis mediada por receptores y los lisosomas. Shen y Ryser introdujeron este método para la preparación de conjugados de daunorubicina con vehículos macromoleculares (102 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1048-1054 (1981)). Yang y Reisfeld usaron la misma técnica para conjugar daunorubicina con un anticuerpo antimelanoma (80 J. Natl. Canc. Inst. 1154-1159 (1988)). Dillman et al. también usaron un enlazador lábil a ácidos de forma similar para preparar conjugados de daunorubicina con un anticuerpo anti-célula T (48 Cancer Res. 6097-6102 (1988)).

Un enfoque alternativo, explorado por Trouet et al., implica unir la daunorubicina con un anticuerpo a través de un puente espaciador peptídico (79 Proc. Natl. Acad. Sci. 626-629 (1982)). Esto se hizo con la premisa de que el fármaco libre podría liberarse de tal conjugado por acción de las peptidasas lisosomales.

Sin embargo, los ensayos de citotoxicidad *in vitro* han demostrado que los conjugados anticuerpo-fármaco raramente alcanzan la misma potencia citotóxica que los fármacos libres sin conjugar. Esto sugirió que los mecanismos a través de los que las moléculas de fármaco se liberan de los anticuerpos son muy ineficaces. En el área de las inmunotoxinas, los conjugados formados mediante puentes disulfuro entre anticuerpos monoclonales y toxinas proteicas catalíticamente activas mostraron ser más citotóxicos que los conjugados que contenían otros enlazadores. Véanse Lambert et al., 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert et al., en Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al, 48, Cancer Res. 2610-2617 (1988). Esto se atribuyó a la elevada concentración intracelular de glutatión que contribuye a una escisión eficaz del enlace disulfuro entre una molécula de anticuerpo y una toxina. A pesar de esto, solo se han descrito unos pocos ejemplos de la utilización de puentes disulfuro para la preparación de conjugados entre fármacos y macromoléculas. Shen et al. (260 J. Biol. Chem. 10905-10908 (1985)) describieron la conversión de metotrexato en un derivado de mercaptoetilamida seguido por conjugación con poli-D-lisina mediante un enlace disulfuro. Otro informe describió la preparación de un conjugado de la caliqueamicina, fármaco tóxico que contiene trisulfuro, con un anticuerpo (Hinman et al., 53 Cancer Res. 3336-3342 (1993)).

Una razón para la falta de conjugados anticuerpo-fármaco unidos por disulfuro es la falta de disponibilidad de fármacos citotóxicos que tengan un resto que contiene un átomo de azufre que pueda utilizarse fácilmente para unir

el fármaco a un anticuerpo a través de un puente disulfuro. Además, es difícil la modificación química de los fármacos existentes sin disminuir su potencial citotóxico.

Otra desventaja principal de los conjugados anticuerpo-fármaco existentes es su incapacidad para suministrar una concentración suficiente de fármaco en el lugar diana debido al número limitado de antígenos dirigidos y la citotoxicidad relativamente moderada de los fármacos canceroestáticos como metotrexato, daunorubicina y vincristina. Para conseguir una citotoxicidad significativa, se hace necesaria la unión de un gran número de moléculas de fármaco, bien directamente al anticuerpo o mediante una molécula portadora polimérica. Sin embargo, tales anticuerpos modificados de forma importante presentan a menudo una unión debilitada con el antígeno diana y una eliminación *in vivo* rápida del torrente circulatorio.

A pesar de las dificultades descritas anteriormente, se han descrito agentes citotóxicos útiles que comprenden restos de unión a las células y el grupo de fármacos citotóxicos conocidos como maitansinoides (documentos USP 5.208.020, USP 5.416.064 y R. V. J. Chari, 31 Advanced Drug Delivery Reviews 89-104 (1998)). De manera similar, también se han descrito agentes citotóxicos útiles que comprenden restos de unión a la célula y análogos y derivados del potente antibiótico antitumoral CC-1065 (patentes de EE.UU. 5,475,092, 5,585,499 y 6,756,397).

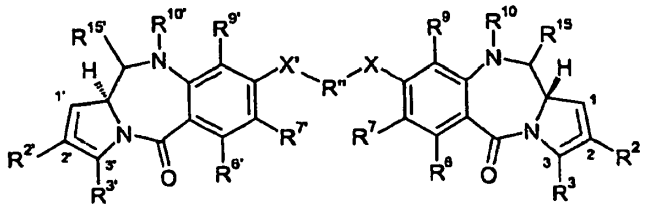
Los derivados de tomaimicina son pirrolo[1.4]benzodiazepinas (las PBD), una clase conocida de compuestos que ejercen sus propiedades biológicas por medio de la unión covalente al N2 de guanina en el surco menor del ADN. Las PBD incluyen una serie de aglutinantes de surco menor tales como antramicina, neotramicina y DC-81. Sin embargo, la actividad antitumoral de la tomaimicina está limitada sin embargo debido a su toxicidad no específica para las células normales. De esta manera, existe la necesidad de aumentar la actividad terapéutica y disminuir los efectos tóxicos no específicos de los compuestos de tomaimicina. Los presentes autores han demostrado que esta necesidad puede satisfacerse por la liberación dirigida de compuestos de tomaimicina por medio de su unión con agentes de unión a la célula. Adicionalmente, existe la necesidad de desarrollar derivados de tomaimicina que sean solubles y estables en disoluciones acuosas. Además, la tomaimicina no es suficientemente potente como para usarse en conjugados de agentes de unión a la célula.

Recientemente se han descrito algunos derivados de PBD y su actividad antitumoral en modelos preclínicos (documentos WO 00/12508 y WO2005/085260). Sin embargo, los ensayos clínicos iniciales realizados en seres humanos indican que esta clase de compuestos son muy tóxicos, basándose en la muy baja dosis que puede administrarse a los seres humanos (I. Puzanov, Proc. AACR-NCI-EORTC International Conference, Filadelfia, USA 2.005, Resumen #B117). Por lo tanto, es deseable proporcionar derivados alternativos que sean más potentes y/o puedan unirse a agentes de unión a las células.

El documento WO 200508250 describe compuestos de fórmula :

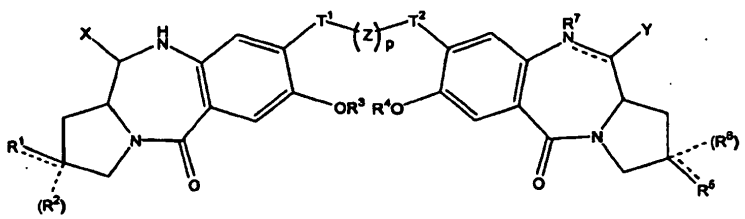
PBD-A-Y-X-$(Het)_{na}$-L-$(Het)_{nb}$-L-$(Het)_{nc}$-T-$(Het')_{nd}$-L-$(Het)_{ne}$-L-$(Het)_{nf}$-X'-Y'-A'-PBD' en donde X y X' son NH o C(=O) y T es -NH-Q-NH- o -C(=O)-Q-C(=O)-. Q es un radical divalente derivado de un grupo alquilo(C_1-C_7) opcionalmente sustituido, un grupo heterociclo(C_3-C_{20}) o un grupo arilo(C_5-C_{20}). El documento WO 200508250 no describe la preparación de conjugados.

El documento WO 2005/110423 describe compuestos de fórmula :



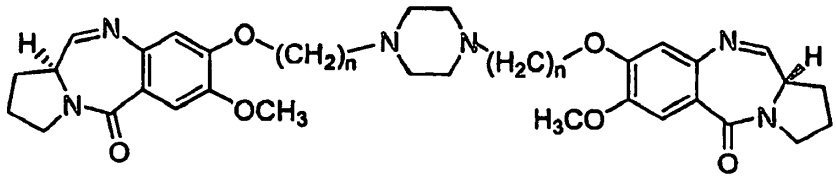
El documento WO 2005/110423 no describe ningún conjugado.

El documento WO 2005/040170 describe compuestos de fórmula :



en donde Z es un grupo alcano, alqueno o alquino divalente, sustituido o sin sustituir (véase la reivindicación 1). El sustituyente puede ser halógeno, nitro, amino, hidroxilo, alcoxi, aralcoxi, éster, amida, sulfhidrilo, sulfuro de alquilo,

sulfuro de arilo, alquilsulfóxido, arilsulfóxido, alquilsulfonilo, arilsulfionilo, ceto, tioceto, alquilo, ciano y similares (véase la página 6 de la solicitud). El documento WO 2004/087716 describe compuestos de fórmula :



pero no describe ningún conjugado.

J. Chem. Soc., Chem. Comm. 1999, 797-798 (issn=0022-4936), Bioorganic & Med.Chem. Let. 2004, 14(10), 2669-2672 (issn=0960-894X), J. Med. Chem. 2004, 47, 1161-1174 (issn=0022-2623), Bioorganic & Med.Chem. Let. 2004, 14(22), 5699-5702 (issn=0960-894X) describe dímeros con los enlaces -O-$(CH_2)_n$-O-. Tetrahedron Lett. 1988, 29(40), 5105-5108 (issn=0040-4039) describe dímeros con los enlaces -$S(CH_2)_6S$- (compuesto 13), -$O(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2O$- (compuesto 14), $NH(CH_2)_3N(CH_3)(CH_2)_3NH$- (compuesto 15).

Ninguno de estos documentos describe los compuestos tal como se reivindican.

Por consiguiente, es muy necesario un método para tratar enfermedades con derivados de tomaimicina en el que sus efectos colaterales se reduzcan sin comprometer su citotoxicidad.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Como se describe en una primera realización, un objeto de la presente invención es proporcionar derivados de tomaimicina que son altamente tóxicos pero que pueden usarse eficazmente en el tratamiento de muchas enfermedades.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevos derivados de tomaimicina, que opcionalmente se pueden unir o unidos a un agente de unión a las células.

En un segundo modo de realización, la presente invención proporciona una composición terapéutica que comprende:

(A) una cantidad eficaz de uno o más derivados de tomaimicina que opcionalmente se pueden unir o unidos a un agente de unión a las células, y

(B) un vehículo, diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente.

En una tercera realización, la presente invención proporciona un método para eliminar poblaciones celulares elegidas in vitro que comprende poner en contacto las células diana o el tejido que contiene las células diana con una cantidad citotóxica de un agente citotóxico que comprende uno o más derivados de tomaimicina, que opcionalmente se pueden unir o unidos a un agente de unión a las células.

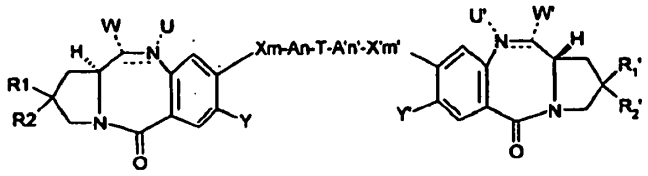
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esta invención se basa en la síntesis de nuevos derivados de tomaimicina que mantienen una alta citotoxicidad y que pueden unirse eficazmente con agentes de unión a las células. Previamente se ha demostrado que la unión de fármacos muy citotóxicos a anticuerpos usando una unión escindible, tal como un enlace disulfuro, asegura la liberación de fármacos totalmente activos dentro de la célula y que tales conjugados son citotóxicos con especificidad de antígeno (documentos US 6.340.701; US 6.372.738; US 6.436.931). Sin embargo, la técnica revela que es extremadamente difícil modificar los fármacos existentes sin disminuir su potencial citotóxico. La invención descrita resuelve este problema modificando los derivados de tomaimicina descritos con restos químicos. Como resultado, los nuevos derivados de tomaimicina descritos conservan y en algunos casos podían incluso aumentar la potencia citotóxica de los derivados de tomaimicina. Los complejos agente de unión a la célula-derivado de tomaimicina permiten la medición completa de la acción citotóxica de los derivados de tomaimicina que se van a aplicar de forma dirigida contra células no deseadas sólo, evitando por lo tanto los efectos secundarios debidos al daño en las células sanas no diana. Así, la invención proporciona agentes útiles para la eliminación de células enfermas o anormales que deben destruirse o lisarse, tales como las células tumorales (particularmente, las células de tumor sólido).

El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención comprende uno o más derivados de tomaimicina, que opcionalmente se pueden unir o unidos a un agente de unión a las células mediante un grupo de unión. El grupo enlazador es parte de un resto químico que se une por enlaces covalentes a un derivado de tomaimicina por métodos convencionales. En un modo de realización preferido el resto químico puede estar unido covalentemente al derivado de tomaimicina mediante un enlace disulfuro.

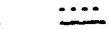
Los derivados de tomaimicina se describen en las reivindicaciones 1-11.

Los derivados de tomaimicina útiles en la presente invención tienen la fórmula (I) mostrada a continuación:



(I)

---- representa un enlace sencillo opcional;

 representa o un enlace sencillo o un doble enlace;

con la condición de que cuando representa un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representan independientemente H, y W y W', iguales o diferentes, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como –OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como –NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfito tal como $–SO_3$-, , un bisulfito tal como $-OSO_3$, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como –NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como –NRCOR, un azido tal como –N3, un ciano, un halo, un trialquilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido; Preferiblemente W y W' son iguales o diferentes y son OH, Ome, Oet, $NHCONH_2$, SMe;

y cuando represente un doble enlace, U y U' están ausentes y W y W' representan H;

■ R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre un Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, S(O)qR, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

Preferiblemente, R1= R2= R1'= R2'= H, o más preferiblemente R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un enlace doble que contiene el grupo =B y =B' respectivamente.

■ B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre alquilo opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$

Preferiblemente, B=B'.

Más preferiblemente, B=B'= $=CH_2$ o $=CH-CH_3$,

X=X'=O.

■ A, A' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquilo o Alquenilo opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, S(O)qR, Arilo, Het, Alquilo, Alquenilo.

Preferiblemente, A=A'.

Más preferiblemente, A=A'=alquilo lineal no sustituido.

■ Y, Y' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, OR;

Preferiblemente Y=Y'.

Más preferiblemente Y=Y'=OAlquilo, más preferiblemente OMetilo.

■ T es -NR-, o un arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, todos opcionalmente sustituidos con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, S(O)qR, Alquilo, y sustituidos con uno o más enlazador(es).

Preferiblemente, T es un grupo arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, más preferiblemente fenilo o piridilo sustituido con uno o más enlazador(es).

Los grupos de unión adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen grupos tiol, sulfuro, disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles y grupos esterasa lábiles. Se prefieren los grupos disulfuro y tioéter.

Cuando el grupo de unión es un grupo que contiene tiol, sulfuro (o el denominado tioéter –S-) o disulfuro (-S-S-), la cadena lateral que tiene el grupo tiol, sulfuro o disulfuro puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. Los especialistas en la materia pueden identificar fácilmente cadenas laterales adecuadas.

Los sustituyentes que contienen tiol-, sulfuro- o disulfuro- incluyen

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y$ SZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$piperazino-

$CO(CR_{15}R_{16})_USZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazin-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-QSZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-

QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-O(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-O-fenil-QSZ', -O-furil-QSZ', -O-oxazolil-QSZ', -O-tiazolil-QSZ',

-O-tienil-QSZ', -O-imidazolil-QSZ', -O-morfolino-QSZ', -O-piperazino-QSZ',

-O-N-metilpiperazino-QSZ',

$-OCO-(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-OCO-fenil-QSZ', -OCO-furil-QSZ', -OCO-oxazolil-QSZ', -OCO-

tiazolil-QSZ', -OCO-tienil-QSZ', -OCO-imidazolil-QSZ', -OCO-

morfolino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_y$ SZ',

$-CO-(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-CO-fenil-QSZ', -CO-furil-QSZ', -CO-oxazolil-QSZ', -CO-tiazolil-QSZ',

-CO-tienil-QSZ', -CO-imidazolil-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-

piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metilpiperazino-QSZ',

-$NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH2CH2)_ySZ'$,

-$NR_{19}CO$ NR_{12} $(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-NR_{19}CO-fenil-QSZ', -NR_{19}CO-furil-QSZ', -NR_{19}CO-oxazolil-QSZ',

-NR_{19}CO-tiazolil-QSZ', -NR_{19}CO-tienil-QSZ', -NR_{19}CO-imidazolil-QSZ',

-NR_{19}CO-morfolino-QSZ', -NR_{19}CO-piperazino-QSZ', -NR_{19}CO-

piperidino-QSZ', -NR_{19}CO-N-metilpiperazino-QSZ',

-NR_{19}-fenil-QSZ', -NR_{19}-furil-QSZ', -NR_{19}-oxazolil-QSZ', -NR_{19}-

tiazolil-QSZ', -NR_{19}-tienil-QSZ', -NR_{19}-imidazolil-QSZ', -NR_{19}-

morfolino-QSZ', -NR_{19}-piperazino-QSZ', -NR_{19}-piperidino-QSZ',

-N R_{19}-N-metilpiperazino-QSZ',

-$NR_{19}CO$-NR_{12}-fenil-QSZ', -$NR_{19}CO$-NR_{12}-oxazolil-QSZ', -$NR_{19}CO$-NR_{12}-

tiazolil-QSZ', -$NR_{19}CO$-NR_{12}-tienil-QSZ', -$NR_{19}CO$-NR_{12}-piperidino-QSZ',

-$S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-SCO-morfolino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', y

-SCO-N-metilpiperazino-QSZ', en donde:

Z' es H, un grupo protector de tiol, tal como Ac, R_{19}' o SR_{19}',

donde Q es un enlace directo o un grupo alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene 1-10 átomos de carbono o un espaciador de polietilenglicol con 2 a 20 unidades de repetición etileno oxi;

R_{19}' y R_{12} son iguales o diferentes y son alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o un grupo arilo o heterocíclico simple o sustituido, y R_{12} puede ser además H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} y R_{16} son iguales o diferentes y son H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono,

R_{17}, R_{18} y R_{19} son H o alquilo,

u es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

t es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

y es un número entero de 1 a 20 y también puede ser 0.

■ n, n', iguales o diferentes son 0 o 1, y n=n'=1.

■ q es 0, 1 o 2.

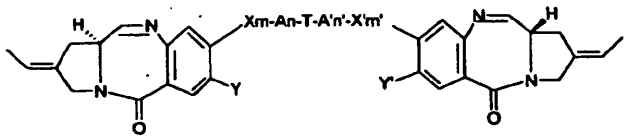
■ R, R' son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de H, Alquilo, Arilo, opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het;

o sus sales, hidratos o sales hidratadas aceptables farmacéuticamente o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

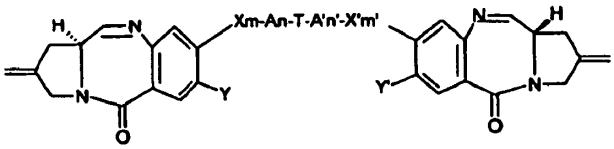
De acuerdo con un aspecto preferido, los compuestos de la invención son aquellos de fórmula (I) donde T= arilo opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, S(O)qR, Alquilo, y sustituidos con uno o más enlazador(es). y A, A', X, X', U, U', W, W', m, m', n, n', - - - -, ⎯⎯ se definen como anteriormente.

En particular, n=n'=1.

Los compuestos preferidos son los de fórmula:



o



donde X, X', A, A', Y, Y', T, n, n', m, m' se definen como anteriormente.

Como se ha usando anteriormente o como se usa a continuación en este documento:

Alk representa alquilo, alqueno o alquino.

"Alquilo" significa un grupo hidrocarbonado alifático que puede ser lineal o ramificado, con 1 a 20 átomos de carbono en la cadena o cíclico con 3 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquilo preferidos tienen de 1 a 12 átomos de carbono en la cadena. "Ramificado" significa que uno o más grupos alquilo inferior tales como metilo, etilo o propilo se unen a una cadena alquílica lineal. Los grupos alquilo ejemplares incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, 3-pentilo, octilo, nonilo, decilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

"Alqueno" significa un grupo hidrocarbonado alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado, que tiene de 2 a 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquenilo preferidos tienen de 2 a 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferiblemente de aproximadamente 2 a 4 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquenilo ejemplares incluyen etenilo, propenilo, *n*-butenilo, *i*-butenilo, 3-metilbut-2-enilo, *n*-pentenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo.

"Alquino" significa un grupo hidrocarbonado alifático que contiene un triple enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado, que tiene de 2 a 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquinilo preferidos tienen de 2 a 12 átomos de carbono en la cadena; y más preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquinilo ejemplares incluyen etinilo, propinilo, *n*-butinilo, 2-butinilo, 3-metilbutinilo, n-pentinilo, heptinilo, octinilo y decinilo.

“Átomo de halógeno” se refiere a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo; preferiblemente un átomo de flúor y cloro.

"Arilo" significa un sistema de anillos hidrocarbonado, monocíclico o multicíclico, aromático, de 6 a 14 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 10 átomos de carbono. Los grupos arilo ejemplares incluyen fenilo o naftilo.

El término “Het” se refiere a heterociclo o heteroarilo.

Como se usan en este documento, las expresiones “heterociclo” o “grupo heterocíclico” se refieren a anillos mono, bi o multicíclicos, saturados, parcialmente insaturados o insaturados, no aromáticos, estables, de 3 a 14 y preferiblemente de 5 a 10 miembros, donde al menos un miembro del anillo es un heteroátomo. Típicamente, los heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, selenio y fósforo. Los heteroátomos preferidos son oxígeno, nitrógeno y azufre.

También se describen heterociclos adecuados en The Handbook of Chemistry and Physics, 76ª Edición, CRC Press, Inc., 1.995-1.996, pág. 2-25 a 2-26, cuya descripción se incorpora de ese modo como referencia.

Los grupos heterocíclicos no aromáticos preferidos incluyen, pero sin limitación, pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, oxiranilo, tetrahidrofuranilo, dioxolanilo, tetrahidro-piranilo, dioxanilo, dioxolanilo, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, piranilo, imidazolinilo, pirrolinilo, pirazolinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiopiranilo, ditianilo, tiomorfolinilo, dihidro-piranilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidro-piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropirinidinilo, dihidrotiopiranilo, azepanilo, así como los sistemas condensados producidos por la condensación con un grupo fenilo.

Como se usa en este documento, el término “heteroarilo” o heterociclos aromáticos se refiere a un anillo mono-, bi- o multicíclico, aromático, de 5 a 14 y preferiblemente de 5 a 10 miembros. Los ejemplos incluyen pirrolilo, piridilo, pirazolilo, tienilo, pirimidinilo, pirazinilo, tetrazolilo, indolilo, quinolinilo, purinilo, imidazolilo, tienilo, tiazolilo, benzotiazolilo, furanilo, benzofuranilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, triazoilo, tetrazolilo, isoquinolilo, benzotienilo, isobenzofurilo, pirazolilo, carbazolilo, bencimidazolilo, isoxazolilo, N-óxido de piridilo, así como los sistemas condensados producidos por la condensación con un grupo fenilo.

Los términos "alquilo", "cicloalquilo", “alquenilo”, "alquinilo", "arilo", "heteroarilo", "heterociclo" y similares también se refieren a los términos "alquileno", "cicloalquileno", "alquenileno", "alquinileno", "arileno", "heteroarileno", "heterociclona" correspondientes y similares que se forman por la retirada de dos átomos de hidrógeno.

Como se usa en este documento, la expresión “enlazable a un agente de unión a las células” se refiere a los derivados de tomaimicina que comprenden al menos un grupo de unión, o un precursor del mismo, adecuado para unir dichos derivados con un agente de unión a las células; siendo los grupos de unión preferidos enlaces tiol o disulfuro, o precursores de los mismos.

Como se usa en este documento, la expresión “enlazado a un agente de unión a las células” se refiere a la molécula conjugada que comprende al menos un derivado de tomaimicina unido a un agente de unión a las células mediante un grupo de unión adecuado, o un precursor del mismo; siendo los grupos de unión preferidos enlaces tiol o disulfuro, o precursores de los mismos.

Como se usa en este documento, el “precursor” de un grupo dado se refiere a cualquier grupo que pueda conducir a ese grupo mediante cualquier reacción de desprotección, modificación química o acoplamiento.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un animal, tal como un animal valioso para fines de cría, compañía o conservación, o preferiblemente un ser humano o un niño que padece o que presenta el potencial de padecer una o más enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad eficaz terapéuticamente" se refiere a una cantidad de un compuesto de la presente invención que es eficaz para prevenir, reducir, eliminar, tratar o controlar los síntomas de las enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria. El término "controlar" pretende referirse a todos los procesos en los que puede existir un retraso, interrupción, detención o parada de la progresión de las enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas de la enfermedad y afección, y pretende incluir tratamiento profiláctico.

Como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas de dosificación que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuados para ponerse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas u otras complicaciones problemáticas en proporción a una relación beneficio/riesgo razonable.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sales aceptables farmacéuticamente" se refiere a derivados de los compuestos descritos donde el compuesto precursor se modifica preparando sales de ácidos o bases del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o la sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos, no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las procedentes de ácidos inorgánicos tales como: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como: acético, propiónico, succínico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, bencenosulfónico, glucorónico, glutámico, benzoico, salicílico, toluenosulfónico, oxálico, fumárico, maleico, láctico y similares. Otras sales de adición incluyen sales de amonio tales como trometamina, meglumina, epolamina, etc., sales de metales tales como sodio, potasio, calcio, cinc o magnesio.

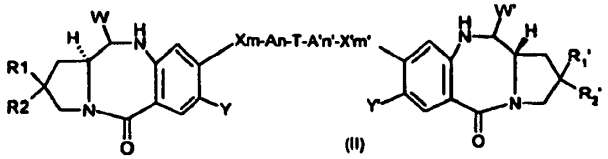
Las sales aceptables farmacéuticamente de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto precursor que contiene un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales. En general, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiado, en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas

de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1.985, p. 1418, cuya descripción se incorpora en la presente memoria por referencia.

Los compuestos de fórmula general (I) que tienen isómeros geométricos y estereoisómeros también son una parte de la invención.

Se sabe que el doble enlace N-10, C-11 de los derivados de tomaimicina de fórmula (I) puede convertirse fácilmente y de manera reversible en los aductos de imina correspondientes en presencia de agua, un alcohol, un tiol, una amina primaria o secundaria, urea y otros nucleófilos. Este proceso es reversible y puede regenerar fácilmente los derivados de tomaimicina correspondientes en presencia de un agente deshidratante, en un disolvente orgánico no prótico, al vacío o a temperaturas elevadas (Z. Tozuka, 36, J. Antibiotics, 276 (1.983).

Así, esta invención también proporciona derivados reversibles de derivados de tomaimicina de fórmula general (II):



en la que A, X, Y, m, n, T, A', X', Y', m', n', R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (XX) y W, W' son iguales o diferentes y se seleccionan entre el grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, -COOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como –OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como –NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfito tal como $-SO_3$, un bisulfito tal como $-OSO_3$, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como –NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como –NRCOR, -NRCONRR', un azido tal como –N3, un ciano, un halo, un trialquilo o triarilfosfonio. Preferiblemente, W y W' son iguales o diferentes y son: OH, OMe, OEt, $NHCONH_2$, SMe.

Así, los compuestos de fórmula (II) pueden considerarse como solvatos, incluyendo el agua cuando el disolvente es agua; estos solvatos pueden ser particularmente útiles.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención también es de interés con el proceso de preparación de los compuestos de fórmula (I).

Los compuestos y procesos de la presente invención pueden prepararse por varias rutas muy conocidas por los expertos en la técnica. Los compuestos pueden sintetizarse, por ejemplo, por aplicación o adaptación de los métodos que se describen a continuación, o variaciones de los mismos que puedan apreciarse por los especialistas en la técnica. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán obvias y se conocerán bien o podrán obtenerse fácilmente a partir de la bibliografía científica por los expertos en la técnica.

En particular, dichos métodos pueden encontrarse en R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1.999.

Se apreciará que los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos y pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Por lo tanto, se desean todas las formas quirales, diastereoméricas, racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica o la forma isomérica específica. Se sabe bien en la técnica cómo preparar y aislar dichas formas ópticamente activas. Por ejemplo, pueden separarse mezclas de estereoisómeros por técnicas estándar que incluyen, pero no se limitan a, resolución de formas racémicas, cromatografía normal, de fase reversa y quiral, formación de sales preferencial, recristalización y similares o por síntesis quiral bien a partir de materiales de partida quirales o por síntesis deliberada de centros quirales diana.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante varias rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están disponibles comercialmente, o se sintetizan fácilmente por técnicas muy conocidas por el experto en la técnica. Todos los sustituyentes, a menos que se indique otra cosa, son como se han definido anteriormente.

En las reacciones descritas a continuación en la presente memoria, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxi, amino, imino, tio o carboxi, cuando se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales de acuerdo con la práctica estándar, para ejemplos, véanse T. W. Greene y P. G. M. Wuts in Protective Groups in Organic Chemistry, 3ª ed., John Wiley and Sons, 1999; J. F. W. McOmie en Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, 1973.

Algunas reacciones pueden realizarse en presencia de una base. No existe ninguna restricción particular sobre la naturaleza de la base que se tiene que usar en esta reacción y puede usarse aquí igualmente cualquier base usada convencionalmente en reacciones de este tipo, con la condición de que no afecte de forma adversa a otras partes de la molécula. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen: hidróxido de sodio, carbonato de potasio, trietilamina, hidruros de metales alcalinos, tales como hidruro de sodio e hidruro de potasio; compuestos de alquil-litio, tales como metil-litio y butil-litio; y alcóxidos de metales alcalinos, tales como metóxido de sodio y etóxido de sodio.

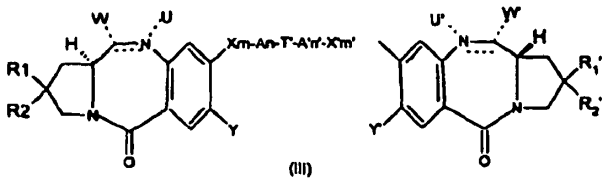
Habitualmente, las reacciones se realizan en un disolvente adecuado. Pueden usarse varios disolventes, con la condición de que no afecten de forma adversa a la reacción o a los reactivos implicados. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen: hidrocarburos, que pueden ser hidrocarburos aromáticos, alifáticos o cicloalifáticos, tales como hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xileno; amidas, tales como dimetilformamida; alcoholes tales como etanol y metanol y éteres, tales como éter dietílico y tetrahidrofurano.

Las reacciones pueden realizarse en un amplio intervalo de temperaturas. En general, se encuentra conveniente realizar la reacción a una temperatura de 0ºC a 150ºC (más preferiblemente de aproximadamente la temperatura ambiente a 100ºC). El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente, dependiendo de muchos factores, en particular de la temperatura de la reacción y de la naturaleza de los reactivos. Sin embargo, si la reacción se realiza en las condiciones preferidas indicadas anteriormente, normalmente será suficiente un periodo de 3 horas a 20 horas.

El compuesto preparado de esta manera puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse mediante retirada por destilación del disolvente de la mezcla de reacción o, si es necesario después de la retirada por destilación del disolvente de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de la extracción con un disolvente orgánico inmiscible en agua y retirando por destilación el disolvente del extracto. Además, si se desea, el producto puede purificarse adicionalmente mediante diversas técnicas bien conocidas, tales como recristalización, reprecipitación o las diversas técnicas de cromatografía, principalmente cromatografía en columna o cromatografía preparativa de capa fina.

El proceso de preparación de un compuesto de fórmula (I) de la invención es un objeto adicional de la presente invención.

De acuerdo con un primer aspecto, el proceso de preparación de los compuestos de fórmula (I) comprende la etapa de desproteger los compuestos correspondientes de fórmula (III):

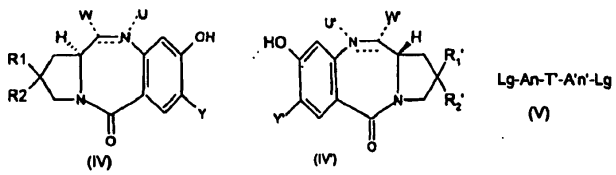


(III)

en la que Y, Y', X, A, A', X', m, n, m', n', W, W', U, U', - - - -, R1, R2, R1', R2', ---- son como se han definido en la fórmula (I) y T' se corresponde con T donde el/los grupo(s) funcional(es) se ha(n) protegido.

Preferiblemente, la función SH se protege y preferiblemente el grupo protector es acetilo, benzoílo, metanosulfonilo, metiltio, piridiltio, nitropiridiltio, triisopropilsililo (TIPS). En general, la etapa de desprotección se realiza usando condiciones clásicas tales como una base para retirar los grupos protectores de acetilo, benzoílo y metanosulfonilo, un agente reductor tal como ditiotreitol o tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para escindir un grupo protector de metiltio o de manera conocida haciendo reaccionar los compuestos con un fluoruro de amonio para retirar el TIPS.

Los compuestos de fórmula (II) pueden obtenerse a partir del acoplamiento de compuestos correspondientes de fórmulas (IV), (IV') y (V):



(IV) (IV') (V)

donde Y, Y', A, A', n, n', T', W, W', U, U', - - - -, ---- , R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (III), y Lg es un grupo saliente tal como un halógeno o OMs, OTs.

Los compuestos de fórmula (IV) y (IV') son generalmente compuestos conocidos, como se describe por ejemplo en las solicitudes de patente WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, o están disponibles en el mercado, y/o están disponibles por síntesis total (M. Mori et al, 42 Tetrahedron, 3793-3806, 1986) o se producen por especies de Streptomyces, en particular, siguiendo el procedimiento de la patente de Francia Fr. 1.516.743 o pueden prepararse por aplicación o adaptación de los procedimientos ilustrativos dados en los ejemplos.

Los compuestos de fórmula (V) pueden obtenerse a partir de compuestos correspondientes de fórmula (VI):

(VI) HO-An-T'-A'n'-OH

en la que A, A', n, n', T' son como se han definido en la fórmula (III).

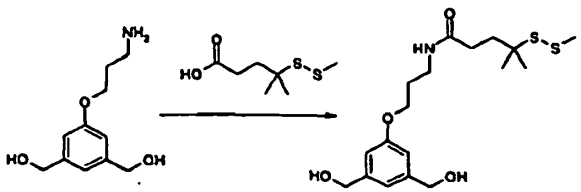
Esta reacción se realiza generalmente en presencia de PPh_3 y $CHal_4$ o por reacción con un clorosulfonato en presencia de una base tal como hidróxido de potasio.

Los compuestos de fórmula (VI) pueden obtenerse a partir de compuestos correspondientes de fórmula (VII):

(VII) HO-An-T"-A'n'-OH

donde A, A', n, n' se definen como en la fórmula (III) y T" es un grupo precursor de T. Un grupo precursor de T se refiere a cualquier grupo que puede conducir a T mediante cualquier desprotección, modificación química, o acoplamiento. Preferiblemente, T se obtiene por acoplamiento de T' con la porción complementaria, donde T' y la porción complementaria comprenden funciones que son reactivas entre sí, por ejemplo, T' comprende una función amina y la porción complementaria comprende una función ácido.

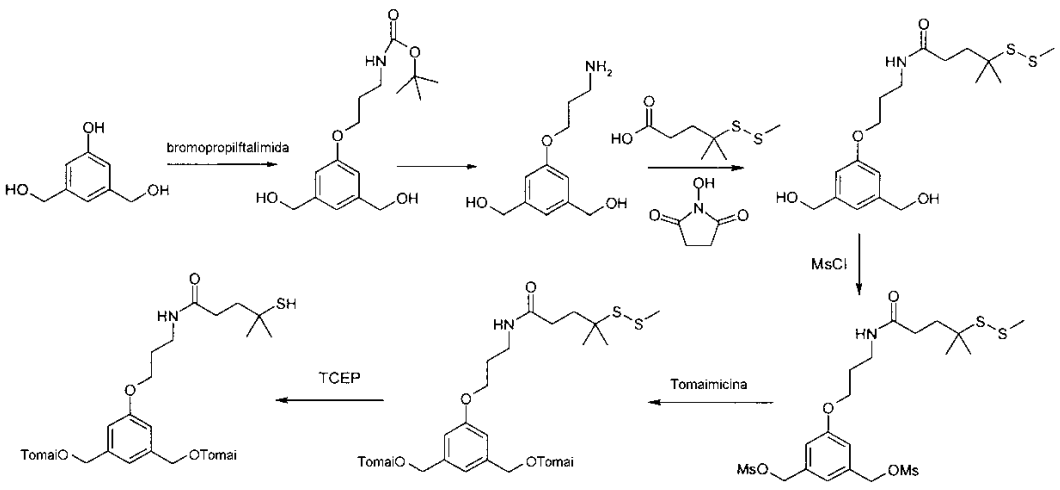
Un ejemplo representativo para esta reacción es:



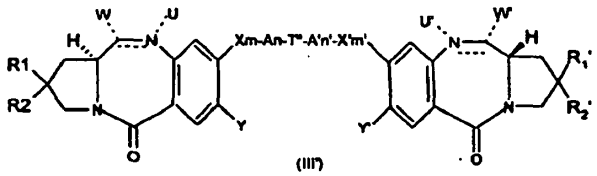
En general, esta reacción se realiza en presencia de N-hidroxisuccinimida y HOBT.

Los compuestos de fórmula (VII) pueden estar disponibles en el mercado o prepararse por adaptación o aplicación de métodos conocidos o de acuerdo con los ejemplos.

A continuación se da un esquema ejemplar, no limitante, para esta realización del proceso de la invención:



De acuerdo con un segundo aspecto, el compuesto de fórmula (I) puede obtenerse a partir del compuesto correspondiente de fórmula (III'):

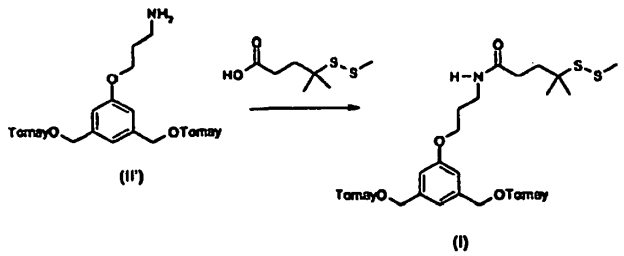


(III')

en la que ---- Y, Y', X, A, A', X', m, n, m', n', W, W', U, U', - - - -, , R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (I) y T'' es un grupo precursor opcionalmente protegido de T.

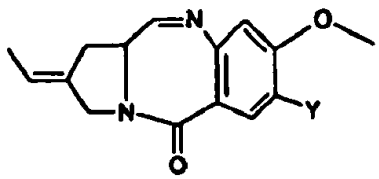
Un grupo precursor de T se refiere a cualquier grupo que pueda conducir a T por modificación química o acoplamiento. Preferiblemente, T se obtiene por acoplamiento de T' con la porción complementaria correspondiente, donde T' y la porción complementaria comprenden funciones que son reactivas entre sí, por ejemplo, T' comprende una función amina y la porción complementaria comprende una función ácido.

Un ejemplo representativo de esta reacción es:



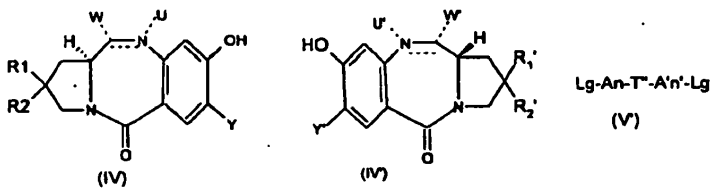
(II') (I)

donde Tomay representa un derivado de tomaimicina de fórmula:



En general, esta reacción se realiza en presencia de: N-hidroxisuccinimida y HOBT.

El compuesto de fórmula (III') puede obtenerse por acoplamiento del compuesto correspondiente de fórmulas (IV), (IV') y (V'):



(IV) (IV') (V')

donde Y, Y', A, A', n, n', T', W, W', U, U', - - - -, ---- , R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (III), T'' es un grupo precursor de T opcionalmente protegido y Lg es un grupo saliente tal como halógeno o OMs, OTs.

Los compuestos de fórmula (IV) y (IV') son generalmente compuestos conocidos y están disponibles por síntesis total (M. Mori et al, 42 Tetrahedron, 3793-3806, 1986) o se producen por especies de Streptomyces, en particular, siguiendo el procedimiento de la patente de Francia Fr. 1.516.743.

Los compuestos de fórmula (V') pueden obtenerse a partir de compuestos correspondientes de fórmula (VII):

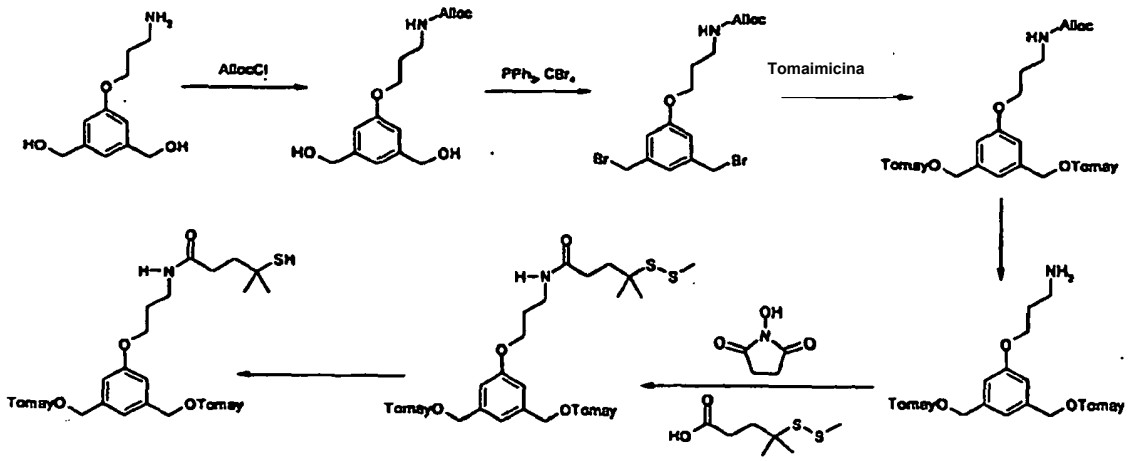
(VII) HO-An-T''-A'n'-OH

en la que A, A', n, n' son como se han definido en la fórmula (I), T'' es un grupo precursor opcionalmente protegido de T'.

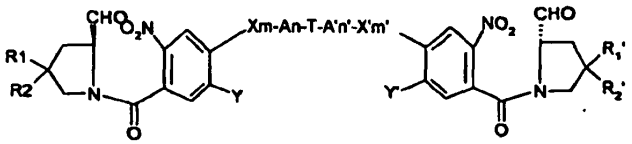
Esta reacción se realiza generalmente en presencia de PPh_3 y $CHal_4$.

Los compuestos de fórmula (VII) pueden estar disponibles en el mercado o prepararse por adaptación o aplicación de métodos conocidos o de acuerdo con los ejemplos.

A continuación se da un esquema ejemplar, no limitante, para esta realización del proceso de la invención:



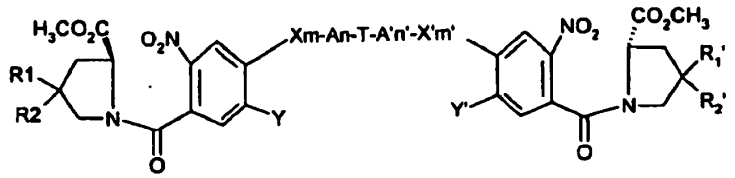
De acuerdo con un tercer aspecto, el proceso de preparación del compuesto de fórmula (I) comprende la etapa de ciclar el compuesto correspondiente de fórmula (VIII):



(VIII)

donde Y, Y', X, A, A', X', m, n, m', n', R1, R2, R1', R2', T se definen como en la fórmula (I). En general, esta reacción se realiza en presencia de un reactivo tal como hidrosulfito sódico ($Na_2S_2O_4$), en un disolvente apropiado tal como una mezcla de THF y agua, seguido de la adición de metanol y AcCl.

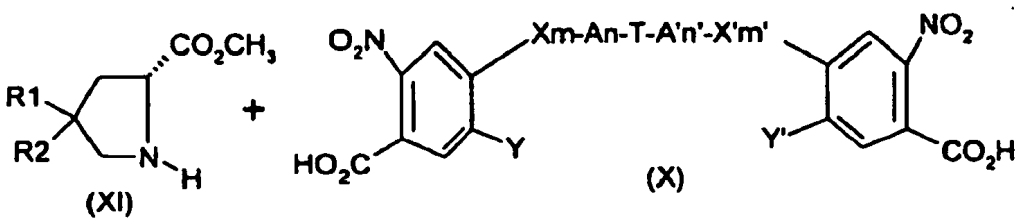
El compuesto de fórmula (VIII) puede obtenerse a partir del compuesto correspondiente de fórmula (IX):



(IX)

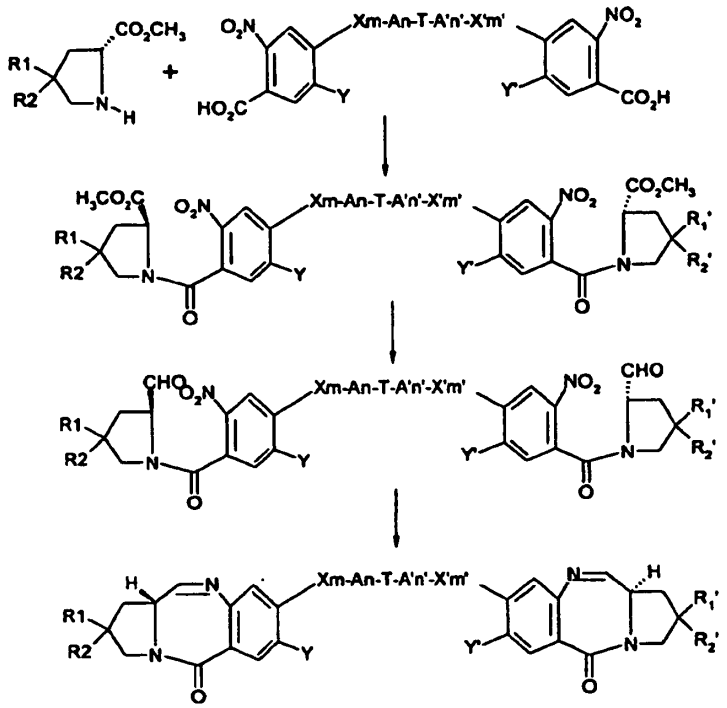
en la que Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T se definen como en la fórmula (I). En general, esta reacción se realiza en presencia de un reactivo tal como DIBAL-H en un disolvente apropiado, tal como tolueno.

El compuesto de fórmula (IX) puede obtenerse por acoplamiento de los compuestos correspondientes de fórmula (X) y (XI):



en la que Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T se definen como en la fórmula (I). En general, esta reacción se realiza mediante la adición a (X) de un reactivo tal como cloruro de oxalilo en un disolvente apropiado, tal como DMF, seguido de adición de (XI) en un disolvente apropiado, tal como THF.

A continuación se da un esquema representativo:



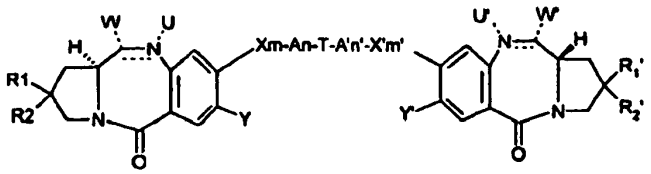
Las reacciones anteriores pueden realizarse por el especialista aplicando o adaptando los métodos ilustrados en los ejemplos de ahora en adelante.

Además, el proceso de la invención también puede comprender la etapa adicional de aislar el compuesto de fórmula (I) y (II). Esto puede realizarse por el especialista mediante cualquiera de los medios convencionales conocidos, tales como los métodos de recuperación descritos anteriormente.

Los productos de partida están disponibles en el mercado o pueden obtenerse aplicando o adaptando cualquiera de los métodos conocidos o los descritos en los ejemplos.

La síntesis también puede realizarse en un recipiente como una reacción multicomponente.

De acuerdo a un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos un derivado de tomaimicina unido covalentemente a un agente de unión a célula a través de un grupo enlazador, en donde dicho derivado de tomaimicina es de fórmula (I'):



(I')

donde

- - - - representa un enlace sencillo opcional; ——— representa bien un enlace sencillo o un enlace doble;

con la condición de que cuando ——— representa un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representan independientemente H, y W y W', iguales o diferentes, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como –OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como –NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfito tal como –SO3-, , un bisulfito tal como -OSO_3, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como –NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como –NRCOR, un azido tal como –N3, un ciano, un halo, un trialquilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido; Preferiblemente W y W' son iguales o diferentes y son OH, Ome, Oet, $NHCONH_2$, SMe;

y cuando ——— represente un doble enlace, U y U' están ausentes y W y W' representan H;

■ R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre un Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, S(O)qR, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

Preferiblemente, R1= R2= R1'= R2'= H, o más preferiblemente R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un enlace doble que contiene el grupo =B y =B' respectivamente.

■ B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre alquilo opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$

Preferiblemente, B=B'.

Más preferiblemente, B=B'= $=CH_2$ o $=CH-CH_3$,

X=X'=O.

■ A, A' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquilo o Alquenilo opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, S(O)qR, Arilo, Het, Alquilo, Alquenilo.

Preferiblemente, A=A'.

Más preferiblemente, A=A'=alquilo lineal no sustituido.

■ Y, Y' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, OR;

Preferiblemente Y=Y'.

Más preferiblemente y=Y'=OAlquilo, más preferiblemente OMetilo.

■ T es -NR-, o un arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, todos opcionalmente sustituidos con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, S(O)qR, Alquilo, y sustituidos con uno o más enlazador(es).

Preferiblemente, T es un grupo arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, más preferiblemente fenilo o piridilo sustituido con uno o más enlazador(es).

El conjugado se describe en las reivindicaciones 12-15.

Los grupos de unión adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen grupos tiol, sulfuro, disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles y grupos esterasa lábiles. Se prefieren los grupos disulfuro y tioéter.

Cuando el grupo de unión es un grupo que contiene tiol-, sulfuro o disulfuro, la cadena lateral que tiene el grupo tiol o disulfuro puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. Los especialistas en la materia pueden identificar fácilmente cadenas laterales adecuadas.

Los sustituyentes que contienen tiol-, sulfuro- o disulfuro- incluyen

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y\ SZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$piperazino-

$CO(CR_{15}R_{16})_USZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazin-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-QSZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-

QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-O(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-O-fenil-QSZ', -O-furil-QSZ', -O-oxazolil-QSZ', -O-tiazolil-QSZ',

-O-tienil-QSZ', -O-imidazolil-QSZ', -O-morfolino-QSZ', -O-piperazino-QSZ',

-O-N-metilpiperazino-QSZ',

$-OCO-(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-OCO-fenil-QSZ', -OCO-furil-QSZ', -OCO-oxazolil-QSZ', -OCO-

tiazolil-QSZ', -OCO-tienil-QSZ', -OCO-imidazolil-QSZ', -OCO-

morfolino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_y\ SZ'$,

-CO-$(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-CO-fenil-QSZ', -CO-furil-QSZ', -CO-oxazolil-QSZ', -CO-tiazolil-QSZ',

-CO-tienil-QSZ', -CO-imidazolil-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-

piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metilpiperazino-QSZ',

-$NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$NR_{19}CO$ NR_{12} $(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-NR_{19}CO-fenil-QSZ', -NR_{19}CO-furil-QSZ', -NR_{19}CO-oxazolil-QSZ',

-NR_{19}CO-tiazolil-QSZ', -NR_{19}CO-tienil-QSZ', -NR_{19}CO-imidazolil-QSZ',

-NR_{19}CO-morfolino-QSZ', -NR_{19}CO-piperazino-QSZ', -NR_{19}CO-

piperidino-QSZ', -NR_{19}CO-N-metilpiperazino-QSZ',

-NR_{19}-fenil-QSZ', -NR_{19}-furil-QSZ', -NR_{19}-oxazolil-QSZ', -NR_{19}-

tiazolil-QSZ', -NR_{19}-tienil-QSZ', -NR_{19}-imidazolil-QSZ', -NR_{19}-

morfolino-QSZ', -NR_{19}-piperazino-QSZ', -NR_{19}-piperidino-QSZ',

-NR_{19}-N-metilpiperazino-QSZ',

-NR_{19}CO-NR_{12}-fenil-QSZ', -NR_{19}CO-NR_{12}-oxazolil-QSZ', -NR_{19}CO-NR_{12}-

tiazolil-QSZ', -NR_{19}CO-NR_{12}-tienil-QSZ', -NR_{19}CO-NR_{12}-piperidino-QSZ',

-$S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-$SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_tCR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-SCO-morfolino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', y

-SCO-N-metilpiperazino-QSZ', en donde:

Z' es H, un grupo protector de tiol, tal como Ac, R_{19}' o SR_{19}',

donde Q es un enlace directo o un grupo alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene 1-10 átomos de carbono o un espaciador de polietilenglicol con 2 a 20 unidades de repetición etileno oxi;

R_{19}' y R_{12} son iguales o diferentes y son alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o un grupo arilo o heterocíclico simple o sustituido, y R_{12} puede ser además H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} y R_{16} son iguales o diferentes y son H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono,

R_{17}, R_{18} y R_{19} son H o alquilo,

u es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

t es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

y es un número entero de 1 a 20 y también puede ser 0.

■ n, n', iguales o diferentes son 0 o 1, y n=n'=1.

■ q es 0, 1 o 2.

R, R' son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de H, Alquilo, Arilo, opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het;

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros,

estando dicho derivado unido covalentemente a un agente de unión a las células a través de dicho enlazador.

En particular, n=n'=1.

Los agentes de unión a la célula pueden ser de cualquier tipo e incluyen péptidos y no péptidos. En general, pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales) o un fragmento de un anticuerpo que contenga al menos un sitio de unión, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina) o cualquier otra molécula o sustancia que se une a células. Los ejemplos más específicos de agentes que se unen a células que se pueden usar incluyen: anticuerpos monoclonales; anticuerpos monocatenarios; fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$ y F_v {Parham, 131 J. Immunol. 2.895-2.902 (1.983); Spring et al, 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al, 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960)}; interferones; péptidos; linfocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormonas tales como insulina, TRH (hormonas liberadoras de tirotropina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos; factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGFα, factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF y GM-CSF {Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1.984)}; vitaminas, tales como folato y transferrina {O'Keefe et al, 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1.985)}.

La tecnología de los anticuerpos monoclonales permite la producción de agentes que se unen a células extremadamente selectivos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. Son particularmente bien conocidas en la técnica las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos por inmunización de ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como la célula diana intacta, antígenos aislados a partir de la célula diana, virus enteros, virus enteros atenuados y proteínas virales tales como proteínas de la cubierta viral.

La selección del agente que se une a células apropiado se elige dependiendo de la población celular particular que se vaya a fijar como diana, pero en general se prefieren los anticuerpos monoclonales si está disponible uno apropiado.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG_1 murino que se une específicamente al antígeno CD33 {J. D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)} y puede usarse si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de la leucemia mielógena aguda (AML). De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG_1 murina que se une al antígeno CD19 en células B {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)} y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en linfoma no-Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica.

Además, GM-CSF que se une a las células mieloides puede usarse como agente que se une a células para unirse a células enfermas de la leucemia mielógena aguda. IL-2, que se une a células T activadas, puede usarse para la prevención del rechazo de injertos trasplantados, para la terapia y prevención de la enfermedad de injerto contra el anfitrión y para el tratamiento de la leucemia aguda de células T. MSH, que se une a los melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma.

Las moléculas conjugadas de la invención pueden formarse usando cualquier técnica. Preferiblemente, los derivados se sintetizan de manera que contengan un grupo tiol libre o protegido, y después uno o más derivados que contienen disulfuro o tiol se unen covalentemente al agente de unión a las células a través de un enlace disulfuro o un enlace tioéter.

En los documentos USP 5.416.064 y USP 5.475.092 se describen numerosos métodos de conjugación. Más preferiblemente, los derivados de tomaimicina se tratan para crear un grupo tiol libre o protegido y luego los derivados de tomaimicina que contienen disulfuro o tiol se unen al agente de unión a la célula mediante enlaces disulfuro.

Son conjugados representativos de la invención anticuerpo-derivado de tomaimicina, fragmento de anticuerpo-derivado de tomaimicina, factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés)-derivado de tomaimicina, hormona estimuladora de melanocitos (MSH, por sus siglas en inglés)-derivado de tomaimicina, hormona estimuladora del tiroides (TSH, por sus siglas en inglés)-derivado de tomaimicina, estrógeno-derivado de tomaimicina, análogo de estrógeno-derivado de tomaimicina, andrógeno-derivado de tomaimicina, análogo de andrógeno-derivado de tomaimicina y folato-derivado de tomaimicina.

Los conjugados de derivado de tomaimicina y anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, hormonas proteicas o peptídicas, factores de crecimiento proteicos o peptídicos y otras proteínas se obtienen de la misma manera por métodos conocidos. Por ejemplo, los péptidos y anticuerpos se pueden modificar con reactivos de entrecruzamiento, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo, 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP), 4-succinimidil-oxicarbonil- α-metil- α-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), butirato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SDPB), butirato de N-sulfosuccinimidil-3-(2-(5-nitro-piridilditio) (SSNPB), 2-iminotiolano o anhídrido S-acetilsuccínico por métodos conocidos. Véanse, Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978); Blattler et al., 24 Biochem. 1517-1524 (1985); Lambert et al., 22 Biochem. 3913-3920 (1983); Klotz et al., 96 Arch. Biochem. Biophys. 605 (1962); y Liu et al., 18 Biochem. 690 (1979), Blakey y Thorpe, 1 Antibody, Immunoconjugates & Radiopharmaceuticals, 1-16 (1988), Worrell et al. 1 Anti-Cancer Drug Design 179-184 (1986). El agente de unión a la célula que contiene tiol libre o protegido obtenido de esta forma posteriormente se hace reaccionar con un derivado de tomaimicina que contiene disulfuro o tiol para producir los conjugados. Los conjugados se pueden purificar por HPLC o por filtración en gel.

Preferiblemente, los conjugados derivado de tomaimicina-anticuerpo monoclonal o derivado de tomaimicina-agente de unión a las células son los que están unidos mediante un enlace disulfuro, como se ha indicado anteriormente, que son capaces de liberar los derivados de tomaimicina. Tales conjugados de unión a la célula se preparan por métodos conocidos, tales como por modificación de los anticuerpos monoclonales con piridil-ditiopropionato de succinimidilo (SPDP) (Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978)). El grupo tiopiridilo resultante después se desplaza por tratamiento con derivados de tomaimicina que contienen tiol para producir conjugados unidos por enlaces disulfuro. Alternativamente, en el caso de los arilditio-derivados de tomaimicina, la formación del conjugado de unión a las células se realiza por desplazamiento directo del aril-tiol del derivado de tomaimicina por grupos sulfhidrilo previamente introducidos en las moléculas de anticuerpo. Los conjugados que contienen de 1 a 10 fármacos de derivado de tomaimicina unidos mediante un puente disulfuro se preparan fácilmente por cualquier método.

Más específicamente, se trata una disolución del anticuerpo modificado por ditio-nitropiridilo a una concentración de 2,5 mg/ml en disolución tampón de fosfato potásico 0,05 M, a pH 7,5, que contiene EDTA 2 mM, con el derivado de tomaimicina que contiene tiol (1,3 eq. molares/grupo ditiopiridilo). La liberación de la tio-nitropiridina del anticuerpo modificado se sigue espectrofotométricamente a 325 nm y se completa en aproximadamente 16 horas. El conjugado derivado de tomaimicina-anticuerpo se purifica y se libera del fármaco sin reaccionar y otro material de bajo peso molecular por exclusión molecular a través de una columna de Sephadex G-25 o Sephacryl S300. El número de restos de derivado de tomaimicina unidos por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo la relación entre la absorbancia a 230 nm y a 275 nm. Por este método se pueden unir mediante enlaces disulfuro una media de 1-10 moléculas de derivado de tomaimicina/molécula de anticuerpo.

El efecto de la conjugación sobre la afinidad de unión por las células que expresan el antígeno se puede determinar utilizando los métodos descritos previamente por Liu et al., 93 Proc. Natl. Acad. Sci 8618-8623 (1.996). La citotoxicidad de los derivados de tomaimicina y sus conjugados de anticuerpo para líneas celulares se puede medir por retro-extrapolación de las curvas de proliferación celular, como se describe en Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648-3651 (1.985). La citotoxicidad de estos compuestos contra líneas de células adherentes se puede determinar por ensayos clonogénicos, como se describe en Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1.312-1.319 (1.986).

Son conjugados representativos de la invención los derivados de tomaimicina con anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), hormona estimuladora de melanocitos (MSH), hormona estimuladora del tiroides (TSH), estrógenos, análogos de estrógenos, andrógenos y análogos de andrógenos.

A continuación se describen ejemplos representativos de la preparación de diversos conjugados de derivados y agentes de unión a la célula.

Enlazantes disulfuro: Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG_1 murino que se une específicamente al antígeno CD33 {J. D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)} y puede usarse si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de la leucemia mielógena aguda (AML). De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG_1 murina que se une al antígeno CD19 en células B {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)} y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en linfoma no-Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica.

Además, GM-CSF que se une a las células mieloides puede usarse como agente que se une a células para unirse a células enfermas de la leucemia mielógena aguda. IL-2, que se une a células T activadas, puede usarse para la prevención del rechazo de injertos trasplantados, para la terapia y prevención de la enfermedad de injerto contra el anfitrión y para el tratamiento de la leucemia aguda de células T. MSH, que se une a los melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma.

El anticuerpo u otro agente de unión a las células se modifica con N-succinimidil-3-piridilditio propionato como se ha descrito previamente {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, Biochem. J., 173:723 (1978)} para introducir, en promedio, 4 grupos piridilditio por molécula de anticuerpo. El anticuerpo modificado se hace reaccionar con el derivado que contiene tiol para producir un conjugado unido por enlaces disulfuro.

Alternativamente, los conjugados se pueden preparar por aplicación y/o adaptación del método descrito en el documento de patente WO2004/103272.

Enlazadores tioéter: Los derivados que contienen tiol de la presente invención pueden unirse a anticuerpos y otros agentes que se unen a células a través de un enlace tioéter como se ha descrito previamente (Pat. EEUU No 5.208.020). El anticuerpo u otro agente de unión a células puede modificarse con el compuesto disponible comercialmente tal como *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(*N*-male-imidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC). Estos reactivos de entrecruzamiento forman enlazadores no escindibles derivados de restos basados en maleimido.

Los reactivos de entrecruzamiento que comprenden un resto basado en haloacetilo incluyen 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), yodoacetato de *N*-succinimidilo (SIA), bromoacetato de *N*-succinimidilo (SBA) y 3-(bromo-acetamido)propionato de *N*-succinimidilo (SBAP). Estos reactivos de entrecruzamiento forman enlazantes no escindibles procedentes de restos basados en haloacetilo.

Los conjugados preparados por los métodos anteriores pueden purificarse por técnicas de cromatografía convencionales tales como exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción incluyendo, pero no limitándose a, intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía sobre hidroxiapatito cerámico o en Porapak o por HPLC. También puede usarse la purificación por diálisis o diafiltración.

Preferiblemente, los conjugados entre anticuerpos monoclonales o agentes de unión a las células y derivados de la presente invención son los que se unen a través de un enlace disulfuro, como se ha descrito anteriormente. Tales conjugados de unión a la célula se preparan por métodos conocidos, tales como por modificación de los anticuerpos monoclonales con piridil-ditiopropionato de succinimidilo (SPDP) {Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978)}. El grupo tiopiridilo resultante se desplaza luego por tratamiento con un derivado que contiene tiol para producir conjugados enlazados por disulfuro. Por este método se preparan fácilmente conjugados que contienen de 1 a 10 derivados a través de un puente disulfuro. La conjugación por este método se describe con detalle en la Pat. EEUU 5.585.499, que se incorpora por referencia.

De acuerdo con un aspecto preferido, el agente de unión a la célula es un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal.

De acuerdo con otro aspecto preferido, el agente de unión a las células es un fragmento de anticuerpo con especificidad de antígeno, tal como sFV, Fab, Fab', o $F(ab')_2$.

De acuerdo con otro objetivo, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula conjugada de la invención o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro objetivo, la presente invención también se refiere a un método para destruir o inhibir el crecimiento de células, preferiblemente poblaciones celulares seleccionadas, que comprende poner en contacto células diana o tejidos que contienen células diana con una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

La población celular seleccionada consiste en células cancerosas y/o proliferativas.

De acuerdo con la presente invención, “tratamiento selectivo de cánceres” se refiere a la destrucción de células cancerosas y/o proliferativas sustancialmente sin destruir células normales y/o no proliferativas.

De acuerdo con otro objetivo, la presente invención también se refiere al uso de una molécula conjugada de la invención o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres.

El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede ponerse en práctica *in vitro*, o ex vivo.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de cultivos celulares para destruir todas las células excepto variantes deseadas que no expresen el antígeno diana o para destruir las variantes que expresen un antígeno no deseado.

Las condiciones de uso *in vitro* no clínico se determinan fácilmente por el experto en la técnica.

Los ejemplos de usos *ex vivo* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para destruir células enfermas o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra el anfitrión (GVHD).

El tratamiento *ex vivo* clínico para eliminar células tumorales o células linfoides de médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento de cáncer o en el tratamiento de enfermedad autoinmune o para eliminar células T y otras células linfoides de médula ósea o de tejido alogénico antes del trasplante para prevenir la GVHD, puede realizarse

como se indica a continuación. Se recoge médula ósea del paciente u otro individuo y después se incuba en un medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención, en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 10 μM a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37ºC. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación (= dosis) se determinan fácilmente por el experto en la técnica. Después de la incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por infusión i.v. según métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de todo el cuerpo entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula ósea tratadas se conservan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico estándar.

Para uso *in vivo* clínico, el agente citotóxico de la invención se suministrará como disoluciones que se ensayan con respecto a la esterilidad y con respecto a los niveles de endotoxinas o como un sólido liofilizado que puede redisolverse en agua estéril para inyección. A continuación se proporcionan ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados. Los conjugados se administran semanalmente durante 6 semanas como un bolo i.v. Las dosis de bolo se administran en 50 a 400 ml de disolución salina normal a la que puede añadirse albúmina de suero humano (por ej., de 0,5 a 1 ml de una disolución concentrada de albúmina de suero humano, 100 mg/ml). Las dosificaciones serán de aproximadamente 50 μg a 10 mg/kg de peso corporal por semana, i.v. (intervalo de 10 μg a 100 mg/kg por inyección). Seis semanas después del tratamiento, el paciente puede recibir un segundo tratamiento. El experto en la técnica puede determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a la ruta de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., cuando lo justifique la situación clínica.

Los ejemplos de condiciones médicas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos *in vivo* o *ex vivo* de destrucción de poblaciones celulares seleccionadas incluyen tumor maligno de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovarios y órganos linfáticos; melanomas; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injerto tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad del injerto frente al anfitrión; infecciones víricas tales como infección por CMV, infección por VIH, SIDA etc.; infección bacteriana e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras, como determine un experto en la técnica.

La identificación de los pacientes que necesitan tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas en este documento está bien dentro de la capacidad y conocimiento del especialista en la técnica. Un veterinario o un médico especialistas en la técnica pueden identificar fácilmente, por medio del uso de ensayos clínicos, examen físico, historia médica/familiar o ensayos biológicos y diagnósticos, los sujetos que necesitan dicho tratamiento.

Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse fácilmente por el médico a cargo del caso, como especialista en la materia, por medio del uso de técnicas convencionales y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz, el médico a cargo del diagnóstico considera varios factores que incluyen, pero no se limitan a: la especie de sujeto; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica implicada; el grado de complicación o la gravedad de la enfermedad; la respuesta del sujeto individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen posológico seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

La cantidad de un compuesto de fórmula (I) o conjugado que se requiere para conseguir el efecto biológico deseado variará dependiendo de varios factores que incluyen las características químicas (por ejemplo, hidrofobia) de los compuestos empleados, la potencia de los compuestos, el tipo de enfermedad, la especie a la que pertenece el paciente, el estado de enfermedad del paciente, la vía de administración, la biodisponibilidad del compuesto por la vía elegida, todos los factores que dictan las cantidades de dosificación requeridas, la liberación y el régimen que se va a administrar.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se administran a un animal o a un ser humano, según sea apropiado.

Como se usa en este documento, “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier soporte, diluyente, adyuvante o vehículo, tales como agentes conservantes o antioxidantes, cargas, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y para retrasar la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que algún medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se considera su uso en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios como combinaciones terapéuticas adecuadas.

En el contexto de la invención, el término “tratar” o "tratamiento", como se usa en este documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o la afección a la que se aplica tal término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad de un compuesto/medicamento de acuerdo con la presente invención eficaz para prevenir o tratar el estado patológico al que se hace referencia en este documento.

De acuerdo con la invención, el término “paciente” o “paciente que lo necesita" pretende hacer referencia a un animal o un ser humano que padece o que probablemente padecerá uno de los estados patológicos a los que se hace referencia en este documento. Preferiblemente, el paciente es un ser humano.

En términos generales, los compuestos de esta invención pueden proporcionarse en una disolución acuosa de tampón fisiológico que contiene de 0,1 a 10 % p/v de compuesto para administración parenteral. Los intervalos de las dosis típicas son de 1 µg/kg a 0,1 g/kg de peso corporal al día; un intervalo de dosis preferido es de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal al día o una dosis equivalente en un niño. La dosificación preferida de fármaco a administrar probablemente dependerá de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del compuesto, la vía de administración (intravenosa, intramuscular u otra), las propiedades farmacocinéticas del compuesto por la vía de administración elegida y la velocidad (embolada o infusión continua) y el programa de administración (número de repeticiones en un periodo de tiempo dado).

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en formas de dosificación unitarias, donde el término “dosis unitaria” significa una sola dosis que puede administrarse a un paciente, y que puede manipularse y envasarse fácilmente, permaneciendo como una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el propio compuesto activo, o como una composición farmacéuticamente aceptable, como se describe más adelante en este documento. Como tales, los intervalos típicos de las dosis diarias totales son de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. A modo de pauta general, las dosis unitarias para los seres humanos varían de 1 mg a 3000 mg al día. Preferiblemente, el intervalo de dosis unitaria es de 1 a 500 mg administrados de una a seis veces al día, e incluso más preferiblemente de 10 mg a 500 mg una vez al día. Los compuestos proporcionados en este documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas por medio de su mezcla con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones de dosis unitarias pueden prepararse para uso por administración oral, particularmente en forma de comprimidos, cápsulas sencillas o cápsulas de gel blando; o por vía intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles; o por vía dérmica, por ejemplo, tópicamente o en pomadas, cremas, lociones, geles o pulverizaciones, o por medio de parches transdérmicos.

Las composiciones pueden administrarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed.; Ed. Gennaro, A. R.; Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2.000.

Las formulaciones preferidas incluyen composiciones farmacéuticas en las que un compuesto de la presente invención se formula para administración oral o parenteral.

Para la administración oral, los comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno o más de cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina o goma de tragacanto; un diluyente tal como almidón o lactosa; un disgregante tal como almidón y derivados de celulosa; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta o salicilato de metilo. Las cápsulas pueden estar en forma de una cápsula dura o una cápsula blanda, que generalmente se preparan a partir de mezclas de gelatina opcionalmente combinadas con plastificantes, así como una cápsula de almidón. Además, Las formas de dosificación unitarias pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca o agentes entéricos. Otras formas de dosificación orales tales como jarabes o elixires pueden contener agentes edulcorantes, conservantes, tintes, colorantes y aromatizantes. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de disolución rápida, de liberación modificada o de liberación sostenida, siendo preferiblemente dichas formulaciones de liberación sostenida bimodales. Los comprimidos preferidos contienen lactosa, almidón de maíz, silicato de magnesio, croscarmelosa sódica, povidona, estearato de magnesio o talco en cualquier combinación.

Las preparaciones líquidas para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones, acuosas o no acuosas, estériles. Las composiciones líquidas también pueden incluir agentes aglutinantes, tampones, conservantes, agentes quelantes, edulcorantes, aromatizantes y colorantes y similares. Los disolventes no acuosos incluyen: alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen mezclas de alcoholes y agua, medios tamponados y disolución salina. En particular, pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de los compuestos activos, los polímeros biocompatibles y biodegradables de lactida, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno -polioxipropileno. Los vehículos intravenosos pueden incluir fluidos y agentes para reponer nutrientes, agentes para reponer electrólitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Otros sistemas de liberación parenteral que podrían ser útiles para estos compuestos activos incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas.

Los modos alternativos de administración incluyen formulaciones para inhalación, que incluyen medios tales como polvo seco, aerosol o gotas. Pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como un gel para aplicación intranasal. Las formulaciones para administración bucal incluyen, por ejemplo, grageas o pastillas y también pueden incluir una base aromatizada, tal como sacarosa y goma arábiga, y otros excipientes tales como glicocolato. Las formulaciones adecuadas para administración rectal preferiblemente se presentan como supositorios de una sola dosis, con un vehículo sólido, tal como manteca de cacao, y pueden incluir un salicilato. Las formulaciones para aplicación tópica a la piel preferiblemente toman la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol o aceite. Los vehículos que pueden usarse incluyen parafina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes o sus combinaciones. Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos y pueden ser emulsiones lipófilas o soluciones acuosas tamponadas, disueltas y/o dispersas en un polímero o un adhesivo.

La invención se ilustra adicionalmente pero sin restricción por la descripción de los siguientes ejemplos.

Parte experimental

■ **Método A1: Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS)**

Se usa un software Micromass MassLynx y el análisis se realiza en un HPLC Agilent 1100 series con una columna THERMO Hypersil Gold C18 de 3 µm (50 x 3 mm) usando un gradiente de elución con una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua/ácido fórmico al 0,1% (gradiente: 5% de A: 95% de B hasta 95% de A: 5% de B durante 5 minutos, 95% de A: 5% de B durante 0,5 minutos, 95% de A: 5% de B disminuyendo a 5% de A: 95% de B durante 1 minuto, 5% de A: 95% de B durante 0,5 minutos) con un caudal de 0,8 ml/minuto; espectrómetro Waters-Micromass Plataforma I, Plataforma II o ZQ con Electronebulización (aislamiento positivo y negativo); Serie de Diodos en línea (190-490 nm); detector auxiliar Sedere (France) Model SEDEX 65 Evaporative Light Scattering (ELS) detector.

■ **Método A2: Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS)**

Se usa un software Micromass MassLynx y el análisis se realiza en un HPLC Waters Alliance con una columna WATERS XBridge C18 de 3,5 µm (100 x 3 mm) usando un gradiente de elución con una mezcla de (A) metanol y (B) agua/ácido fórmico al 0,1% (gradiente: 5% de A: 95% de B hasta 95% de A: 5% de B durante 10 minutos, 95% de A: 5% de B disminuyendo a 5% de A: 95% de B durante 1 minuto, 5% de A: 95% de B durante 2 minutos) con un caudal de 1,1 ml/minuto; espectrómetro Waters-Micromass Plataforma II con Electronebulización (ionización positiva y negativa); Serie de Diodos en línea (190-500 nm); detector auxiliar Sedere (Francia) detector Evaporativo de Luz Dispersa (ELS) Modelo SEDEX 85.

■ **Método B: Purificación por Cromatografía Líquida a Alta Presión (HPLC)**

La purificación por HPLC se realizó sobre una columna Macherey Nagel Nucleodur C18 Gravity 5 µM (21 x 100 mm, número de catálogo 762101), eluyendo con una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua (gradiente: 5% de A: 95% de B durante 5 minutos, 5% de A: 95% de B hasta 100% de A durante 20 minutos, 100% de A durante 8 minutos, de 100% de A a 5% de A: 95% de B durante 1 minuto, 5% de A: 95% de B durante 11 minutos) con un caudal de 15 ml/minuto (Método B1) o 20 ml/minuto (Método B2).

- Método C: Espectros de masas por Ionización con Electrones (EI)

Los espectros de masas se registraron usando un espectrómetro de masas Finnigan SSQ 7000 (modo EI: 70 eV, temperatura de la fuente = 150ºC, introducción directa)

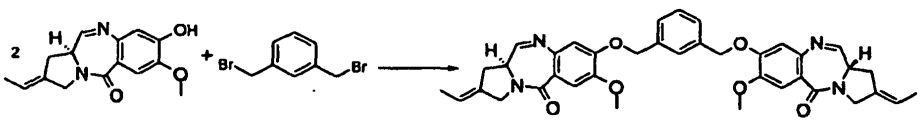
■ **Método D: Espectros de masas por Ionización Química (CI)**

Los espectros de masas por IQ se registraron usando un espectrómetro de masas Finnigan SSQ 7000 (amoniaco)

■ **Método E: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{1}H (RMN)**

Los espectros de ^{1}H RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance Drx-500, un espectrómetro Bruker Avance Drx-400 o un espectrómetro A Bruker Avance DRX-300.

■ **Ejemplo 1: 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (este compuesto no está reivindicado).**



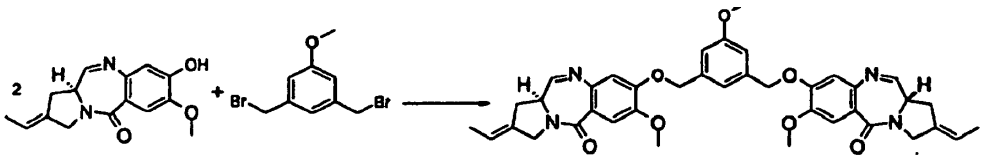
Se añadieron carbonato potásico (22,8 mg), α,α'-dibromo-*m*-xileno (7,3 mg) y yoduro potásico (9,1 mg) a una disolución agitada de tomaimicina (15 mg) en dimetilformamida (0,5 ml). La reacción se agitó durante 20 h a 30ºC.

Los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron dos veces con dimetilformamida (0,2 ml) y después se desecharon. A la segunda disolución de dimetilformamida se le añadió agua (0,4 ml) y la disolución resultante se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método B1. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] en forma de un polvo blanco (3,33 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma II):	ES : m/z = 647 MH^+
	Tiempo de retención = 3,53 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm) : 1,75 (d, J = 7,0 Hz, 6H) ; 2,96 (m, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,27 (s ancho, 4H) ; 5,17 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,23 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,85 (s, 2H) ; de 7,36 a 7,43 (m, 3H); 7, 51 (s ancho, 1H); 7,53 (s, 2H) ; 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

■ Ejemplo 2: 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilíden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (este compuesto no está reivindicado).



Puede prepararse 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Ejemplo 1), partiendo de 1,3-bis-bromometil-5-metoxi-benceno:

LC/MS (Método A1, Plataforma II):	ES : m/z = 677 MH^+
	Tiempo de retención = 4,17 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, $CDCl_3$-d1, δ en ppm) : 1,75 (d, J = 7,0 Hz, 6H) ; 2,96 (m, 4H) ; 3,81 (s, 3H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,26 (s ancho, 4H) ; 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,21 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,82 (s, 2H) ; 6,95 (s ancho, 2H) ; 7,07 (s ancho, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

Puede prepararse 1,3-bis-bromometil-5-metoxi-benceno como se indica a continuación:

Se añadió tetrabromuro de carbono (663 mg) a una disolución agitada de 1-bromometil-3-hidroximetil-5-metoxi-benceno (420 mg) en diclorometano anhidro (10 ml) en una atmósfera de argón. Después de enfriar la disolución resultante a 0ºC, se añadió gota a gota una disolución de trifenilfosfina (500 mg) en diclorometano anhidro (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h y después se concentró al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 30 g, Si60 15-40 µm, eluyendo con diclorometano/heptano, 40:60) para dar 1,3-bis-bromometil-5-metoxi-benceno (170 mg):

EI (Método C):	m/z = 292	$M^{+\cdot}$
	m/z = 213	$[M - Br]^{+\cdot}$
	m/z = 134	$[213 - Br]^{+\cdot}$

1H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm) : 3,77 (s, 3H) ; 4,65 (s, 4H) ; 6,98 (s ancho, 2H) ; 7,10 (s ancho, 1H)

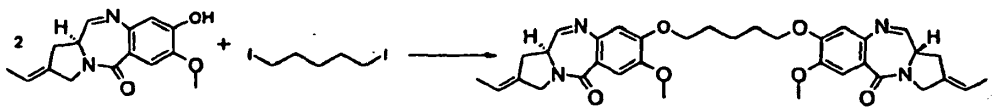
Puede prepararse 1-bromometil-3-hidroximetil-5-metoxi-benceno como se indica a continuación:

Se añadió tetrabromuro de carbono (3,47 g) a una disolución agitada de 1,3-dihidroximetil-5-metoxi-benceno (800 mg) en diclorometano anhidro (16 ml) en una atmósfera de argón. Después de enfriar la disolución resultante a 0ºC, se añadió gota a gota una disolución de trifenilfosfina (2,68 g) en diclorometano anhidro (16 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h y después se concentró al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 90 g, Si60 15-40 µm, eluyendo con metanol/diclorometano, 4:96) para dar 1-bromometil-3-hidroximetil-5-metoxi-benceno (420 mg):

EI (Método C):	m/z = 230	$M^{+\cdot}$
	m/z = 151	$[M - Br]^{+\cdot}$

1H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm) : 3,75 (s, 3H) ; 4,46 (d ancho, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,65 (s, 2H) ; 5,22 (t ancho, J = 5,5 Hz, 1 H) ; 6,83 (s ancho, 1 H) ; 6,88 (s ancho, 1 H) ; 6,97 (s ancho, 1 H)

■ **Ejemplo 3: 8,8'-[1,5-pentanediilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2, 1 -c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (este compuesto no está reivindicado)**



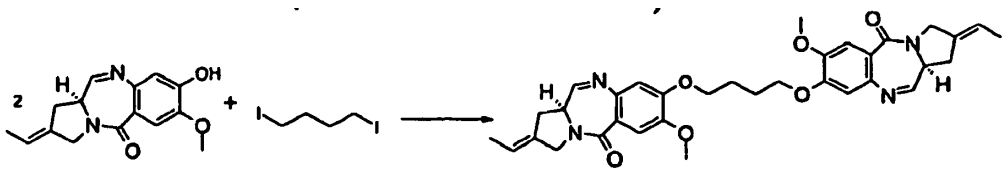
Se añadieron carbonato potásico (22,8 mg) y 1,5-diyodopentano (8,2 µl) a una disolución agitada de tomaimicina (15 mg) en dimetilformamida (0,5 ml). La reacción se agitó durante 20 h a temperatura ambiente y se añadió una porción adicional de carbonato potásico (8 mg). La reacción se agitó durante 20 h más a temperatura ambiente.

Los sólidos se retiraron por filtración y la disolución de dimetilformamida se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método B2. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] en forma de un polvo blanco (4 mg):

LC/MS (Método A2):	ES : m/z = 613 MH^+
	Tiempo de retención = 9,04 minutos

1H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm) : 1,66 (m parcialmente enmascarado, 2H) ; 1,75 (d ancho, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,96 (m, 4H) ; 2,97 (d ancho, J = 7,0 Hz, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,94 (s, 6H) ; 4,06 (m, 2H) ; 4,13 (m, 2H) ; 4,26 (s ancho, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,80 (s, 2H) ; 7,50 (s, 2H) ; 7,66 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

■ **Ejemplo 4: 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(*S*)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (este compuesto no está reivindicado)**

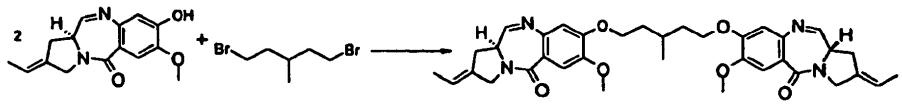


Puede prepararse 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Ejemplo 3), partiendo de 1,4-diyodobutano:

LC/MS (Método A1, Plataforma II):	ES : m/z = 599 MH^+
	m/z = 318,5 $(M + H + K)^{2+}/2$
	Tiempo de retención = 3,23 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm) : 1,75 (d ancho, J = 7,0 Hz, 6H) ; 2,10 (m, 4H) ; 2,98 (d ancho, J = 7,0 Hz, 4H) ; 3,90 (m, 2H) ; 3,93 (s, 6H) ; 4,11 (m, 2H) ; 4,20 (m, 2H) ; 4,27 (s ancho, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,82 (s, 2H) ; 7,50 (s, 2H) ; 7,66 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

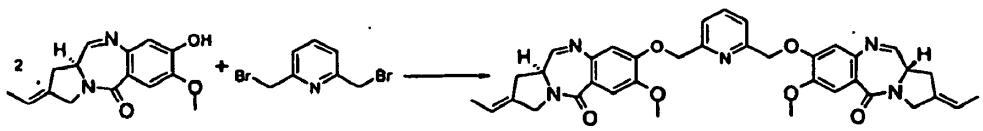
■ **Ejemplo 5: 8,8'-[3-metil-1 ,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (este compuesto no está reivindicado)**



Puede prepararse 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Ejemplo 1), partiendo de 1,5-dibromo-3-metilpentano:

LC/MS (Método A1, Plataforma II):	ES : m/z = 627 MH^+
	Tiempo de retención = 3,92 minutos

■ **Ejemplo 6: 8,8'-[2,6-piridindiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (este compuesto no está reivindicado)**

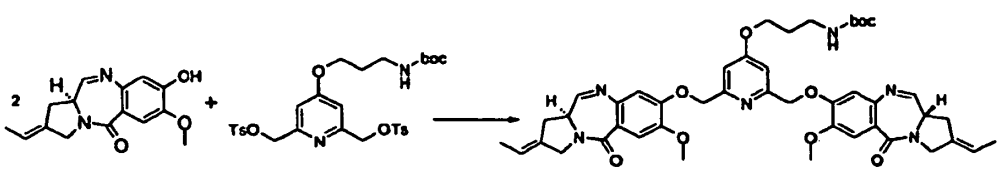


Puede prepararse 8,8'-[2,6-piridinadiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[1,3-benceno-diilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Ejemplo 1), partiendo de 2,6-bis-bromometil-piridina:

LC/MS (Método A1, ZQ):	ES : m/z = 648 MH^+
	Tiempo de retención = 3,21 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm) : 1,75 (d ancho, J = 6,5 Hz, 6H) ; de 2,94 a 2,99 (m, 4H); 3,90 (m, 2H) ; 3,99 (s, 6H) ; 4,27 (s ancho, 4H) ; 5,32 (s, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,86 (s, 2H) ; 7,48 (d, J = 8,0 Hz, 2H) ; 7,56 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H) ; 7,74 (t, J = 8,0 Hz, 1H).

■ **Ejemplo 7: Puede prepararse 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridinadiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:**

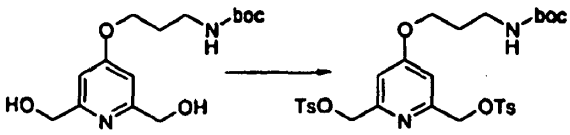


A una disolución agitada de tomaimicina (30 mg) en dimetilformamida (0,5 ml) se le añadieron carbonato potásico (45,7 mg), una disolución de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)-piridina (41 mg) en

dimetilformamida (0,5 ml) y yoduro potásico (18,3 mg). La reacción se agitó durante 20 h a 30ºC. Los sólidos se retiraron por filtración y se lavaron con dimetilformamida (0,2 ml). A la segunda disolución de dimetilformamida se le añadió agua (0,5 ml) y se añadió ácido fórmico hasta que se produjo la completa disolución del precipitado. La disolución resultante se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método B1. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridindiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (8,3 mg).

LC/MS (Método A1, Plataforma I):	ES :	m/z = 857	$MH^+ + 2\ H_2O$
		m/z = 839	$MH^+ + H_2O$
		m/z = 821	MH^+
		m/z = 721	$[M-C_5O_2H_8] + H^+$
Tiempo de retención = 3,67 minutos			

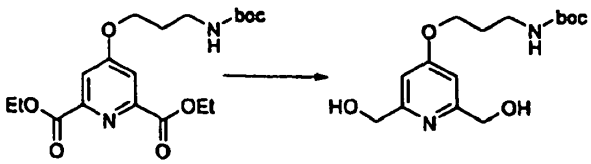
^{1}H R.M.N. (500 MHz, CD3CO2D-d4, δ en ppm) : 1,41 (s, 9H) ; 1,71 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 2,08 (m, 2H) ; 2,95 (m, 4H) ; 3,34 (m, 2H) ; 3,90 (s, 6H) ; 4,06 (m, 2H) ; 4,18 (m, 2H) ; de 4,24 a 4,36 (m, 4H); 4,43 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 5,50 (s ancho, 4H) ; 5,61 (m, 2H) ; de 6,80 a 7,70 (m muy ancho, 2H); 6,95 (s ancho, 2H) ; de 7,48 a 7,58 (m, 4H). Puede prepararse 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)-piridina como se indica a continuación:



A una disolución enfriada previamente (0ºC) de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (76 mg) en diclorometano (0,7 ml) se le añadió una disolución de hidróxido potásico (30 mg) en agua (0,3 ml). Se añadió cloruro de tosilo (93,7 mg) y la mezcla heterogénea resultante se agitó vigorosamente durante 1 h y después se lavó en un embudo de decantación usando diclorometano y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo tres veces con diclorometano. Las disoluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 10 g, SiOH 15-35 µm), usando un gradiente de elución con una mezcla de heptano (A) y acetato de etilo (B) (gradiente: 90% de A: 10% de B hasta 50% de A: 50% de B) para dar 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)piridina (56 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma I):	ES : m/z = 621 MH^+
	Tiempo de retención = 4,90 minutos

Puede prepararse 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina como se indica a continuación:

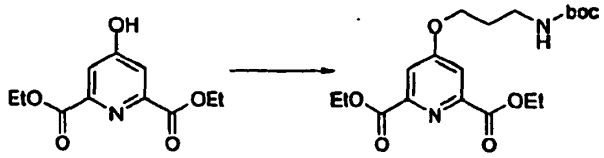


A una disolución de éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico (150 mg) en etanol absoluto (5 ml) se le añadieron borohidruro sódico (43 mg) y cloruro de calcio (128 mg). Después de agitar durante 4 h, cesó el desprendimiento de hidrógeno y la reacción se interrumpió con agua. El disolvente se evaporó a presión reducida. Después, el residuo se lavó en un embudo de decantación usando diclorometano y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo tres veces con diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina (80 mg):

LC/MS (Método A1, ZQ):	ES m/z = 313 MH^+
	Tiempo de retención = 1,90 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,37 (s, 9H) ; 1,84 (m, 2H) ; 3,08 (c, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,05 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,32 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,84 (s, 2H) ; 6,90 (t ancho, J = 6,5 Hz, 1H).

Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico como se indica a continuación:

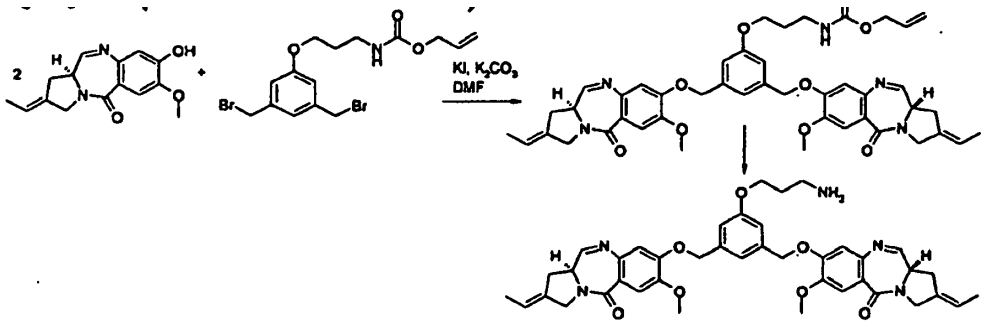


El éster dietílico del ácido quelidámico (Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonallato, U.; Vendrame, T. J. Org. Chem. 1989, 54, 5988) (150 mg) se disolvió en dimetilformamida seca (2 ml). Se añadieron 3-(terc-butoxi-amino)-propilo bromuro (164 mg) y carbonato potásico (130 mg). La mezcla resultante se agitó durante 15 h a 70ºC. La reacción se interrumpió con una disolución acuosa saturada de cloruro de amonio y después se lavó en un embudo de decantación usando acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las disoluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 30 g, Si60 15-40 µm), usando un gradiente de elución con una mezcla de heptano (A) y acetato de etilo (B) (gradiente: 60% de A: 40% de B hasta 50% de A: 50% de B) para dar éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico (150 mg):

CI (Método D) :	m/z = 397 MH^+

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,34 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,36 (s, 9H) ; 1,86 (m, 2H) ; 3,10 (c, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,21 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,37 (c, J = 7,0 Hz, 4H) ; 6,89 (m ancho, 1H) ; 7,71 (s, 2H)

■ **Ejemplo 8: Puede prepararse 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación: (este compuesto no está reivindicado)**

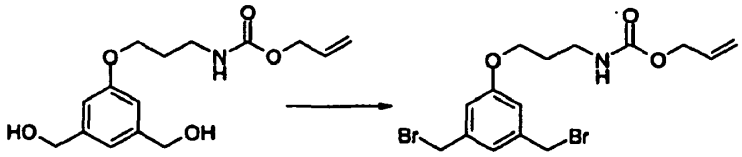


A una disolución agitada de tomaimicina (21 mg) en dimetilformamida (0,7 ml) se le añadieron carbonato potásico (32 mg), 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(bromometil)-benceno (16,2 mg) y yoduro potásico (12,8 mg). La reacción se agitó durante 20 h a 30ºC. Los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron dos veces con dimetilformamida (0,2 ml) y después se desecharon. A la segunda disolución de dimetilformamida se le añadió agua (0,5 ml) y el precipitado resultante se retiró por filtración, se lavó con agua y se secó por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10.

Al compuesto bruto (27 mg) disuelto en dimetilformamida (0,8 ml) se le añadieron tetraquis(trifenilfosfino)paladio (2 mg), trifenilfosfina (0,9 mg) y pirrolidina (5,6 µl). Después de agitar durante 15 h a 30ºC, se añadieron tetraquis(trifenilfosfino)paladio (2 mg), trifenilfosfina (1 mg) y pirrolidina (2,8 µl) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h más. A la disolución de dimetilformamida se le añadió agua (0,4 ml) y se añadió ácido fórmico hasta que se produjo la completa disolución del precipitado. La disolución resultante se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método B1. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis-(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (0,2 mg).

LC/MS (Método A1, Plataforma II):	ES : m/z = 800 MH^+
	Tiempo de retención = 2,84 minutos

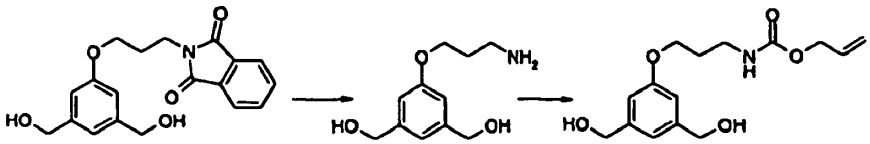
Puede prepararse 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(bromometil)-benceno como se indica a continuación:



A una suspensión de 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroxi-metil)-benceno (70 mg) en diclorometano (3 ml) se le añadieron tetrabromuro de carbono (248 mg) y una disolución de trifenilfosfina (199 mg) en diclorometano (2 ml). Después de calentar a reflujo durante 3 h, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 25 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con diclorometano para dar 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(bromometil)-benceno (52 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma II):	ES m/z = 420 MH^+
	Tiempo de retención = 4,50 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,85 (m, 2H) ; 3,15 (c, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,46 (d ancho, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,65 (s, 4H) ; 5,16 (d ancho, J=11,0 Hz, 1 H) ; 5,26 (d ancho, J=17,5 Hz, 1 H) ; 5,90 (m, 1 H); 6,96 (d, J = 1,5 Hz, 2H) ; 7,09 (t, J=1,5 Hz, 1 H) ; 7,29 (t ancho, J = 6,5 Hz, 1H) 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno se preparó como se indica a continuación :



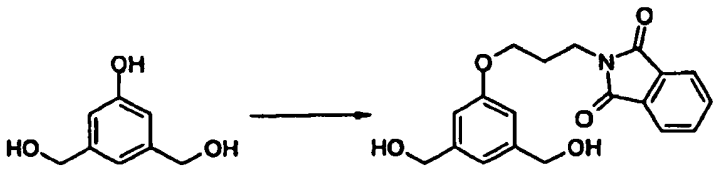
Se disolvió 5-(3-ftalimido-propiloxi)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (1,45 g) en una mezcla de diclorometano y etanol (25 ml, 25: 75). Se añadió hidrazina hidratada (0,62 mL) y la mezcla de reacción se llevó a reflujo durante 1 h. Se eliminó el disolvente a vacío y se disolvió el residuo en diclorometano. El residuo insoluble se retiró por filtración y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 70 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con metanol/diclorometano, 20:80 y después hidróxido de amonio/metanol/diclorometano, 0,5:25:75 para dar 1-(3-amino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroxi-metil)-benceno (1 g) adecuado para una transformación adicional.

Una muestra de 1-(3-amino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (100 mg) se disolvió en metanol (5 ml). A la disolución enfriada (0ºC) se le añadió una disolución de carbonato sódico (120 mg) en agua (5 ml) y cloroformiato de alilo (42 µl). Después de agitar durante 30 minutos a 0ºC, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h más. El disolvente se retiró al vacío Después, el residuo se lavó en un embudo de decantación usando acetato de etilo y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar 5-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-2,6-bis-(hidroximetil)benceno (75 mg):

EI (Método C):	m/z = 295	M^+
	m/z = 142	$(M - C_8H_9O_3)^+$
	m/z = 41	$C_3H_5^+$

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm) : 1,85 (m, 2H) ; 3,14 (c, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,96 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; de 4,41 a 4,48 (m, 6H) ; 5,11 (t parcialmente enmascarado, J = 5,5 Hz, 2H) ; 5,16 (cd, J = 1,5 y 10,5 Hz, 1H); 5,26 (qd, J = 1,5 y 17,0 Hz, 1 H) ; 5,90 (m, 1 H) ; 6,72 (s ancho, 2H) ; 6,83 (s ancho, 1 H) ; 7,26 (t ancho, J = 6,5 Hz, 1H)

Puede prepararse 5-(3-ftalimido-propiloxi)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:

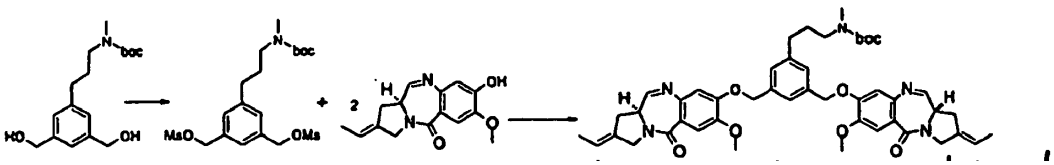


Se mezclaron 3,5-Bis-hidroximetilfenol (Felder, D.; Gutiérrez Nava, M.; del Pilar Carreon, M.; Eckert, J. F.; Luccisano, M.; Schall, C.; Masson, P.; Gallani, J. L.; Heinrich, B.; Guillon, D.; Nierengarten, J.F. Helv. Chimica Acta 2002, 85, 288) (2,35 g), N-(3-bromo-propil)-ftalimida (4,49 g) y carbonato potásico (10,53 g) en acetonitrilo (25 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en diclorometano y el residuo insoluble se retiró por filtración. El filtrado se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 90 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con metanol/diclorometano, 4:96 para dar 5-(3-ftalimido-propiloxi)-1,3-bis-(hidroximetil)benceno (1,45 g):

LC/MS (Método A1, Plataforma II):	ES m/z = 342 MH^+
	m/z = 324 (MH^+ - H_2O)
	Tiempo de retención = 2,90 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm) : 2,05 (m, 2H) ; 3,76 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,40 (d, J = 5,5 Hz, 4H) ; 5,09 (t, J = 5,5 Hz, 2H) ; 6,59 (s ancho, 2H) ; 6,82 (s ancho, 1 H) ; de 7,80 a 7,90 (m, 4H)

■ **Ejemplo 9: Puede preparase 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:**



Este compuesto no está reivindicado.

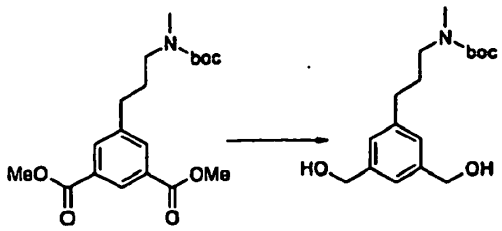
A una disolución enfriada (0ºC) de 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (50 mg) y trietilamina (113 µl) en diclorometano (2 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonilo (26 µl). Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se lavó dos veces con agua y la disolución de diclorometano resultante se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar un aceite viscoso (50,3 mg).

Una disolución de tomaimicina (15 mg) en dimetilformamida (0,5 ml) se añadió a una mezcla del compuesto bruto (13 mg), carbonato potásico (23 mg) y yoduro potásico (9 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 20 h a 30ºC. Se añadió otra muestra del compuesto bruto (6 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 h más a 30ºC. Los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron con dimetilformamida (0,2 ml) y después se desecharon. A la disolución de dimetilformamida combinada se le añadieron agua (0,4 ml), una gota de ácido fórmico y una cantidad adicional de agua (1,5 ml).

Se filtró una muestra de la suspensión resultante (2 ml) y el sólido resultante se secó al vacío para dar 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (3,1 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma II):	ES : m/z = 818 MH^+
	Tiempo de retención = 4,11 minutos

Puede prepararse 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:

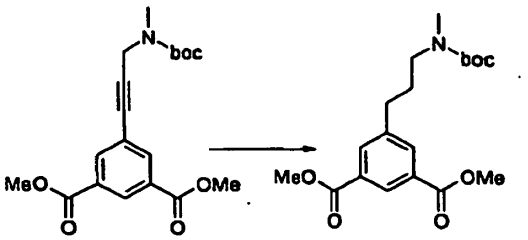


A una disolución enfriada (-5ºC) de éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-benceno-1,3-dicarboxílico (100 mg) en tetrahidrofurano (2 ml) se le añadió lentamente una disolución 1 M de hidruro de litio y aluminio en éter dietílico (0,55 ml). 10 minutos después del final de la adición, se añadió sulfato sódico decahidrato hasta que cesó el desprendimiento de gas. El sólido se retiró por filtración, se lavó dos veces con acetato de etilo y las soluciones orgánicas combinadas se concentraron al vacío para dar 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (66,8 mg) en forma de un aceite viscoso:

CI (Método D) :	m/z = 327	MNH_4^+
	m/z = 310	MH^+
	m/z = 271	$(MNH_4^+ - C_4H_8)$

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm) : 1,37 (s ancho, 9H) ; 1,75 (m, 2H) ; de 2,45 a 2,54 (m enmascarado, 2H); 2,77 (s, 3H) ; 3,18 (t, J = 7,0 Hz, 2H) ; 4,45 (d, J = 5,5 Hz, 4H) ; 5,08 (t, J = 5,5 Hz, 2H) ; 7,00 (s ancho, 2H) ; 7,08 (s ancho, 1 H)

Puede prepararse éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-benceno-1,3-dicarboxílico como se indica a continuación:

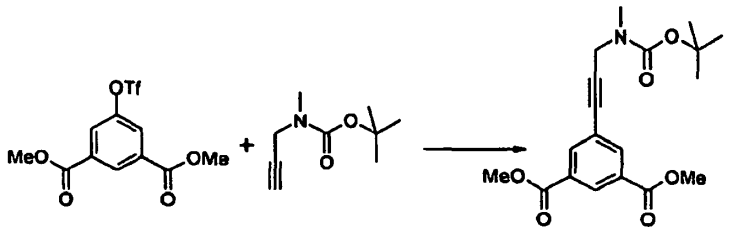


A una disolución de éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico (890 mg) en metanol (10 ml) se le añadió paladio al 10% sobre carbono (89 mg) y la disolución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno (1 bar) durante 18 h. El sólido se retiró por filtración y el disolvente se retiró al vacío para producir éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-benceno-1,3-dicarboxílico (767 mg) en forma de un aceite amarillo:

EI (Método C):	m/z = 365	$M^{+\cdot}$
	m/z = 309	$(M - C_4H_8)^{+\cdot}$
	m/z = 265	$(m/z=309 - CO_2)^{+\cdot}$
	m/z = 57	$C_4H_9^+$
	m/z = 44	$C_2H_6N^+$

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,32 (s ancho, 9H) ; 1,79 (m, 2H) ; 2,70 (t, J = 7,0 Hz, 2H) ; 2,76 (s, 3H) ; 3,16 (m, 2H) ; 3,87 (s, 6H) ; 8,06 (d, J = 2,0 Hz, 2H) ; 8,32 (t, J=2,0 Hz, 1 H)

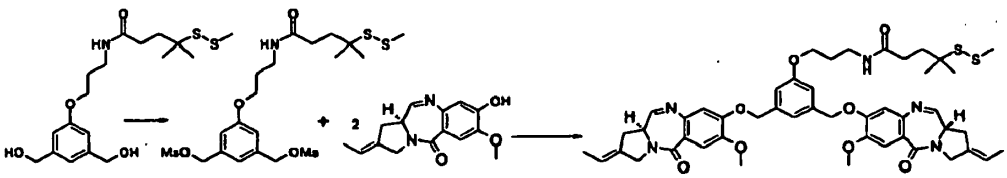
Puede prepararse éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico como se indica a continuación:



Se disolvió éster dimetílico del ácido 5-trifluorometanosulfonoloxo-isoftálico (Bodwell, G.J. ; Fleming, J.J. ; Mannion, M.R. ; Miller, D.O. J. Org. Chem. 2000, 65 (17), 5360) (1g) en 2 ml de acetonitrilo. Se añadió N-metil-N-terc-butoxicarbonilpropargilamina (Bradbury, B.J. ; Baumgold, J. ; Jacobsen, K.A. J. Med. Chem. 1990, 33 (2), 741) (643 mg), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (205 mg), yoduro de cobre (56 mg) y trietilamina (591 mg). La mezcla resultante se agitó durante 15 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró por evaporación a presión reducida y después el residuo se lavó en un embudo de decantación usando acetato de etilo y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo una vez con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Biotage FLASH 40+M de 100 g, SiOH 32-63 µm, eluyendo con acetato de etilo/heptano, 20:80) para dar éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico (896 mg):

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm) : 1,43 (s, 9H) ; 2,90 (s, 3H) ; 3,90 (s, 6H) ; 4,30 (s, 2H) ; 8,16 (d, J = 1,5 Hz, 2H) ; 8,42 (t, J = 1,5 Hz, 1H)

■ **Ejemplo 10: Puede prepararse 8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:**



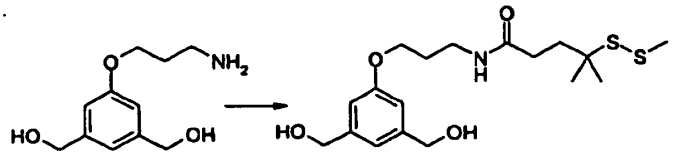
A una disolución enfriada (0ºC) de 1-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-propiloxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (45 mg) y trietilamina (49 µl) en diclorometano (1,5 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonilo (19 µl). Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se lavó dos veces con agua y la disolución de diclorometano resultante se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar un aceite viscoso (39 mg).

Una disolución de tomaimicina (26 mg) en dimetilformamida (0,9 ml) se añadió carbonato potásico (40 mg), yoduro potásico (16 mg) y una muestra del compuesto bruto (31 mg).La mezcla de reacción se agitó durante 20 h a 30ºC. Se añadió otra muestra del compuesto bruto (6 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 h más a 30ºC. Los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron con dimetilformamida (0,3 ml) y después se desecharon. A la segunda disolución de dimetilformamida se le añadió agua (1,6 ml) y el sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 2 g, SiOH 15-35 µm, eluyendo con diclorometano/metanol, 95:5) y después otra purificación por cromatografía sobre gel de sílice (columna Chromabond OH de 2 g, 45 µm, eluyendo con diclorometano para dar 8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildisulfanilpentanoil-amino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzo-diazepin-5-ona] (0,2 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma I):	ES : m/z = 896 MH^+
	Tiempo de retención = 4,09 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm) : 1,29 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; de 1,92 a 2,03 (m, 4H) ; 2,28 (m, 2H) ; 2,39 (s, 3H) ; 2,97 (m, 4H) ; 3,45 (c, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,89 (c, J = 5,5 Hz, 2H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,04 (t, J = 5,0 Hz, 2H) ; 4,27 (s ancho, 4H) ; 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,20 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (m, 2H) ; 5,84 (t ancho, J = 6,0 Hz, 1 H) ; 6,83 (s, 2H) ; 6,94 (s, 2H) ; 7,09 (s, 1 H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 5,0 Hz, 2H).

1-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-propiloxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno

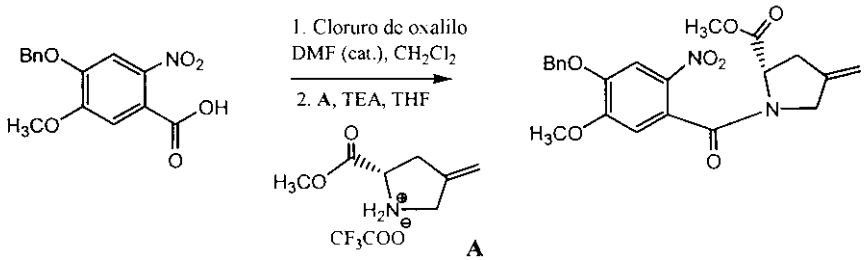


A una disolución de 1-(3-amino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (50 mg) en dimetilformamida (1 ml) se le añadieron ácido 4-metil-4-metildisulfanil-pentanoico (44 mg), N,N'-diisopropilcarbodiimida (35 ml) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (5,8 mg). Después de 15 h a temperatura ambiente, a la mezcla de reacción se le añadió agua y la disolución acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 5 g, SiOH 15-35 µm), eluyendo con metanol/diclorometano, 5:95 para dar 1-[3-(4-metil-4-metildisulfanilpentanoilamino)-propiloxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (48 mg):

LC/MS (Método A1, ZQ):	ES m/z=388 MH^+
	Tiempo de retención = 3,03 minutos

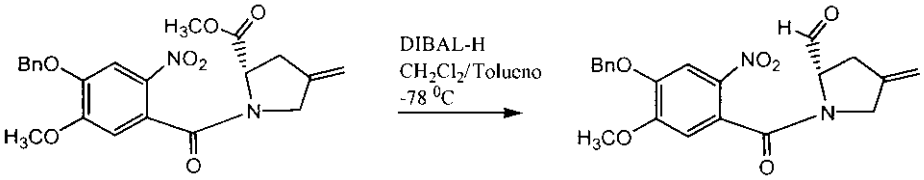
^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm) : 1,24 (s, 6H) ; de 1,76 a 1,87 (m, 4H) ; 2,16 (m, 2H) ; 2,40 (s, 3H) ; 3,19 (c, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,95 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,44 (d ancho, J = 5,5 Hz, 4H) ; 5,12 (d, J = 5,5 Hz, 2H) ; 6,73 (s ancho, 2H) ; 6,83 (s ancho, 1 H) ; 7,92 (t ancho, J = 5,5 Hz, 1H)

■ **Ejemplo 11: 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (este compuesto no está reivindicado)**

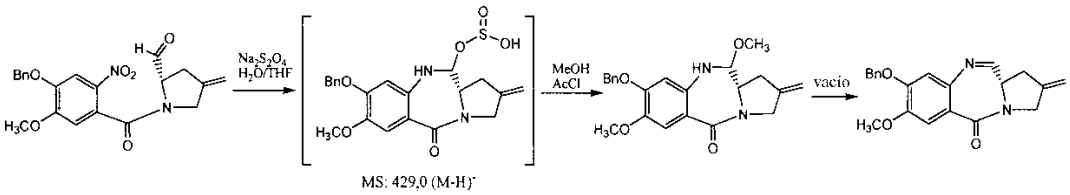


A una disolución de ácido 4-benciloxi-5-metoxi-2-nitrobenzoico (4,8 g, 16 mmol) en diclorometano anhidro (80 ml) y THF (5 ml) se le añadieron cloruro de oxalilo (2,8 ml, 32 mmol) y DMF (30 µl, 0,38 mmol) a temperatura ambiente. Se formaron grandes cantidades de burbujas después de la adición de DMF. La mezcla se agitó durante una noche y después los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se co-evaporó una vez más mediante la adición de diclorometano anhidro para dar el cloruro de acetilo en forma de un sólido amarillo.

A una disolución de éster metílico de 4-metileno-L-prolina, compuesto A, (3,95 g, 15,5 mmol) en THF anhidro (80 ml) se le añadió trietilamina (6,7 ml, 48 mmol) a 0ºC. Después de 2 minutos, se añadió rápidamente el cloruro de acetilo anterior en THF anhidro (80 ml) durante 10 minutos mediante una cánula a la misma temperatura. La disolución turbia amarilla obtenida se agitó a 0 ~ 5ºC durante 30 minutos y después a temperatura ambiente durante 4 horas. La disolución de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo dos veces y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una disolución al 2% de HCl y salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró y los disolventes se retiraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Hexanos/AcOEt, 1:1, 1:1,5) para dar éster metílico del ácido (2S)-4-(metileno)-1-[5-metoxi-2-nitro-4-(fenilmetoxi)-benzoil]-2-pirrolidinacarboxílico en forma de un sólido amarillo (5,6 g, r = 85%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): el compuesto aparece como un par de rotámeros distintos. δ 7,76 (s, 0,7H), 7,73 (s, 0,3H), 7,43-7,29 (m, 5H), 6,83 (s, 0,7H), 6,80 (s, 0,3H), 5,17 (s, 1,4H), 5,16 (s, 0,6H), 5,10-4,89 (m, 2,7H), 4,57 (d, J = 16 Hz, 0,3H), 4,19-4,12 (m, 0,7H), 3,95-3,77 (m, 6,3H), 3,57 (s, 1H), 3,06-2,96 (m, 1H), 2,73-2,62 (m, 1H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): 171,8, 171,7, 166,5, 166,2, 154,9, 154,4, 148,25, 148,18, 141,7, 141,3, 137,19, 137,13, 135,3, 135,2, 128,7, 128,43, 128,41, 127,5, 127,3, 109,5, 109,1, 109,0, 108,9, 71,3, 60,6, 58,1, 56,7, 56,5, 52,39, 52,37, 52,0, 50,2, 37,1, 35,5; MS (ESI): m/z 449,3 $(M + Na)^+$.



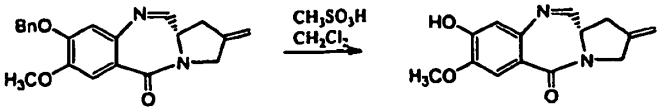
A una disolución del éster (3,15 g, 7,39 mmol) en diclorometano anhidro (9 ml) y tolueno (27 ml) se le añadió gota a gota dibal-H (15 ml, 1,0 M en tolueno) mediante una bomba de jeringa durante 30 minutos a -78ºC. La mezcla se mantuvo en agitación a -78ºC durante 2 horas y el análisis por TLC (hexanos/AcOEt, 1:1,5) mostró que se había consumido todo el material de partida. La reacción se interrumpió con metanol (0,3 ml, 7,4 mmol) a -78ºC y se añadió HCl al 5% (20 ml) seguido de la adición de AcOEt (50 ml). El baño de hielo seco/acetona se retiró y la mezcla se calentó a 0ºC y se agitó durante 15 minutos. La capa acuosa se extrajo dos veces con AcOEt y las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl frío al 5% y salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Se filtró a través de celite y los disolventes se retiraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Hexanos/AcOEt, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 100% de AcOEt) para dar (2S)-4-(metileno)-1-[5-metoxi-2-nitro-4-(fenilmetoxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldehído en forma de un sólido amarillo esponjoso (2,69 g, r = 92%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): el compuesto aparece como un par de rotámeros distintos. δ 9,75 (s, 0,7H), 9,32 (s, 0,3H), 7,76 (s, 0,7H), 7,69 (s, 0,3H), 7,45-7,31 (m, 5H), 6,85 (s, 0,7H), 6,80 (s, 0,3H), 5,19-4,82 (m, 4,7H), 4,56 (d, J = 16 Hz, 0,3H), 4,14-3,79 (m, 5H), 2,99-2,68 (m, 2H); ^{13}C NMR (400 Hz, $CDCl_3$): 198,3, 197,1, 167,1, 155,0, 154,6, 148,4, 141,3, 140,4, 137,2, 135,2, 128,7, 128,5, 128,4, 127,5, 126,9, 126,6, 109,8, 109,4, 109,3, 109,2, 109,1. 71,3, 66,6, 64,3, 56,7, 56,6, 52,2, 50,6, 33,2, 31,9; MS (ESI): m/z 419,2 $(M + Na)^+$.



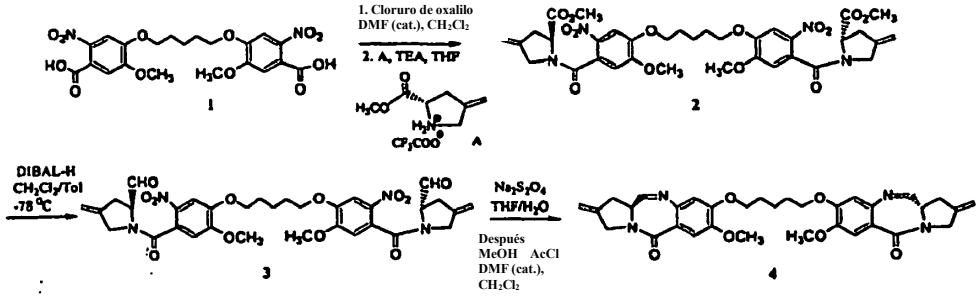
Procedimiento 1: A una disolución de (2S)-4-(metileno)-1-[5-metoxi-2-nitro-4-(fenilmetoxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldehído (1,0 equivalente) en THF/H_2O (v/v, 1,7:1, 0,03 M) se le añadió en porciones hidrosulfito sódico (5~8 equivalente) durante 2 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se agitó adicionalmente durante 6~20 horas y se controló mediante análisis por TLC (1:2 de hexanos/AcOEt y 5:1 de CH_2Cl_2/MeOH). Después de que el aldehído se consumiera casi totalmente, la reacción se interrumpió con metanol (aproximadamente el mismo volumen que el THF usado). Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío (temperatura <40ºC) y el sólido restante se puso a vacío elevado para secarlo completamente. El sólido se suspendió en metanol anhidro (0,03 M) y se añadió gota a gota AcCl (8~10 equivalente) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 15 minutos, la disolución turbia se filtró y el sólido se lavó con metanol anhidro. El filtrado amarillo transparente se agitó a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas y se inactivó con bicarbonato sódico saturado. Después de que se retirara la mayor parte del metanol por evaporación rotatoria, el material restante se diluyó con diclorometano y agua. La capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se filtraron. Los disolventes se retiraron y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexanos/AcOEt, 1:3, 1:5) para dar (11aS)-7-metoxi-2-metileno-8-(fenilmetoxi)-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona con un rendimiento de 70% a 85%. Los espectros de RMN son coherentes con la bibliografía indicada. MS (ESI): m/z 371,2 $(M + Na)^+$. MS (ESI, con CH_3OH): m/z 403,3 $(M + CH_3OH + Na)^+$. MS (ESI, con H_2O): m/z 389,2 $(M + H_2O + Na)^+$.

Procedimiento 2: A una disolución de (2S)-4-(metileno)-1-[5-metoxi-2-nitro-4-(fenilmetoxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldehído (1,0 equivalente) en MeOH/H_2O (v/v, 3,2:1, 0,03 M) se le añadió en porciones hidrosulfito sódico (6~8 equivalentes) durante 2 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de hidrosulfato sódico (0,5~1,0 equivalentes). La mezcla se agitó adicionalmente durante 12~20 horas y se controló mediante análisis por TLC (1:2 de hexanos/AcOEt y 5:1 de CH_2Cl_2/MeOH). Después de que se consumiera casi todo el intermedio [MS (ESI): 459,0 $(M - H)^-$], la reacción se interrumpió con bicarbonato sódico saturado a pH 5~6. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío (temperatura <40ºC) y el sólido restante se puso a vacío elevado para secarlo completamente. El sólido se suspendió en metanol anhidro (0,03 M) y se añadió gota a gota AcCl (8~10 equivalente) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 15 minutos, la disolución turbia se filtró y el sólido se lavó con metanol anhidro. El filtrado amarillo transparente se agitó a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas y se inactivó con bicarbonato sódico saturado. Después de que se retirara la mayor parte del metanol por evaporación rotatoria, el material restante se diluyó con diclorometano y agua. La capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se filtraron. Los disolventes se retiraron y el residuo

se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexanos/AcOEt, 1:3, 1:5) para dar (11aS)-7-metoxi-2-metilen-8-(fenilmetoxi)-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona con un rendimiento de 65% a 80%.



A una disolución del material de partida (98 mg, 0,28 mmol) en diclorometano anhidro (2 ml) se le añadió una disolución recién mezclada de ácido metanosulfónico (2 ml) en diclorometano anhidro (4 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se vertió en hielo (~30 g), se inactivó con $NaHCO_3$ saturado y se diluyó con diclorometano. La capa acuosa se extrajo una vez con diclorometano y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y los disolventes se retiraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1) para dar el producto en forma de un sólido amarillo (29 mg). La capa acuosa anterior se agitó a temperatura ambiente durante una noche y se extrajo con diclorometano y posteriormente con AcOEt. El diclorometano combinado y el AcOEt se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y los disolventes se retiraron para dar (11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (25 mg). El rendimiento total es de 74%. ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,65 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,48 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,35 (s a, 1H), 5,17 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 5,14 (7, J = 1,6 Hz, 1H), 4,26 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,87-3,83 (m, 1H), 3,12-3,05 (m, 1H), 2,91 (d, J = 16 Hz, 1H); MS (ESI): m/z 281,0 $(M + Na)^+$. MS (ESI, con agua): m/z 258,9 $(M + H)^+$, m/z 299,1 $(M + H_2O + Na)^+$.



A una disolución de ácido 4,4'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(5-metoxi-2-nitro)-benzoico], compuesto 1, (494 mg, 1,0 mmol) en THF anhidro (5 mL) se añadió cloruro de oxalilo (356 µL, 4 mmol) y DMF (10 µL, 0,1 mmol) a temperatura ambiente. Se formaron grandes cantidades de burbujas después de la adición de DMF. Después la mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, los disolventes se eliminaron por evaporación rotatoria *a vacío*. El residuo se co-evaporó una vez más mediante la adición de diclorometano anhidro para dar el cloruro ácido en forma de un sólido amarillo.

A una disolución de éster metílico de 4-metileno-L-prolina, compuesto A, (510 mg, 2 mmol) en THF anhidro (6 ml) se le añadió trietilamina (836 µl, 6 mmol) a 0ºC. Después de 2 minutos, se añadió rápidamente el cloruro de acetilo anterior en THF anhidro (4 ml) durante 5 minutos mediante una cánula a la misma temperatura. La disolución turbia naranja obtenida se agitó a 0 ~ 5ºC durante 1 hora y después a temperatura ambiente durante 3 horas. Parte del disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a *vacío* (temperatura < 30°C). El resto se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo dos veces y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una disolución al 2% de HCl y salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró y los disolventes se retiraron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Hexanos/AcOEt, 1:1, 1:2, 1:3) para proporcionar éster metílico de 1,1'-{1,5-pentanodiilbis[oxi(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen)carbonil]}-bis-(4-metilen-*L*-prolina), compuesto 2, como un sólido amarillo (619 mg, y = 84%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): el compuesto aparece como un par de rotómeros distinto. δ 7,67 (s, 1,4H), 7,64 (s, 0,6H), 6,82 (s, 1.4H), 6,79 (s, 0,6H), 5,11-4,89 (m, 5,4H), 4,57 (d, J = 16 Hz, 0,6H), 4,19-4,10 (m, 5,4H), 3,95-3,78 (m, 12,6H), 3,58 (s, 2H), 3,07-2,98 (m, 2H), 2,74-2,62 (m, 2H), 2,01-1,04 (m, 4H), 1,73-1,67 (m, 2H); MS (ESI): m/z 763,4 $(M + Na)^+$.

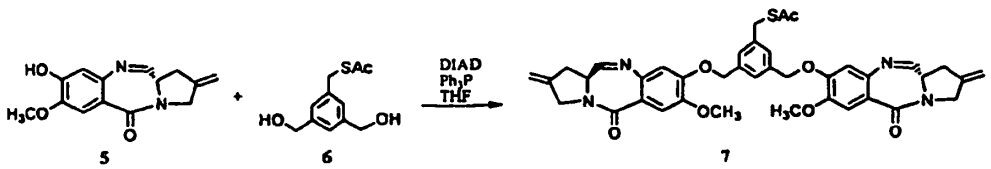
A una disolución del compuesto 2 (345 mg, 0,47 mmol) en diclorometano anhidro (0.7 ml) y tolueno (1,5 ml) se le añadió gota a gota dibal-H (1,9 ml, 1,0 M en tolueno) mediante una bomba de jeringa durante 15 minutos a -78ºC. La mezcla se mantuvo en agitación a -78ºC durante 2 horas y el análisis por TLC (hexanos/AcOEt, 1:4) mostró que se había consumido todo el material de partida. La reacción se enfrió con metanol a -78°C y se añadió HCl al 5% seguido de adición de AcOEt. El baño de hielo seco/acetona se retiró y la mezcla se calentó a 0ºC y se agitó durante 15 minutos. La capa acuosa se extrajo dos veces con AcOEt y las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl frío al 5% y salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Se filtró a través de celite y los disolventes se retiraron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Hexanos/AcOEt, 1:1, 1:5, 1:10, 100% AcOEt) para proporcionar éster metílico de 1,1'-{1,5-pentanodiilbis[oxi(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen)carbonil]}-bis-[(S)-4-metilen-2-pirrolidincarboxaldehído], compuesto 3, como un sólido amarillo (297 mg, rto = 93%). ^{1}H RMN (400 Hz,

$CDCl_3$): el compuesto aparece como un par de rotómeros distintos. δ 9,70 (s, 1,4H), 9,28 (s, 0,6H), 7,65-7,58 (m, 2H), 6,81-6,73 (m, 2H), 5,08-4,72 (m, 5,4H), 4,53-4,49 (m, 0,6H), 4,11-3,63 (m, 14H), 2,91-2,59 (m, 4H), 1,98-1,87 (m, 4H), 1,70-1,61 (m, 2H); MS (ESI): m/z 703,2 $(M + Na)^+$.

A una disolución del compuesto 3 (34 mg, 0,05 mmol) en THF (1,6 mL) y H_2O (1,0 mL) se añadió hidrosulfito de sodio (82 mg, 0,4 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas y la reacción se enfrió con metanol (~5 mL). Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío (temperatura <40ºC) y el sólido restante se puso a vacío elevado para secarlo completamente. El sólido se suspendió en MeOH (10 mL) y se añadió gota a gota AcCl (0,1 mL) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se enfrió con bicarbonato de sodio saturado. Se filtró y se lavó con $MeOH/CH_2Cl_2$. El filtrado se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida ($CHCl_3$/MeOH, 20:1, 9:1, 5:1, 1:1) para dar 5,0 mg de 8,8'-[1,5-pentanediilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], compuesto 4. Las fracciones muy polares de la columna se recogieron y se separaron los disolventes. El residuo se disolvió en MeOH (~10 mL) y se añadió AcCl (0,1 mL). Después de agitada a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se enfrió con bicarbonato de sodio saturado y se concentró mediante evaporación rotatoria. El resto se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtraron. Se separaron los disolventes para proporcionar 7,2 mg del compuesto 4 como una espuma incolora. El rendimiento total (12,2 mg) es 41%. El espectro ^1H NMR es consistente con la bibliografía reportada. MS (ESI): *m/z* 583,2 $(M - H)^-$. MS (ESI, con CH_3OH): m/z 671,3 $(M + 2CH_3OH + Na)^+$, 639,3 $(M + H + Na)^+$, 607,2 $(M + Na)^+$. MS (ESI, con H_2O): m/z 643,3 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 625,3 $(M + H_2O + Na)^+$, 607,3 $(M + Na)^+$.

■ **Ejemplo 12: 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenoxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]**

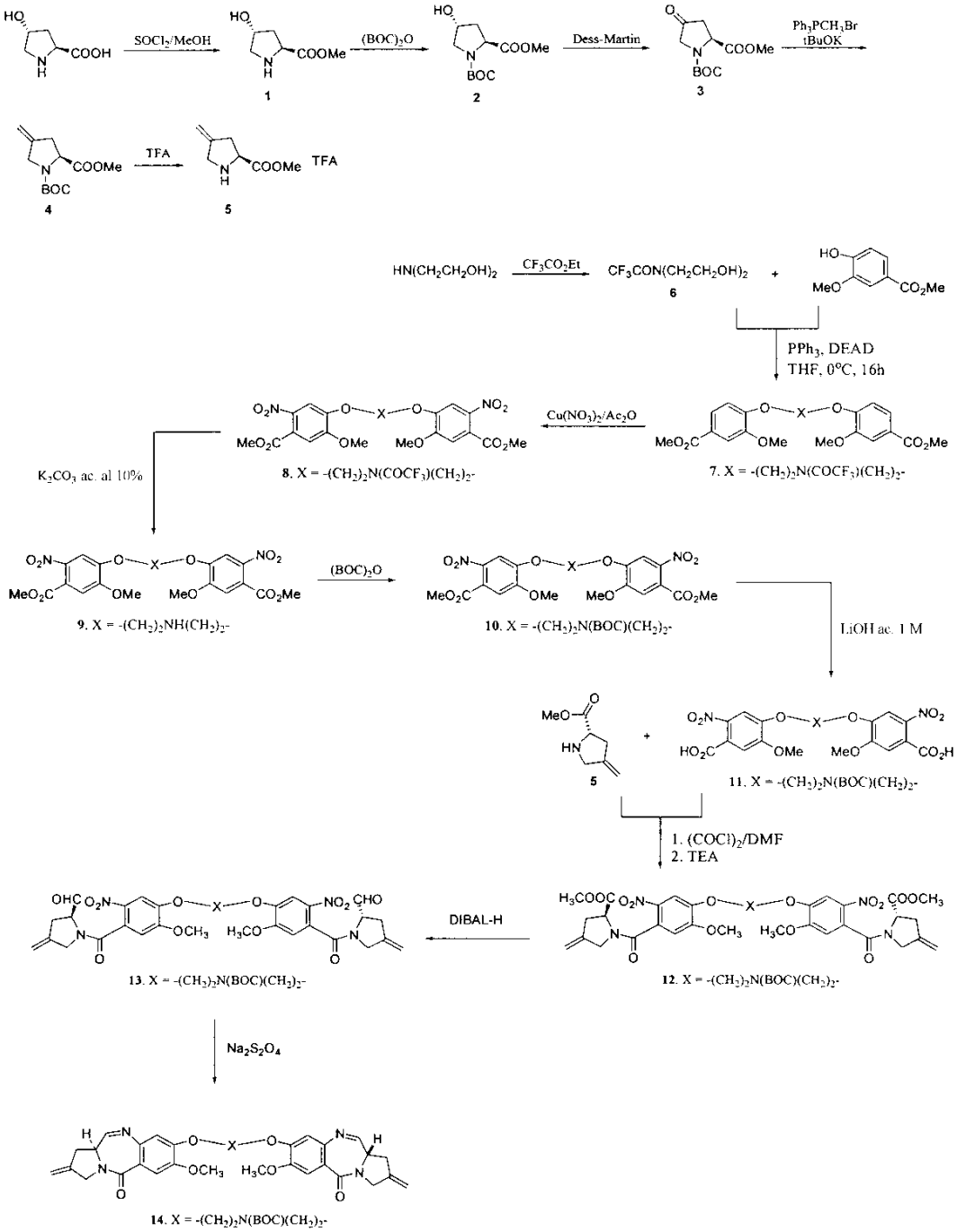
A una disolución de trifenilfosfina (577 mg, 2,2 mmol) en THF anhidro (5 ml) se le añadió gota a gota azodicarboxilato de dietilo (2,2 M en tolueno, 791 µl, 1,7 mmol) a 0ºC. Después de un periodo de agitación a 0ºC durante 50 minutos, se añadió gota a gota una disolución de 1,3,5-tri(hidroximetil)benceno (269 mg, 1,6 mmol, preparada por reducción de 1,3,5-bencenotricarboxilato de trimetilo con hidruro de litio y aluminio en THF, co-evaporación con benceno seco y secado a vacío elevado durante dos horas antes del uso) y ácido tioacético (108 µl, 1,45 mmol) en THF seco (4 ml). Después de 1 hora, el baño de hielo/agua se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar 5-acetiltiometil-1,3-bis(hidroximetil)-benceno en forma de un sólido incoloro (110 mg). ^1H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,13-6,99 (m, 3H), 4,45 (t ap., J = 20,4 Hz, 4H), 3,98 (t ap., J = 20,4 Hz, 4H), 3,73 (s a, 2H), 2,24 (t ap., J = 20,4 Hz, 3H); MS (ESI): m/z 249,0 $(M + Na)^+$.



A una disolución de trifenilfosfina (28 mg, 0,1 mmol) en THF anhidro (0,3 ml) se le añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (19 µl, 0,09 mmol) a 0ºC. Después de agitar a 0ºC durante 35 minutos, se añadió una disolución de (11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona, el compuesto 5, (18 mg, 0,07 mmol, co-evaporado con benceno seco y secado a vacío elevado durante dos horas antes del uso) en THF seco (0,2 ml). La mezcla se mantuvo en agitación durante 10 minutos antes de que se añadieran 5-acetiltiometil-1,3-bis(hidroximetil)-benceno y el compuesto 6, (6,6 mg, 0,03 mmol, co-evaporado con benceno seco y secado a vacío elevado durante dos horas antes del uso) en THF seco (0,2 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 0ºC durante 35 minutos. El baño de hielo/agua se retiró y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para formar el producto bruto que se purificó adicionalmente por HPLC preparativa (columna C18, CH_3CN/H_2O) para dar 0,7 mg de 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], compuesto 7. MS (ESI, con H_2O): m/z 765,3 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 747,3 $(M + H_2O + Na)^+$, 729,2 $(M + Na)^+$, 707,3 $(M + H)^+$, 663,2 $(M – Ac)^-$.

■ **Ejemplo 13 Éster terc-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico**

Esquema 1



Compuesto **1**. Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (5,6 ml, 76,3 mmol) a metanol seco (76 ml) a -20ºC, seguido de la adición de *trans*-4-hidroxi-L-prolina (5,0 g, 38,1 mmol). La mezcla resultante se dejó calentar a ta y se agitó durante 20 h. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se secó adicionalmente a vacío elevado para proporcionar éster metílico de *trans*-4-hidroxi-L-prolina 1 en forma de un sólido blanco: ^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 2,18 - 2,23 (m, 2H), 3,06 (m, 1 H), 3,32 - 3,36 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 4,42 (br. s, 1 H), 4,48 (dd, *J* = 5,4, 8,1 Hz, 1H), 5,56 (br. s, 1 H); EIMS m/z 146 ([M]$^+$+1).

Compuesto **2**. A una disolución de éster metílico de *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina **1** (4,48 g, 30,9 mmol) y bicarbonato sódico (1,56 g, 18,5 mmol) en DMF anhidra (42 ml) se le añadió una disolución de $(BOC)_2O$ en DMF (20 ml) a 0ºC

en una atmósfera de argón. Después de agitar durante una noche a ta, la reacción se interrumpió mediante la adición de 100 ml de H_2O a 0ºC y se extrajo con EtOAc (4 x 80 ml). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró con un evaporador rotatorio. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 1:1 de hexanos/EtOAc) para dar éster metílico de *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina **2** protegido con N-BOC en forma de un aceite incoloro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,38 y 1,43 (2 x s, 9H), 2,04 – 2,07 (m, 1H), 2,23 – 2,27 (m, 2H), 3,54 – 3,63 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 4,34 – 4,38 (m, 1H), 4,46 (s a, 1H).

Compuesto **3**. (Franco Manfre, Jean-Marc Kern, y Jean-Francois Biellmann J. Org. Chem. 1992, 57, 2060-2065). El compuesto **2,** éster metílico de trans-4-hidroxi-*L*-prolina, protegido con N-BOC (3,24 g, 13,2 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (132 ml) y se enfrió a 0ºC. Se añadieron piridina y peryodinano de Dess-Martin y la agitación se mantuvo hasta que el análisis por TLC no mostró ningún MP restante. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2, se lavó con $Na_2S_2O_3$ ac. al 10% (3 x 50 ml), HCl ac. 1 N (50 ml), $NaHCO_3$ ac. sat. (50 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 7:3 de hexanos/EtOAc) dio el éster metílico de 4-oxo-L-prolina protegido con N-BOC **3** en forma de un aceite amarillo claro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,44 (s, 9H), 2,53 – 2,57 (m, 1H), 2,85 – 2,96 (m, 1H), 3,72 y 3,74 (2 x s, 3H), 3,85 – 3,87 (m, 2H), 4,67 – 4,77 (m, 1H).

Compuesto **4**. (Kuei-Ying Lin, Mark Matteucci US 5414077) Una disolución de t-butóxido potásico (2,51 g, 22,3 mmol) en THF anhidro (40 ml) se añadió a una suspensión de bromuro de metiltrifenilfosfonio (7,99 g, 22,3 mmol) en THF (40 ml) a 0ºC. La suspensión de iluro amarillo resultante se agitó a 0ºC durante 2 h antes de la adición de la disolución de éster metílico de 4-oxo-L-prolina protegido con N-BOC 3 (2,72 g, 11,2 mmol) en THF (32 ml). Después de agitar a ta durante 1 h, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con H_2O (80 ml) y salmuera (80 ml), se secó ($MgSO_4$) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 9:1 de hexanos/EtOAc) produjo el éster metílico de 4-metileno-L-prolina protegido con N-BOC, compuesto **4,** en forma de un aceite incoloro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,40 y 1,45 (2 x s, 9H), 2,58 – 2,62 (m, 1H), 2,88 – 2,98 (m, 1H), 3,69 y 3,70 (2 x s, 3H), 4,03 – 4,06 (m, 2H), 4,36 – 4,49 (m, 1H), 4,97 – 4,99 (m, 2H); EIMS m/z 264 ($[M]^+$+Na).

Compuesto 5. El éster metílico de 4-metileno-L-prolina protegido con N-BOC, compuesto **4,** (0,8 g, 3,31 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (6,5 ml) y se enfrió a 0ºC. Se añadió gota a gota una disolución de ácido trifluoroacético (6,5 ml) en CH_2Cl_2 (6,5 ml) y la mezcla resultante se agitó a ta durante 1,5 h. Después de la retirada de los disolventes volátiles con un evaporador rotatorio, el residuo pardo se disolvió en 10 ml de H_2O y se lavó con Et_2O (3 x 5 ml). La disolución acuosa se concentró y se secó adicionalmente a vacío elevado para producir éster metílico de 4-metileno-L-prolina **5** en forma de la sal TFA: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 2,83 - 2,87 (m, 1H), 3,05 - 3,11 (m, 1 H), 3,80 y 3,81 (2 x s, 3H), 4,00 - 4,10 (m, 2H), 4,55 (dd, *J* = 5,7, 5,7 Hz, 1H), 5,17-5,21 (m, 2H); ^{13}CRMN δ 34,0, 49,1, 53,8, 59,3, 111,7, 137,6, 169,8; EIMS m/z 142 ($[M]^+$+1).

Compuesto **6**. (Kamal, A.; et al J. Med. Chem. 2002, 45, 4679-4688). Se disolvió dietanolamina (3,57 g, 34 mmol) en metanol (20 mL) y se trató con Et_3N (4,7 mL, 34 mmol) y trifluoroacetato de etilo (4,90 g, 34 mmol) durante 20 h a ta, seguido de la adición de otro 1 ml de CF_3COOEt. Después de 20 h más, la retirada de los disolventes volátiles a vacío elevado produjo el compuesto N-trifluoroacetil-dietanolamina **6** en forma de un aceite amarillo claro, que se usó sin purificación adicional.

Compuesto **7**. Se añadió gota a gota azodicarboxilato de dietilo (7,66 g, 44 mmol) a una disolución agitada de valinato de metilo (7,30 g, 40,1 mmol) y trifenilfosfina (15,67 g, 59,7 mmol) en THF anhidro (57 ml) a 0ºC y la mezcla resultante se agitó durante 1 h a esta temperatura seguido de la adición de una disolución de N-trifluoroacetil-dietanolamina **6** (7,30 g, 40,1 mmol) en THF anhidro (20 ml). Después de agitar durante una noche a ta, la reacción se interrumpió con H_2O (100 ml) y se extrajo con Et_2O (3 x 80 ml). Las capas de Et_2O combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, de 8:2 a 7:3 hexanos/EtOAc) produjo N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-fenoxi)etil]amina, compuesto **7**, en forma de un sólido blanco: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,81 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 4,04 – 4,08 (m, 4H), 4,28 – 4,32 (m, 4H), 6,84 y 6,85 (2 x d, J = 6,3 Hz, 2H), 7,50 y 7,51 (2 x d, J = 1,5 Hz, 2H), 7,61 (dd, J = 1,5, 6,3 Hz, 2H).

Compuesto **8**. Se añadió $Cu(NO_3)_2$ sólido·xH_2O (2,33 g, 12,41 mmol) a una disolución agitada de N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-fenoxi)etil]amina **7** (2,62 g, 4,96 mmol) en anhídrido acético (50 ml) a 0ºC. La mezcla de reacción se agitó a 0ºC durante 1 h y a ta durante 2 h y después se vertió en 200 ml de hielo-agua. La agitación se mantuvo durante 1 h más. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración. La purificación adicional con cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6:4 de hexanos/EtOAc) produjo N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina, compuesto 8, en forma de un sólido amarillo claro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,86 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,886 (s, 3H), 3,890 (s, 3H), 4,04 – 4,09 (m, 4H), 4,30 – 4,35 (m, 4H), 6,98 y 6,99 (2 x s, 2H), 7,37 y 7,40 (2 x s, 2H).

Compuesto **9**. Una disolución de N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina **8** (2,58 g, 4,16 mmol) en THF-MeOH (1:2, 48 ml) se trató con K_2CO_3 ac. al 10% (16 ml) a ta durante 12 h. Después de la retirada de los materiales volátiles con un evaporador rotatorio, el residuo se diluyó con 100 ml de H_2O y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas de EtOAc combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron ($MgSO_4$) y

se concentraron, produciendo N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina, compuesto **9**, en forma de un sólido amarillo, que se usó sin purificación adicional: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,17 (t, J = 3,9 Hz, 4H), 3,89 (s, 6H), 3,93 (s, 6H), 4,19 (t, J = 3,9 Hz, 4H), 7,05 (s, 2H), 7,47 (s, 2H).

Compuesto **10**. Se suspendieron N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitrofenil-oxi)etil]amina, compuesto **9,** (bruto, 4,16 mmol) y $NaHCO_3$ (210 mg, 2,50 mmol) en THF, la mezcla se trató con $(BOC)_2O$ (999 mg, 4,58 mmol) a 0ºC y la agitación se mantuvo a ta durante 3 h. Después de la retirada del THF, el residuo se repartió entre H_2O y EtOAc (100/100 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (2 x 50 ml). Las capas de EtOAc combinadas se lavaron con salmuera (80 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6:4 de hexanos/EtOAc) produjo N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina, compuesto **10**, en forma de un sólido amarillo claro: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,44 (s, 9H), 3,77 (m, 4H), 3,83, 3,86 y 3,87(3 x s, 12H), 4,20 y 4,26 (2 x t, *J* = 3,9 Hz, 4H), 6,97 y 6,99 (2 x s, 2H), 7,36 y 7,40 (2 x s, 2H); EIMS m/z 646 ($[M]^+$+Na).

Compuesto **11**. Se suspendió N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina, compuesto **10** (2,11 g, 3,39 mmol) en THF-MeOH-H_2O (3:1:1, 65 ml) y se trató con LiOH ac. 1 M (14 ml) a ta durante 3 h. Después de la retirada de los disolventes volátiles, el residuo se diluyó con H_2O (25 ml). La disolución acuosa resultante se acidificó a pH ~ 1 con HCl concentrado. La N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-carboxi-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina que precipitó, compuesto **11,** se recogió por filtración, se lavó con H_2O y se secó adicionalmente a vacío elevado: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,39 (s, 9H), 3,70 (m, 4H), 3,88 y 3,89(2 x s, 6H), 4,29 (m, 4H), 7,29 y 7,31 (2 x s, 2H), 7,63 (s, 2H), 13,60 (s a, 2H); ^{13} CNMR δ 27,8, 46,2 y 46,6, 56,3 y 56,4, 67,2, 79,2, 107,9 y 108,0, 111,3, 141,4 y 141,5, 149,1, 151,7, 154,5, 165,9; HRMS m/z calc. para $C_{25}H_{29}N_3O_{14}Na$ 618,1547, encontrado 618,1552 ($[M]^+$+Na).

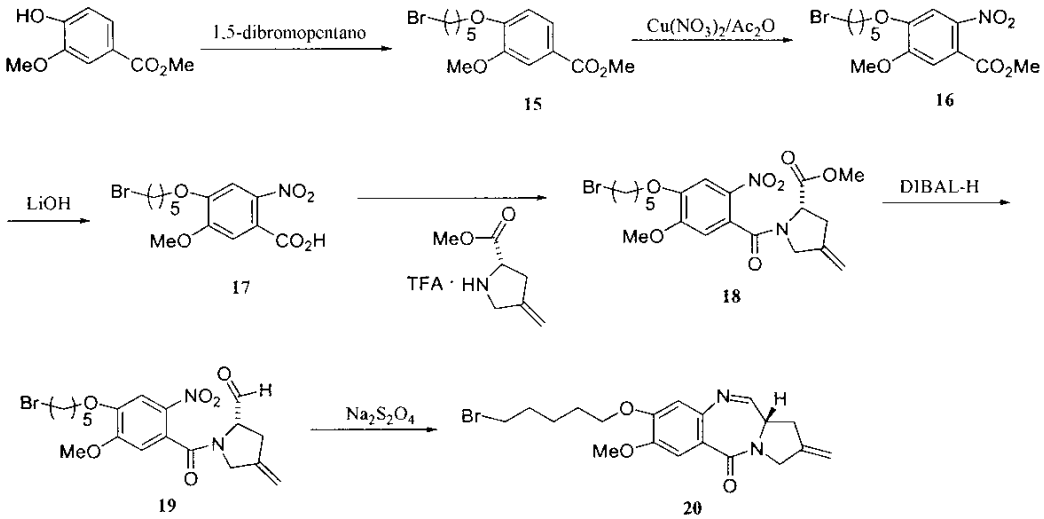
Compuesto **12**. Se añadió una cantidad catalítica de DMF (2 gotas) a una disolución de la N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-carboxi-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina 11 (194 mg, 0,33 mmol) y cloruro de oxalilo (72,7 ml, 0,81 mmol) en THF anhidro (6,5 ml) y la mezcla resultante se agitó a ta durante una noche. El exceso de THF y cloruro de oxalilo se retiró con un evaporador rotatorio. El cloruro de acetilo se suspendió de nuevo en THF recién preparado (4 ml) y se añadió gota a gota a una disolución de éster metílico de 4-metileno-L-prolina 5 (206,7 mg, 0,81 mmol), Et_3N (0,19 ml, 1,39 mmol) y H_2O (0,4 ml) en THF (1 ml) a 0ºC en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar a ta y la agitación se mantuvo durante 2 h. Después de la retirada del THF, el residuo se repartió entre H_2O y EtOAc (10/10 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (2 x 8 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 2:8 de hexanos/EtOAc) produjo éster terc-butílico del ácido bis{2-[5-metoxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-metoxicarbonil-1-pirrolidinilcarbonil]-feniloxi]-etil}-carbámico **12** en forma de un aceite amarillo claro (rotámeros): ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,46 (s, 9H), 2,68 – 2,75 (m, 2H), 2,99 – 3,10 (m, 2H), 3,60 – 4,28 (m, 24H), 4,56 – 5,12 (m, 6H), 6,78 – 6,83 (m, 2H), 7,63 – 7,71 (m, 2H); EIMS m/z 864 ($[M]^+$+Na).

Compuesto **13**. A una disolución agitada vigorosamente de éster terc-butílico del ácido bis{2-[5-metoxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-metoxicarbonil-1-pirrolidinilcarbonil]feniloxi]-etil}-carbámico **12** (100 mg, 0,12 mmol) en tolueno anhidro (2,4 ml) se le añadió gota a gota una disolución de DIBAL-H (480 µl de una disolución 1 M en tolueno) a -78ºC en una atmósfera de argón. Después de agitar la mezcla durante 45 min más, el exceso de reactivo se descompuso mediante la adición de cinco gotas de metanol seguido de HCl al 5% (4 ml). La mezcla resultante se dejó calentar a 0ºC. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo de nuevo con CH_2Cl_2 (3 x 3 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 95:5 de $CHCl_3$/MeOH) produjo éster terc-butílico del ácido bis{2-[5-metoxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-formil-1-pirrolidinilcarbonil]feniloxi]-etil}-carbámico **13** en forma de un aceite amarillo claro (84 mg, 91%).

Compuesto **14**. Una mezcla de éster terc-butílico del ácido bis{2-[5-metoxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-formil-1-pirrolidinilcarbonil]feniloxi]-etil}-carbámico **13** (180 mg, 0,23 mmol), $Na_2S_2O_4$ (1,84 mmol, 8 equiv.), 3,5 ml de THF y 2,2 ml de H_2O se agitó a ta durante 20 h. Los disolventes se retiraron a vacío elevado. El residuo se suspendió de nuevo en MeOH (30 ml) y se añadió gota a AcCl hasta un valor de pH de ~2. La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h. La reacción se trató mediante la retirada de la mayor parte del MeOH y después se diluyó con EtOAc (25 ml). La disolución de EtOAc se lavó con $NaHCO_3$ ac. sat. y salmuera, se secó ($MgSO_4$) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 97:3 de $CHCl_3$/MeOH) produjo éster terc-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico **14** en forma de un sólido blanco (86 mg, 50%).

Ejemplo 14 : (11aS)-7-(5-bromopentiloxi)-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2, 1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (este compuesto no está reivindicado)

Esquema 2



Compuesto **15**. A una disolución de valinato de metilo (9,109 g, 50 mmol) en acetona (200 ml) se le añadieron K_2CO_3 (27,64 g, 200 mmol) y 1,5-dibromopentano (20,4 ml, 150 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo. Después de 6 h, el análisis por TLC no mostró ningún material de partida restante. La mezcla se enfrió a ta y el sólido se retiró por filtración. El filtrado se concentró. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 8:2 de hexanos/EtOAc) produjo éster metílico del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-3-metoxi-benzoico **15** en forma de un sólido blanco (13,65 g, 82%): ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,60 – 1,66 (m, 2H), 1,85 – 1,97 (m, 4H), 3,42 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 4,06 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 6,85 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,63 (dd, J = 6,3, 1,5 Hz, 1H); EIMS m/z 353 y 355 ($[M]^+$+Na).

Compuesto **16**. Se añadió $Cu(NO_3)_2 \cdot xH_2O$ sólido (3,64 g, 19,42 mmol) a una disolución agitada del éster metílico del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-3-metoxi-benzoico **15** (5,36 g, 16,18 mmol) en anhídrido acético (81 ml) a 0ºC. La mezcla de reacción se agitó a 0ºC durante 1 h y a ta durante 2 h y después se vertió en 200 ml de hielo-agua. La agitación se mantuvo durante 1 h más. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración y se lavó con agua. Se secó adicionalmente a vacío elevado proporcionando éster metílico del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoico, compuesto 16 como un sóli**do** amarillo claro (5,98 g), que se usó directamente en la siguiente e$^{tapa:}$ ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,59- 1,70 (m, 2H), 1,85 - 1,98 (m, 4H), 3,43 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 4,08 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 7,05 (s, 1 H), 7,42 (s, 1H). EIMS m/z 398 y 400 ($[M]^+$+Na).

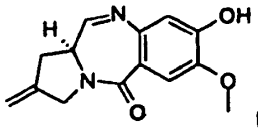
Compuesto **17**. Se suspendió éster metílico del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoico **16** (5,98 g, 15,9 mmol) en THF-MeOH-H_2O (3:1:1, 157 ml) y se trató con LiOH ac. 1 M (31 ml) a ta durante 5 h. Después de la retirada de los disolventes volátiles, el residuo se diluyó con H_2O (70 ml). La disolución acuosa resultante se acidificó a un valor de pH de ~2 con HCl concentrado. El ácido 4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoico precipitado **17** se recogió por filtración, se lavó con H_2O y se secó de nuevo a vacío elevado (5,47 g): ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,64 – 1,68 (m, 2H), 1,87 – 1,98 (m, 4H), 3,43 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 4,08 (s, 3H), 4,10 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 13,60 (s a, 1H); EIMS m/z 384 y 386 ($[M]^+$+Na).

Compuesto **18**. Se añadió una cantidad catalítica de DMF (2 gotas) a una solución del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoico **17** (270 mg, 0,74 mmol) y cloruro de oxalilo (80 µl, 0,89 mmol) en THF anhidro (7,5 ml) y la mezcla resultante se agitó a ta durante una noche. El exceso de THF y cloruro de oxalilo se retiraron con un evaporador rotatorio. El cloruro de acetilo se suspendió de nuevo en THF recién preparado (6 ml) y se añadió gota a gota a una disolución de éster metílico de 4-metileno-L-prolina **5** (228 mg, 0,89 mmol), Et_3N (0,32 ml, 2,31 mmol) y H_2O (0,15 ml) en THF (1,5 ml) a 0ºC en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar a ta y la agitación se mantuvo durante 4 h. Después de la retirada de THF, el residuo se repartió entre H_2O y EtOAc (20/20 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (3 x 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6:4 de hexanos/EtOAc) produjo éster metílico de 1-[4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-L-prolina **18** en forma de un aceite amarillo claro (rotámeros): ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,62-1,68 (m, 2H), 1,86-1,98 (m, 4H), 2,64 - 2,75 (m, 1 H), 2,99 - 3,08 (m, 1 H), 3,43 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,59 - 3,96 (m, 7H), 4,05 - 4,21 (m, 3H), 4,57 - 4,61 y 4,90 - 5,12 (m, 3H), 6,80 y 6,83 (2 s, 1 H), 7,64 y 7,67 (2 s, 1 H); EIMS m/z 507 y 509 ($[M]^+$+Na).

Compuesto **19**. A una solución agitada vigorosamente de éster metílico de 1-[4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-L-prolina **18** (61 mg, 0,12 mmol) en tolueno anhidro – CH_2Cl_2 (3:1, 2,5 ml) se le añadió gota a gota una solución de DIBAL-H (188 µl de una solución 1 M en tolueno) a -78ºC en una atmósfera de argón. Después de agitar la mezcla durante 45 min más, el exceso de reactivo se descompuso mediante la adición de tres gotas de metanol seguido de HCl al 5% (2 ml). La mezcla resultante se dejó calentar a 0ºC. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo de nuevo con CH_2Cl_2 (3 x 2 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 1:1 de hexanos/EtOAc) produjo (S)-1-[4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-2-pirrolidinacarboxaldehído **19** en forma de un aceite amarillo claro (44 mg, 80%).

Compuesto **20**. Una mezcla del (S)-1-[4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-2-pirrolidinacarboxaldehído **19** (43,7 mg, 0,096 mmol), $Na_2S_2O_4$ (0,58 mmol, 6 equiv.), 1,5 ml de THF y 0,9 ml de H_2O se agitó a ta durante 18 h. Los disolventes se retiraron a vacío elevado. El residuo se suspendió de nuevo en MeOH (6 ml) y se añadió gota a gota AcCl hasta un valor de pH de ~2. La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h. La reacción se trató mediante la retirada de la mayor parte del MeOH y después se diluyó con EtOAc (20 ml). La disolución de EtOAc se lavó con $NaHCO_3$ ac. sat. y salmuera, se secó ($MgSO_4$) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 98:2 de $CHCl_3$/MeOH) produjo (11aS)-7-(5-bromopentiloxi)-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona 20 en forma de un aceite amarillo claro (31 mg, 74%): ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$). δ 1,58- 1,66 (m, 2H), 1,84-1,99 (m, 4H), 2,91- 2,95 (m, 1 H), 3,08 - 3,14 (m, 1 H), 3,42 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,87- 4,27 (m, 5H), 5,15 (br s, 1 H), 5,18 (br s, 1 H), 6,84 (s, 1 H), 7,49 (s, 1 H), 7,71 (d, J = 4,0 Hz, 1 H); EIMS m/z 429 y 431 ($[M]^+$+Na).

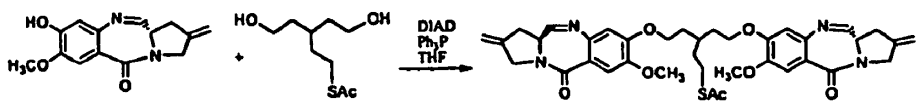
El compuesto 20 se puede acoplar a continuación a (11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona :



para proporcionar el compuesto **4** del ejemplo 11.

■ **Ejemplo 15: 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanediilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metilen-7-metoxi-1,2,3,11 a-tetrahidro-5H-pirrolo[2, 1 -c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (este compuesto no está reivindicado)**

A una disolución de trifenilfosfina (1,77 g, 6,8 mmol) en THF anhidro (15 ml) se le añadió gota a gota azodicarboxilato de dietilo (2,2 M en tolueno, 2,4 ml, 5,4 mmol) a 0ºC. Después de agitar a 0ºC durante 55 minutos, se añadió gota a gota una disolución de 3-(2-hidroxietil)pentano-1,5-diol (740 mg, 5 mmol) y ácido tioacético (335 µl, 4,5 mmol) en THF seco (7 ml). Después de 1 hora, el baño de hielo/agua se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida ($CHCl_3$/MeOH, 20:1, 15:1, 10:1, 4:1) para dar 3-(2-acetiltioetil)pentano-1,5-diol en forma de un sólido blanco (350 mg) y se recuperó el material de partida triol (406 mg). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 3,65-3,63 (m, 4H), 3,45 (s a, 2H), 2,84-2,80 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 1,73-1,67 (m, 1H), 1,55-1,49 (m, 6H). MS (ESI): m/z 229,0 $(M + Na)^+$.



A una disolución de trifenilfosfina (53 mg, 0,2 mmol) en THF anhidro (0,4 ml) se le añadió gota a gota azodicarboxilato de disopropilo (36 µl, 0,17 mmol) a 0ºC. Después de agitar a 0ºC durante 25 minutos, se añadió una disolución de (11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona, el monómero PBD (38 mg, 0,14 mmol, co-evaporado con benceno seco y secado a vacío elevado durante dos horas antes del uso) en THF seco (0,2 ml). La mezcla se mantuvo en agitación durante 10 minutos antes de que se añadiera el compuesto tioacetato (12 mg, 0,058 mmol, coevaporado con benceno seco y secado a vacío elevado durante dos horas antes del uso) en THF seco (0,2 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 0ºC durante 35 minutos. El baño de hielo/agua se retiró y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida

($CHCl_3$/MeOH, 100:1, 50:1, 25:1, 20:1) para formar 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (19 mg, r = 47%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,66 (d, J = 4,4 Hz, 2H), 7,46 (s, 2H), 6,78 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,26 (s, 4H), 4,17-4,09 (m, 4H), 3,88 (s, 6H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,13-3,06 (m, 2H), 2,94-2,90 (m, 4H), 2,29 (s, 3H), 1,95 (s a, 3H), 1,68 (s a, 4H). MS (ESI, con H_2O): m/z 745,3 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 727,3 $(M + H_2O + Na)^+$, 709,2 $(M + Na)^+$.

■ Ejemplo 16: Procedimiento general para la preparación de conjugados:

Para la conjugación con derivados de tomaimicina se selecciona el anticuerpo anti-B4 que se une al antígeno CD19 expresado preferentemente en la superficie de células de linfoma humano.

En la primera etapa, el anticuerpo se hace reaccionar con el agente modificador 5-nitro-2-piridilditiobutanoato de N-sulfosuccinimidilo (SSNPB) para introducir grupos nitropiridilditio. Una disolución de anticuerpo huC242 a una concentración de 8 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato potásico 0,05 M, cloruro sódico 0,05 M y ácido etilendiaminatetraacético 2 mM (EDTA), pH 6,5 (65,6 ml) se trata con un exceso molar de 8 veces de una disolución de SSNPB en dimetilacetamida (DMA). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 90 min. y después se introduce en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 (50 mm x 35,5 mm, columna) que previamente se ha equilibrado en un tampón acuoso que contiene fosfato potásico 0,05 M, cloruro sódico 0,05 M y EDTA 2 mM, pH 7,5. Las fracciones modificadas que contienen anticuerpo se recogen y se reúnen para producir el producto. Una pequeña alícuota del anticuerpo modificado se trata con ditiotreitol para escindir el disulfuro de nitro-piridilo y la nitro-piridina-2-tiona liberada se ensaya espectrofotométricamente (ε_{323nm} = 4.299 $M^{-1}cm^{-1}$,ε_{280nm} = 565 $M^{-1}cm^{-1}$ para el compuesto y ε_{280nm} = 217.560 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). Por molécula de anticuerpo típicamente se une una media de 4 a 6 moléculas de nitro-piridildisulfuro.

El anticuerpo modificado se diluye a 2,5 mg/ml en el tampón anterior a pH 7,5 y después se trata con una disolución del derivado de tomaimicina en DMA, de tal forma que la concentración final de DMA en el tampón sea 20%. La mezcla de conjugación se agita a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se purifica por su paso a través de una columna de exclusión molecular Sephacril S300 (50 mm x 42 cm, columna que previamente se ha equilibrado en tampón de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpo monomérico-derivado de tomaimicina se reúnen y se dializan en el tampón PBS. El conjugado final se ensaya espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinan por separado para cada derivado de tomaimicina.

■ Ejemplo 17 : Ensayo de Unión

Las afinidades de unión relativas del anticuerpo anti-B4 y su conjugado de tomaimicina en células Ramos que expresan el antígeno se determinan usando un ensayo basado en fluorescencia. Se añaden el conjugado anticuerpo -tomaimicina y el anticuerpo desnudo en concentraciones iniciales de 1 a 10^{-7} M, en placas de 96 pozos y se valoran utilizando diluciones en serie de 3 veces, a fin de que haya duplicados para cada concentración. Se añaden células Ramos 50.000 células por pozo, a cada pozo conteniendo distintas concentraciones del anticuerpo o conjugado, así como a los pozos de control. Las placas se incubaron en hielo durante 3 horas. Después del periodo de incubación, se lavaron las células en la placa y se añade un anticuerpo secundario marcado para fluorescencia que se une a IgG humanizada, como anti-B4 y se incubaron las placas durante 1 hora en hielo. Se lavaron las placas de nuevo después del periodo de incubación y se fijaron las células con disolución de formaldehído al 1%/PBS . Se leyó la fluorescencia en cada pozo de las placas utilizando un analizador de fluorescencia FACSCalibur Becton Dickinson. Los datos se representaron gráficamente como un porcentaje de la fluorescencia máxima obtenida para la concentración más alta de anticuerpo o conjugado.

- Ejemplo 18: Potencia y especificidad *in vitro* del derivado de tomaimicina o de conjugados del derivado de tomaimicina. Protocolo general a usar:

Se añaden muestras de un derivado libre de tomaimicina o de un conjugado de derivado de tomaimicina a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano y se valoran usando diluciones en serie que varían de 1 x 10^{-12} M a 3 x 10^{-7} M. Se añaden células tumorales antígeno-positivas o células tumorales antígeno-negativas a los pocillos de tal manera que haya muestras por triplicado para cada concentración de fármaco para cada línea celular. Las placas se incuban a 37ºC en una atmósfera con 5% de CO_2 durante 4 días.

Al final del periodo de incubación, se añadieron 20 µl del reactivo de tetrazolio WST-8 sal monosódica de (2-(2-metoxi-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2-tetrazolio) a cada pozo y las placas se devuelven a la incubadora, durante 2 horas. Después se mide la absorbancia en cada pozo de las placas utilizando el lector de placas de Molecular Devices a 450 nm. Se representó gráficamente la fracción de supervivencia de células en cada concentración de derivado de tomaimicina o conjugado.

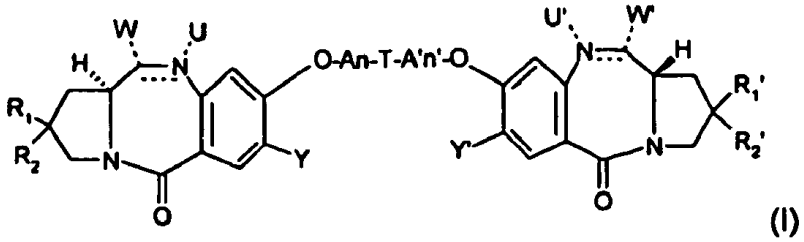
Compuestos	**A549 (CI_{50})**	**KB (CI_{50})**	**MCF7 (CI_{50})**
Ejemplo 5	7×10^{-11} M	1×10^{-10} M	1×10^{-10} M
Ejemplo 1	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M
Ejemplo 2	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M

■ **Ejemplo 19: Eficacia *in vivo* de derivados de tomaimicina o de conjugados de derivados de tomaimicina.**

Los ensayos pueden realizarse por medio de la aplicación y/o adaptación del protocolo descrito en el documento WO 2004/103272, con huB4 como anticuerpo y líneas celulares antígeno-positivas apropiadas tales como Ramos y líneas de linfoma de Rajii Burkitt.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula (I):



(I)

donde:

---- representa un enlace sencillo opcional;

---- representa o un enlace sencillo o un doble enlace ;

con la condición de que cuando ---- represente un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representen independientemente H y W y W, iguales o diferentes, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, -OR, -OCOR, -OCOOR, -OCONRR', un carbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -NRCONRR', -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, -SR, -SOR, -SOOR, $-SO_3$, $-OSO_3$, -NRSOOR, -NRR', amina opcionalmente cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -NROR', -NRCOR, $-N_3$, un ciano, un halo, un trialquil o triarilfosfonio ;

y cuando ---- represente un doble enlace, U y U' están ausentes y W y W' representan H;

R_1, **R_2**, **R_1'**, **R_2'** son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre un Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, S(O)qR, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre alquilo opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het;

- **A** y **A'** son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquilo o Alquenilo estando cada uno opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, S(O)qR, Arilo, Het, Alquilo, Alquenilo.

- Y e Y' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, OR;

- **q** es 0, 1 ó 2;

n, n', iguales o diferentes, son 0 ó 1 ;

R y R' son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de H, Alquilo, Arilo, estando cada uno opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het;

- **T** es -NR- o un arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, estando cada uno opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, alquilo y sustituidos con uno o más sustituyente(s) que contienen tiol-, sulfuro- o disulfuro de fórmula:

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

$-(CR_{13}R_{14})_t(NT_{19}CO)(CR_{15}R_{18})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$:

$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$; $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

$-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$; $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

$-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$; $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

-$(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-N-metil-piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-furil-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-QSZ';

-$(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-QSZ';

-$(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ';

-$(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazino-QSZ';

-$O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$O(CR_{13}R_{14})_t$-$NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$O(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-O-fenil-OSZ'; -O-furil-QSZ'; -O-oxazolil-QSZ'; -O-tiazolil-QSZ'; -O-tienil-QSZ';

-O-imidazolil-QSZ'; -O-morfolino-QSZ';

-O-piperazino-QSZ'; -O-N-metilpiperazino-QSZ';

-OCO-$(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-OCO-fenil-QSZ'; -OCO-furil-QSZ'; -OCO-oxazolil-QSZ'; -OCO-tiazolil-QSZ';

-OCO-tienil-QSZ'; -OCO-imidazolil-QSZ'; -OCO-morfolino-QSZ' ;

-OCO-piperazino-QSZ'; -OCO-N-metilpiperazino-QSZ';

-$CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_y$ SZ';

-CO-$(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_tCR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-CO-fenil-QSZ'; -CO-furil-QSZ'; -CO-oxazolil-QSZ'; -CO-tiazolil-QSZ';

-CO-tienil-QSZ'; -CO-imidazolil-QSZ'; -CO-morfolino-QSZ' ; -CO-piperazino-QSZ';

-CO-piperidino-QSZ'; -CO-N-metilpiperazino-QSZ';

-$NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

- $NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-NR_{19}CO-fenil-QSZ'; -NR_{19}CO-furil-OSZ'; -NR_{19}CO-oxazolil-QSZ';

-NR_{19}CO-tiazolil-QSZ'; -NR_{19}CO-tianil-QSZ'; -NR_{19}CO-imidazolil-QSZ';

-NR_{19}CO-morfolino-QSZ'; -NR_{19}CO-piperazino-QSZ';

-NR_{19}CO-piperidino-QSZ'; -NR_{19}CO-N-metilpiperazino-QSZ';

-NR_{19}-fenil-QSZ'; -NR_{19}-furil-QSZ'; -NR_{19}-oxazolil-QSZ'; -NR_{19}-tiazolil-QSZ';

-NR_{19}-tienil-QSZ'; -NR_{19}-imidazolil-QSZ'; -NR_{19}-morfolino-QSZ';

-NR_{19}-piperazino-QSZ'; -NR_{19}-piperidino-QSZ'; -NR_{19}-N-metilpiperazino-QSZ';

$-NR_{19}CO-NR_{12}$-fenil-QSZ'; $-NR_{19}CO-NR_{12}$-oxazolil-QSZ';

$-NR_{19}CO-NR_{12}$-tiazolil-QSZ'; $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tienil-QSZ';

$-NR_{19}CO-NR_{12}$-piperidino-QSZ';

$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

$-SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-SCO-morfolino-QSZ'; -SCO-piperazino-QSZ';

-SCO-piperidino-QSZ'; -SCO-N-metilpiperazino-QSZ'

donde:

• **Z'** es **H**, Ac, $\mathbf{R}_{19}$' o $\mathbf{SR}_{19}$' ;

• **Q** es un enlace directo o un alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene de 1-10 átomos de carbono o un espaciador de polietilenglicol con 2 a 20 unidades repetitivas etilenoxi;

• $\mathbf{R}_{19}$' y $\mathbf{R}_{12}$ son iguales o diferentes y son alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido o heterociclo y R_{12} puede ser además H ;

• $\mathbf{R}_{13}$, $\mathbf{R}_{14}$, $\mathbf{R}_{15}$ y $\mathbf{R}_{16}$ son iguales o diferentes y son H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono,

• $\mathbf{R}_{17}$, $\mathbf{R}_{18}$ y $\mathbf{R}_{19}$ son H o alquilo;

• **u** es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

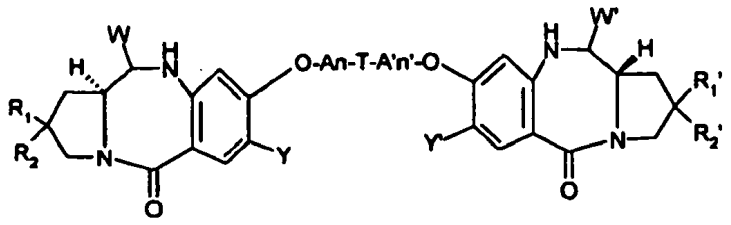
• **t** es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

• **y** es un número entero de 1 a 20 y también puede ser 0.

o sus sales, hidratos o sales hidratadas aceptables farmacéuticamente o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

2. Compuestos según la reivindicación 1 en donde n=n'=1.

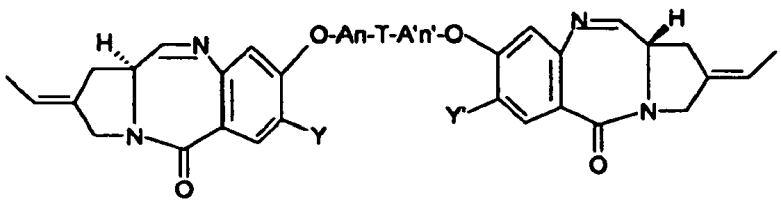
3. Compuestos según la reivindicación 1 ó 2 de fórmula (II) :



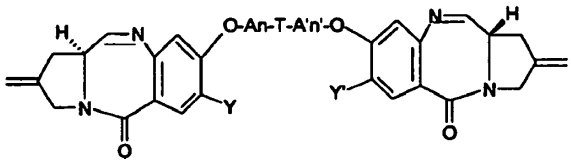
(II)

4. Compuestos según las reivindicaciones 1 a 3, en donde **W** y **W** son iguales o diferentes y son -OH, -OMe, -OEt, $-NHCONH_2$, -SMe.

5. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 de fórmula:



o



6. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde **A=A**'.

7. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que **A=A'**= alquilo no sustituido lineal.

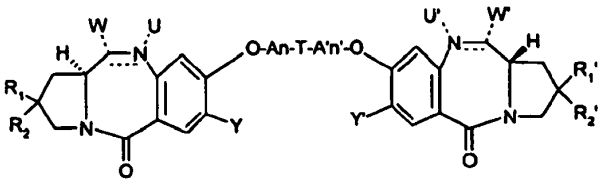
8. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que **Y=Y**'.

9. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que **Y=Y'**=OAlquilo.

10. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que **Y=Y'**=OMe.

11. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde **T** es un fenilo o piridilo.

12. Un conjugado que comprende al menos un compuesto de fórmula :



donde:

- representa un enlace sencillo opcional;

---- representa o un enlace sencillo o un doble enlace ;

con la condición de que cuando ---- represente un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representen independientemente H y W y W, iguales o diferentes, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, -OR, -OCOR, -OCOOR, -OCONRR', un carbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -NRCONRR', -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, -SR, -SOR, -SOOR, $-SO_3$, $-OSO_3$, -NRSOOR, -NRR', amina opcionalmente cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -NROR', -NRCOR, $-N_3$, un ciano, un halo, un trialquil o triarilfosfonio ;

y cuando ---- represente un doble enlace, U y U' están ausentes y W y W' representan H;

- $\mathbf{R}_1$, $\mathbf{R}_2$, $\mathbf{R}_1$', $\mathbf{R}_2$' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre un Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, S(O)qR, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

• **B** y **B'** son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre alquilo opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het;

• **A** y **A'** son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquilo o Alquenilo estando cada uno opcionalmente sustituido con uno o más de Hal, CN, NRR', CF_3, OR, S(O)qR, Arilo, Het, Alquilo, Alquenilo.

- **Y** e **Y'** son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, OR;

- **q** es 0, 1 ó 2;

- **n**, **n'** iguales o diferentes, son 0 ó 1 ;

- **R** y **R'** son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de H, Alquilo, Arilo, estando cada uno opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het;

- **T** es -NR- o un arilo o heteroarilo de **4** a 10 miembros, estando cada uno opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, alquilo y sustituidos con uno o más enlazador(es) que contienen tiol-, sulfuro- o disulfuro de fórmula:

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y$ SZ';

-$(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$; -$(CR_{13}R_{14})_t$-furil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$; -$(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil- $CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$; -$(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

-$(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-N-metil-piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$;

-$(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-furil-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$oxazolil-QSZ';

-$(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-QSZ';

-$(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ'; -$(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ';

-$(CR_{13}R_{14})_t$-metilpiperazino-QSZ';

-$O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$O(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-O-fenil-QSZ'; -O-furil-QSZ'; -O-oxazolil-QSZ'; -O-tiazolil-QSZ'; -O-tienil-OSZ';

-O-imidazolil-QSZ'; -O-morfolino-OSZ';

-O-piperazino-QSZ'; -O-N-metilpiperazino-QSZ';

-OCO-$(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-OCO-fenil-QSZ'; -OCO-furil-QSZ'; -OCO-oxazolil-QSZ'; -OCO-tiazolil-OSZ';

-OCO-tienil-QSZ'; -OCO-imidazolil-QSZ'; -OCO-morfolino-QSZ' ;

-OCO-piperazino-QSZ'; -OCO-N-metilpiperazino-QSZ';

-$CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-CO-$(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-CO-fenil-QSZ'; -CO-furil-QSZ'; -CO-oxazolil-QSZ'; -CO-tiazolil-QSZ';

-CO-tienil-QSZ'; -CO-imidazolil-QSZ'; -CO-morfolino-QSZ' ; -CO-piperazino-OSZ';

-CO-piperidino-QSZ'; -CO-N-metilpiperazino-QSZ';

-$NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

- $NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$NR_{19}CO\ NR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{18})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-NR_{19}CO-fenil-QSZ'; -NR_{19}CO-furil-QSZ'; -NR_{19}CO-oxazolil-QSZ';

-NR_{19}CO-tiazolil-QSZ'; -NR_{18}CO-tienil-QSZ'; -NR_{19}CO-imidazolil-QSZ';

-NR_{19}CO-morfolino-QSZ'; -NR_{19}CO-piperazino-QSZ';

-NR_{19}CO-piperidino-QSZ'; -NR_{19}CO-N-metilpiperazino-QSZ';

-NR_{19}-fenil-QSZ'; -NR_{19}-furil-QSZ'; -NR_{19}-oxazolil-QSZ'; -NR_{19}-tiazolil-QSZ';

-NR_{19}-tienil-QSZ'; -NR_{19}-imidazolil-QSZ'; -NR_{19}-morfolino-QSZ';

-NR_{19}-piperazino-QSZ'; -NR_{19}-piperidino-QSZ'; -NR_{19}-N-metilpiperazino-QSZ';

-$NR_{19}CO$-NR_{12}-fenil-QSZ'; -$NR_{19}CO$-NR_{12}-oxazolil-QSZ';

-$NR_{19}CO$-NR_{12}-tiazolil-QSZ'; -$NR_{19}CO$-NR_{12}-tienil-QSZ';

-$NR_{19}CO$-NR_{12}-piperidino-QSZ';

-$S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-$SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$;

-SCO-morfolino-QSZ'; -SCO-piperazino-QSZ';

-SCO-piperidino-QSZ'; -SCO-N-metilpiperazino-QSZ'

donde:

• **Z'** es H, Ac, $\mathbf{R}_{19}$' o $\mathbf{SR}_{19}$' ;

• **Q** es un enlace directo o un alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene de 1-10 átomos de carbono o un espaciador de polietilenglicol con 2 a 20 unidades repetitivas etilenoxi;

• $\mathbf{R}_{19}$' y $\mathbf{R}_{12}$ son iguales o diferentes y son alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido o heterociclo y R_{12} puede ser además H ;

• $\mathbf{R}_{13}$, $\mathbf{R}_{14}$, $\mathbf{R}_{15}$ y $\mathbf{R}_{16}$ son iguales o diferentes y son H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono,

• $\mathbf{R}_{17}$, $\mathbf{R}_{18}$ y $\mathbf{R}_{19}$ son H o alquilo;

• **u** es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

• **t** es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

• **y** es un número entero de 1 a 20 y también puede ser 0.

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros,

estando dicho compuesto unido covalentemente a un agente de unión a las células a través de dicho enlazador.

13. Un conjugado según la reivindicación 12 en donde U, U', W, W, T, R_1, R_2, R_1', R_2', Y, Y', A, A', n, n', -, ---- son como se definen en las reivindicaciones 2 a 11.

14. Un conjugado según la reivindicación 12 o 13 en donde dicho agente de unión a célula se elige entre anticuerpos, fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de transporte de nutrientes.

15. Un conjugado según las reivindicaciones 12 a 14 en donde el agente de unión a la célula se elige de anticuerpos monoclonales; anticuerpos monocatenarios; Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv, interferones; péptidos; IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; insulina, TRH (hormoas liberadores de tirotropina), MSH (hormonas estimuladores de melanocito), hormonas esteroides, andrógenos, estrógenos; EGF, TGFα, factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF, GM-CSF; folato, transferrina.

16. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado según se define en las reivindicaciones 12 a 15 o un compuesto como se define en las reivindicaciones 1 a 11 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. Proceso de preparación de un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende la etapa en la que un compuesto de fórmula (I) como se ha definido en la reivindicación 1, en el que T comprende un grupo sulfuro, disulfuro o tiol, o un precursor del mismo, se hace reaccionar con un agente de unión a las células que comprende una función reactiva con disulfuro o tiol de manera que el compuesto y el agente de unión a las células se unen entre sí a través de un enlace covalente.

18. Proceso de preparación de un conjugado en donde un agente de unión a la célula que contiene un tiol libre o protegido se hace reaccionar con un compuesto que contiene disulfuro o tiol de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, siendo el agente de unión a la célula un péptido o un anticuerpo modificado con un agente de reticulación.

19. Proceso según la reivindicación 18 en donde el agente de reticulación es 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo, 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo, 4-succinimidil-oxicarbonil-α-metil-α-(2-piridilditio)-tolueno, butirato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio), butirato de N-sulfosuccinimidil-3-(2-(5-nitro-piridilditio), 2-iminotiolano o anhídrido S-acetilsuccínico.

20. Proceso según la reivindicación 17, en donde :

- el grupo tiopiridilo de un anticuerpo monoclonal modificado por piridilditiopropionato de succinimidilo se desplaza por tratamiento con un compuesto que contiene tiol según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para producir un conjugado unido a disulfuro;

- el grupo aril-tiol de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 es desplazado por grupos sulfhidrilo previamente introducidos en un anticuerpo para producir un conjugado unido a disulfuro.

21. Proceso según la reivindicación 17 en donde un compuesto que contiene tiol de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 se une vía un enlace tioéter, a un anticuerpo o un agente de unión a la célula modificado por 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo, N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato).

22. Proceso según la reivindicación 17 en donde el agente de reticulación comprende un resto basado en haloacetilo y se elige entre succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato, iodoacetato de N-succinimidilo, bromoacetato de N-succinimidilo o 3-(bromo-acetamido)propionato de N-succinimidilo.

23. Proceso según las reivindicaciones 17 a 22 en donde el conjugado se purifica :

- mediante una técnica de cromatografía estándar seleccionada entre HPLC, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica o cromatografía de afinidad, cromatografía sobre hidroapatita cerámica ;

■ o por diálisis ;

■ o por diafiltración.

24. Uso de una cantidad eficaz de un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 o un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

25. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso como un agente anticanceroso.

26. Un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 para uso como un agente anticanceroso.