

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 026**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08826772 .9**
96 Fecha de presentación: **18.07.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2170890**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **AGENTES CITOTÓXICOS QUE COMPRENEN NUEVOS DERIVADOS DE TOMAIMICINA Y SU USO TERAPÉUTICO.**

30 Prioridad:
19.07.2007 EP 07290904

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.03.2012

73 Titular/es:
SANOFI
174, AVENUE DE FRANCE
75013 PARIS, FR

72 Inventor/es:
BOUCHARD, Hervé;
RAVI, Chari V.J.;
COMMERÇON, Alain;
DENG, Yonghong y
GAUZY, Laurence

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

ES 2 376 026 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes citotóxicos que comprenden nuevos derivados de tomamicina y su uso terapéutico

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos derivados de tomamicina y su uso terapéutico como agentes citotóxicos. El uso terapéutico es el resultado de distribuir los derivados de tomamicina en una población celular específica de una manera dirigida por unión mediante enlaces químicos del derivado de tomamicina con un agente de unión a la célula. La invención también se refiere a moléculas conjugadas que comprenden uno o más de dichos derivados de tomamicina unidos mediante enlaces químicos a un agente de unión a la célula opcionalmente modificado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se han descrito muchos intentos de dirigir específicamente conjugados anticuerpo monoclonal-fármaco a células tumorales (Sela et al., en *Immuno-conjugates* 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; Ojima et al eds, *American Chemical Society* 2.001; J.M.Lambert, 5 *Current Opinion in Pharmacology*, 543-549 (2.005); P.R. Hamann, 15 *Expert Opinion on Therapeutics Patents*, 1.087-1.103 (2.005)). 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.* 1.076-1.080 (1.980); dextrano (Hurwitz et al, 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1.980); 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.*, 1.602-1.607 (1.984); Tsukada et al, 52, *Br. J. Cancer*, 111-116 (1.985)).

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

Los ensayos *in vitro* de citotoxicidad han revelado, sin embargo, que los conjugados anticuerpo-fármaco podían destruir no sólo células positivas de antígeno sino también otras células en los alrededores, con independencia de la expresión del antígeno en su superficie. Este fenómeno se denomina el efecto espectador. Este efecto se observó en conjugados del anticuerpo anti-CanAg; huC242, con maitansinoides y con un análogo CC1065 (Erickson et al, 66 *Cancer Res.*, 4.426-4.433 (2.006); Kovtun et al, 66 *Cancer Res.*, 3.214-3.221 (2.006)). Hasta ahora sólo los conjugados unidos mediante un enlace escindible tal como un enlace disulfuro reducible, demostraron citotoxicidad del espectador, mientras los conjugados unidos mediante un enlace tioéter no reducible no presentaban efecto espectador.

Las moléculas efectoras citotóxicas muy potentes unidas a agentes diana tales como anticuerpos podían generar potentes derivados de fármacos después del proceso intracelular del conjugado. Esto podía ser un problema si los metabolitos celulares generados manifestaran efectos secundarios no deseados o no fácilmente manejables. Para controlar la toxicidad de conjugados anticuerpo-fármaco, podía ser muy beneficioso usar ligantes no escindibles.

Otra desventaja principal de la mayoría de los conjugados anticuerpo-fármaco es su incapacidad para suministrar una concentración suficiente de fármaco al sitio diana debido al número limitado de antígenos diana y la citotoxicidad relativamente moderada de los fármacos cancerostáticos 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. Así, una alternativa es usar moléculas de fármacos mucho más potentes tales como las descritas a continuación.

También se han usado en conjugación ligantes no escindibles. Tienen interés en aplicaciones radioinmunoterapéuticas en particular. Esto se ha utilizado también en la unión de toxinas a anticuerpos monoclonales, en cuanto a *Pseudomonas* exotoxina con MAb 9.2.27 usando 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de maleimidiasuccinimidilo (SMCC, por sus siglas en inglés) heterobifuncional (patente europea EP 306943). La toxina conjugada MAb resulta tener mayor especificidad *in vitro* frente a líneas celulares positivas que el

correspondiente conjugado de enlace disulfuro y así menos tóxica en modelos de ratones. La toxicidad no específica disminuye significativamente cuando se usa un ligante no escindible. Este ligante no escindible se ha usado en el caso de trastuzumab (Herceptina) cuya diana HER2 (ErbB) HERR2 es una diana clave y se están investigando métodos para maximizar el efecto de usar MAbs para inhibir a este receptor. Una propuesta se dirige a aumentar la eficacia de trastuzumab (Herceptina) acoplándolo a un agente quimioterapéutico, permitiendo así la administración de tratamiento citotóxico a un nivel celular (Ranson and Sliwkowski, 63 (Supl. 1) Oncology, 17-24 (2.002)).

Existen otras versiones del reactivo SMCC, por ejemplo también se ha usado 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) soluble en agua, en reacción de conjugación. Otros ligantes no escindibles incluyen en particular S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA), SATA-SMCC, 2-iminotiazol (2IT) y 2IT-SMCC (Foulon et al, 10, Bioconjugate Chem., 867-876 (1.999)). También se han usado reactivos de acoplamiento que comprenden un resto basado en haloacetilo e incluyen 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB) yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA) y 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP). Estos reactivos de entrecruzamiento forman ligantes no escindibles procedentes de restos basados en haloacetilo.

A pesar de las dificultades descritas anteriormente debido a las moléculas de fármaco, se han descrito agentes citotóxicos útiles que comprenden restos de unión a la célula y el grupo de fármacos citotóxicos conocidos como maitansinoides (patente de EE.UU. 5.208.020, patente de EE.UU. 5.416.064 y R. V. J. Chari, 31 Advanced Drug Delivery Reviews 89-104 (1.998)). 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 tomamicina 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 antramycin, neotramycin y DC-81. Sin embargo, la actividad antitumoral de la tomamicina 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 tomamicina. Los presentes autores han demostrado que esta necesidad puede satisfacerse por la liberación dirigida de compuestos de tomamicina por medio de su unión con agentes de unión a la célula. Adicionalmente, existe la necesidad de desarrollar derivados de tomamicina que sean solubles y estables en disoluciones acuosas. Además, la tomamicina no es suficientemente potente como para usarse en conjugados de agentes de unión a la célula.

Recientemente se han descrito algunos nuevos derivados de PBD y su actividad antitumoral en modelos preclínicos (patente internacional WO 00/12508 y patente internacional WO 2005/085260). Sin embargo, los ensayos clínicos iniciales realizados en seres humanos indican que los compuestos de esta clase 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, EE.UU. 2.005, Resumen #B117). Así, se desea proporcionar derivados alternativos que muestren menos efectos secundarios sin comprometer la actividad citotóxica.

TÉCNICA ANTERIOR

Las solicitudes de patente internacional WO 2007/085930 y WO 2008/010101 describen derivados de tomamicina que se pueden unir a un agente de unión a la célula mediante un ligante pero el ligante no es un ligante como se define para los compuestos de la invención.

El artículo "Tetrahedron Letters, Vol. 29, N°40, págs. 5.105-5.108" describe derivados de tomamicina ref. (13)-(15) sin ligante.

La solicitud de patente internacional WO 2005/085250 describe dímeros de las PBD de fórmula general PBD-A-Y-X-(Het)_{n_a}-L-(Het)_{n_b}-L-(Het)_{n_c}-T-(Het')_{n_d}-L-(Het')_{n_e}-L-(Het')_{n_f}-X'-Y'-A'-PBD' en la que Het y Het' son grupos amino-heteroarileno de fórmula -J-G-J' o J'-G-J- donde G es un heteroarileno opcionalmente sustituido, n_a-n_f son números enteros entre 0 y 5, L puede ser β-alanina, glicina, ácido 4-aminobutanoico o un enlace sencillo. X y X' son ambos o -NH- o -C(=O)- e Y e Y' son grupos divalentes tal que HY es un grupo alquilo, heterociclo o arilo o un enlace sencillo. A y A' se seleccionan de O, S, NH o un enlace sencillo. T es un ligante divalente de la forma -NH-Q-NH- o -C(=O)-Q-C(=O)- donde Q es un grupo divalente tal que QH es un grupo alquilo, heterociclo o arilo (opcionalmente sustituido). Los compuestos de acuerdo con la fórmula general comprenden todos -NH- o -C(=O)- como X y X' y -NH-Q-NH- o -C(=O)-Q-C(=O)- que no es el caso para los compuestos de la invención.

La solicitud de patente internacional WO 2005/023814 describe dímeros de PBDs protegidos en el átomo de nitrógeno N10 por R₁₀-COO- que comprende un puente -X-R''-X- en el que R'' es un grupo alquilenno opcionalmente interrumpido por uno o más heteroátomos NH o S y/o anillos aromáticos y X es O, S o NH. No se menciona un ligante en el puente -X-R''-X-. Por otra parte, los compuestos de la invención no están protegidos en N10.

El artículo "European Journal of Medicinal Chemistry Vol. 40, N° 7, págs. 641-654" describe dímeros de PBDs ref. (38)-(40) que no comprenden ningún ligante en cuanto a los compuestos de la invención.

El artículo "Expert opinion ; Monoclonal antibody-drug conjugates", publicaciones Ashley, Vol. 15, N° 9, 2.005, págs. 1.087-1.103, ISSN:1.354-3.774 no describe los compuestos de la invención y el artículo "Cancer Res. 2.006, 66(8); págs. 4.426-4.433" describe maitansinoide unido a agentes de unión a la célula.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

- 5 La invención se refiere a nuevos derivados de tomaimicina según las reivindicaciones 1 a 2, que comprenden un ligante. También se refiere a las moléculas de conjugado que comprenden uno o más de dichos derivados de tomaimicina unidos mediante enlaces covalentes a un agente de unión a la célula por un grupo de enlace que está presente en el ligante del derivado de tomaimicina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10 Definiciones

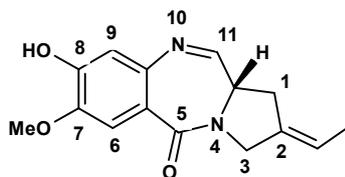
- Ms : mesilato ;
- "ligantes no escindibles" significa cualquier grupo adecuado para unir mediante enlaces covalentes a dicho derivado de tomaimicina a un agente de unión a la célula, en los que dicho grupo no contiene grupos disulfuro, grupos ácidos lábiles, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa y grupos lábiles de esterasa. Preferiblemente, dichos "ligantes no escindibles" comprenden un grupo carboxi o amido terminal o precursores de los mismos. El ligante no se escinde durante el proceso intracelular después de la internalización de la molécula de conjugado dentro de la célula y proteolisis potencial del agente de unión a la célula;
- 15 • la expresión "ligable a un agente de unión a la célula" se refiere a los derivados de tomaimicina que comprenden al menos un grupo ligante, que a su vez comprende un grupo ligante o un precursor del mismo, adecuado para unir dichos derivados a un agente de unión a la célula; son grupos ligantes preferidos: carboxi, enlaces amido o precursores de los mismos;
- 20 • la expresión "ligado a un agente de unión a la célula" se refiere a la molécula conjugada que comprende al menos un derivado de tomaimicina unido a un agente de unión a la célula mediante un grupo ligante adecuado o un precursor del mismo; grupos ligantes preferidos son enlaces no escindibles o precursores de los mismos;
- 25 • "precursor" de un grupo dado se refiere a cualquier grupo que pueda conducir a ese grupo por cualquier reacción de desprotección, modificación química o acoplamiento;
- "paciente" se refiere bien 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 puede padecer una o más enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria.
- 30 • "cantidad terapéuticamente eficaz" 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. La terminología "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 o afección y pretende incluir tratamiento profiláctico;
- 35 • "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas farmacéuticas 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 que correspondan a una relación beneficio/riesgo razonable;
- 40 • "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos, en los que el compuesto precursor se modifica preparando sales de ácidos o bases del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las 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.
- 50

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.

- "tratar" o "tratamiento" significa invertir, atenuar, inhibir el progreso de o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicha terminología o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.
- 5
- "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 la presente memoria;
- "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;
- 10
- "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.
- 15

Derivados de tomamicina

- 20 La invención se basa en la síntesis de nuevos derivados de tomamicina que retienen alta citotoxicidad y que pueden enlazarse eficazmente a agentes de unión a la célula con ligantes no escindibles, demostrando dichos conjugados alta potencia en la destrucción de células tumorales. 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 tomamicina descritos con restos químicos. Como resultado, los nuevos derivados de tomamicina descritos conservan y en algunos casos podían incluso aumentar la potencia citotóxica de los derivados de tomamicina. Los complejos agente de unión a la célula-derivado de tomamicina permiten la medición completa de la acción citotóxica de los derivados de tomamicina 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).
- 25
- 30



35 Tomamicina

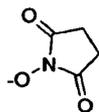
El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención comprende uno o más derivados de tomamicina, opcionalmente ligables o ligados a un agente de unión a la célula mediante un grupo ligante no escindible. El grupo ligante es parte de un resto químico que se une por enlaces covalentes a un derivado de tomamicina por métodos convencionales.

- 40 La invención se refiere a los derivados de tomamicina de las reivindicaciones 1-2.

- El ligante comprende una cadena terminada por un grupo ligante que no contiene ningún grupo escindible tal como un grupo disulfuro, un grupo ácido lábil, un grupo fotolábil, un grupo lábil de peptidasa y un grupo lábil de esterasa. El grupo ligante terminal no contiene el grupo -S-V en el que V es H, un grupo protector de tiol tal como COR, R₂₀ o SR₂₀, R₂₀ siendo H, metilo, alquilo, un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo, heteroarilo o heterociclo. El ligante no es ninguno descrito ni en la patente internacional WO 2007/085930 ni en la patente internacional WO 2008/010101. El grupo ligante terminal de los derivados de tomamicina de la invención es preferiblemente un grupo carboxi o amida, en el extremo terminal de la cadena lateral. La cadena lateral puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. Los especialistas en la materia pueden identificar fácilmente cadenas laterales adecuadas. Los ligantes preferidos constan de cadenas lineales que contienen funciones solubilizantes tales como: amino, hidroxilo, éter, grupos sulfónico y carboxílico.
- 45
- 50

Las sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas o las estructuras cristalinas polimórficas de los compuestos junto con los isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros, también forman parte de la invención. Cuando el compuesto está en forma de un ión (por ej. sulfonato); puede estar presente el contraión (por ej. Na⁺ o K⁺).

- 5 El ligante puede encontrarse más particularmente en los ejemplos adjuntos en la presente memoria. El grupo particular



tiende a aumentar la reactividad de la función éster.

Los compuestos de la invención se seleccionan del grupo que consiste en :

- 10 • ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c] [1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico ;
- ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-acético;
- 15 • ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico;
- ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c] [1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico;
- ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico;
- 20 • ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-butírico;
- ácido N-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico;
- 25 • ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-metiliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-propanoico;
- ácido (2-{2-[2-(2-{3-[3,5-Bis-(7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirroló[1.2-a][1.4]diazepin-8-iloximetil]-fenil]-propoxi)-etoxi]etoxi]-etoxi)-etoxi)-acético;
- ácido (3-{2-[2-(2-{3-[3,5-Bis-(7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirroló[1.2-a][1.4]diazepin-8-iloximetil]-fenil]-propoxi)-etoxi]etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoico;

- 30 así como los correspondientes ésteres o ésteres N-hidroxisuccinimidílicos

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.

Los isómeros geométricos y estereoisómeros de los compuestos de fórmula general (I) o (I') también son parte de la invención.

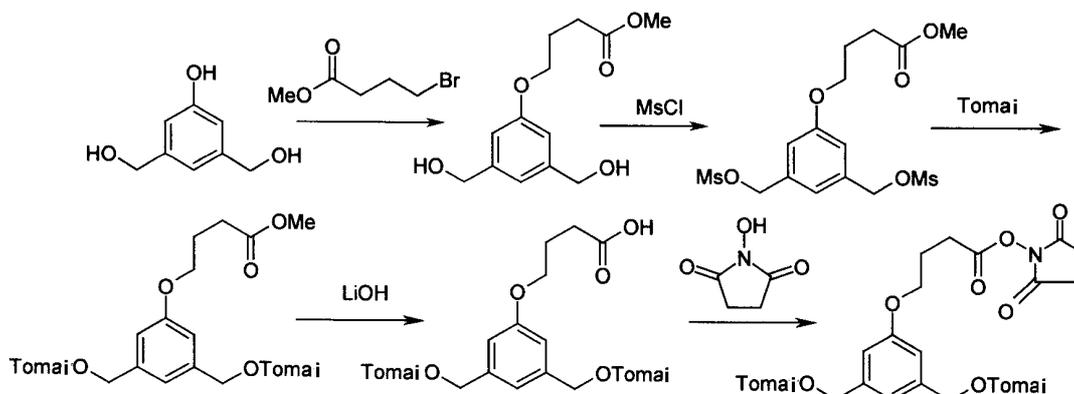
- 35 Se sabe que el doble enlace N10, C11 de los derivados de tomamicina puede convertirse fácilmente de manera reversible en los aductos de imina correspondientes en presencia de agua, un alcohol, un tiol, una amina primaria o secundaria, urea y otros nucleófilos. Este proceso es reversible y puede regenerar fácilmente los derivados de tomamicina 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).

40 Acerca de la preparación de los compuestos

Los compuestos pueden sintetizarse por aplicación o adaptación de los métodos descritos a continuación o variaciones en los mismos que puedan apreciarse por los especialistas en la materia. 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.

45

- 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 inversa 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.
- En las reacciones descritas a continuación en la presente memoria, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxilo, 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 Synthesis*, 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 puede realizar la reacción a una temperatura de -20°C a 150°C (más preferiblemente de aproximadamente la temperatura ambiente a 100°C). 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.
- La tomamicina y el monómero PBD son generalmente conocidos, como se describe por ejemplo en las patentes internacionales WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260 o comercialmente disponibles y/o están disponibles por síntesis total (M. Mori et al, 42 *Tetrahedron*, 3793-3806, 1986) o producidos por especies *Streptomyces*, en particular siguiendo el procedimiento de la patente francesa FR 1.516.743 o se puede preparar por aplicación o adaptación de los procedimientos ilustrativos dados en los ejemplos.
- A continuación se proporciona un esquema ejemplar para una ruta:



Acerca de la molécula conjugada

La presente invención también se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos un derivado de tomaimicina unido mediante enlaces químicos a un agente de unión a la célula por el grupo de unión del ligante. El enlace químico es preferiblemente un enlace covalente. Dicho conjugado comprende un derivado o más de tomaimicina de acuerdo con la invención unido por enlaces covalentes al agente de unión a la célula por el grupo de unión del ligante del derivado de tomaimicina. Como ejemplo representativo, dicho conjugado comprende un derivado de tomaimicina de la invención unido mediante enlaces covalentes al agente de unión a la célula por el grupo terminal $-\text{CO}-\text{Z}'\text{R}$ del ligante. Dicho grupo ligante se une mediante enlaces covalentes al agente de unión a la célula con el ligante del derivado de tomaimicina.

La molécula de conjugado se describe en las reivindicaciones 3-7.

Preferiblemente, el ligante está unido al agente de unión a la célula por una función reactiva por, por ejemplo, funciones tiol y amino del agente de unión a la célula que va de enlaces disulfuro reducidos y restos lisina respectivamente. Más particularmente, dicho derivado está unido por el grupo $-\text{CO}-$ a la función amino del resto lisina de dicho agente de unión a la célula, de manera que se forme un enlace amido.

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, linfocinas, 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 quiméricos; anticuerpos humanizados; anticuerpos totalmente humanos; 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 tiotropina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos; factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGF α , 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 expresión "agente de unión a la célula" también incluye agentes de unión a la célula modificados, en la que dicho agente de unión a la célula es modificado por un agente modificador para mejorar la reactividad de dicho agente de unión a la célula por el grupo de unión del ligante del derivado de tomaimicina.

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 IgG₁ 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 IgG₁ 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. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos MY9 y anti-B4 pueden ser murinos, quiméricos, humanizados o totalmente humanos.

5 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.

10 Ejemplos de anticuerpos monoclonales adecuados que se pueden usar para preparar la molécula conjugada pueden ser hu2H11 (registrada como **PTA-7662** por ATCC), uno de huMy9-6 descrito en la patente internacional WO 2004/043344, huDS6 descrito en la patente internacional WO 2005/009369 o uno descrito en las patentes internacionales WO 2008/047242, WO 2005/061541 o WO 02/16101.

15 Los derivados de tomaimicina pueden estar unidos a un anticuerpo u otro agente de unión a la célula por una función de tipo amida. Preferiblemente, los derivados se sintetizan para que contengan una función carboxílica y después uno o más derivados que contienen ácido carboxílico están unidos cada uno mediante enlaces covalentes al agente de unión a la célula por un enlace amido.

20 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 se pueden purificar por HPLC o por filtración en gel.

25 Preferiblemente, los conjugados anticuerpo monoclonal - o agente de unión a la célula - derivado de tomaimicina, son los que están unidos mediante un enlace amido, como se ha indicado anteriormente, que son capaces de liberar los derivados de tomaimicina. Se pueden preparar conjugados usando derivados de N-hidroxisuccinimida de la función carboxílica en el terminal del ligante de dímeros de tomaimicina. Por este método se preparan fácilmente conjugados que contienen 1 a 10 fármacos derivados de tomaimicina unidos por un enlace amido.

30 Más específicamente, una disolución de anticuerpo a una concentración de 8 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato de potasio 0,05 M, cloruro de sodio 0,05 M y ácido etilendiaminotetra-acético 2 mM (AEDT), a pH 8 es tratado con un exceso molar de 5 veces de una disolución del derivado de N-hidroxisuccinimida de un dímero de tomaimicina en dimetilacetamida (DMA), tal que la concentración final de DMA en el tampón sea 20%. La mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente (ta), durante 70 min. El conjugado anticuerpo - derivado de tomaimicina se purifica y se libera del fármaco sin reaccionar y otro material de bajo peso molecular por filtración en gel a través de una columna de Sephadex G-25 o Sephacryl S300 o Superdex 200. También se puede dializar la muestra durante la noche en un tampón de pH 6,5 para purificar además el producto. El número de restos de derivado de tomaimicina unidos por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo la relación de la absorbancia a 320 nm y a 280 nm. Por este método se pueden unir mediante un enlace amido un promedio de 1-10 moléculas de derivado de tomaimicina/molécula de anticuerpo.

40 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).

45 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.

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

Ligantes de amida: Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG₁ 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 IgG₁ 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 la célula se hace reaccionar con el derivado del ácido de la N-hidroxisuccinimida para producir un conjugado unido a amida.

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 hidroxapatita 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 la célula y derivados de la presente invención son los que se unen a través de un enlace amido, como se ha descrito anteriormente. Dichos conjugados de unión a la célula se preparan por métodos conocidos tales como la modificación de moléculas de fármacos unibles que poseen una función carboxílica para conseguir el derivado de ácido de la N-hidroxisuccinimida. Los grupos carboxílicos activados resultantes acilan después los restos que contienen lisina del anticuerpo para producir conjugados unidos a amida. Por este método se preparan fácilmente conjugados que contienen de 1 a 10 derivados unidos por un puente amido.

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 la célula es un fragmento de anticuerpo con especificidad de antígeno, tal como sFV, Fab, Fab' o F(ab')₂.

Acerca del uso de la molécula conjugada

La presente invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula conjugada de la invención o un derivado de tomamicina como se definió anteriormente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se describe en la reivindicación 12.

La presente invención también se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para eliminar o inhibir el crecimiento de las células, preferiblemente poblaciones celulares seleccionadas, que comprende poner en contacto las células diana o el tejido que contiene células diana con una cantidad eficaz de la composición farmacéutica. Las poblaciones celulares seleccionadas son las células cancerosas y/o proliferativas.

La presente invención también se refiere al uso de una molécula de conjugado o un derivado de tomamicina como se definió anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer. El uso como se describe en la reivindicación 13.

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 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. 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 μ g a 10 mg/kg de peso corporal por semana, *i.v.* (intervalo de 10 μ g 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.

5 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.

10 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.

15 La cantidad que se requiere para conseguir el efecto biológico deseado variará dependiendo de varios factores, incluyendo las características químicas (por ej., 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.

20 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 que se tiene que 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, intraperitoneal, subcutánea 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).

25 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.

30 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 electrolitos 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.

50 FIGURAS

Fig. 1: citotoxicidad *in vitro* del éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butírico del ej. 1 ;

Fig. 2 : citotoxicidad *in vitro* del éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-acético del ej. 2 ;

55 Fig. 3 : potencia de la citotoxicidad *in vitro* de compuestos 8 (IGP08) y 9 (IGP08-OMe) del ej. 8 ;

- Fig. 4 representa los análisis de Espectro de Masas del conjugado huMy9-6 desglucosilado - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butirilo (con 2,1 Fármaco/Ab por UV que es 2,1 derivado de tomamicina por 1 anticuerpo, cuando se determina por UV) del ej. 11 ;
- 5 Fig. 5: Análisis del Espectro de Masas del conjugado huB4 desglucosilado - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butirilo (4,48 Fármaco/Ab por UV) del ej. 12 ;
- Fig. 6 : Análisis MS de conjugado hu2H11 desglucosilado - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butirilo (3,74 Fármaco/Ab por UV) del ej. 13 ;
- 10 Fig. 7: Análisis MS de conjugado huMy9-6 - 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionilo (4,8 Fármaco/Ab por UV) del ej. 14 ;
- Fig. 8: Análisis MS de conjugado hu2H11 - 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionilo (4,08 Fármaco/Ab por UV) del ej. 15 ;
- 15 Fig. 9: Análisis MS de huB4-IGP08 desglucosilado (compuesto del ej. 18) ;
- Fig. 10: propiedades de unión comparativas de huMy9-6 desnudo y huMy9-6-IGP08 (compuesto del ej.18) al antígeno CD33 ;
- Fig. 11: potencia de la citotoxicidad *in vitro* de huB4-IGP08 (compuesto del ej. 18) frente a células Ramos (Ag-) y HL60/QC (Ag+);
- 20 Fig. 12: Análisis MS de huB4-IGP08 desglucosilado (3,1 Fármaco/Ab por UV) del ej. 19) ;
- Fig. 13: propiedades de la citotoxicidad de huB4-IGP08 (compuesto del ej. 19) frente a células BJAB (Ag+), Ramos (Ag+) y MOLT-4 (Ag-);
- Fig. 14: propiedades de unión comparativas de huB4 desnudo y huB4-IGP08 (compuesto del ej.19) ;
- Fig. 15 : Análisis MS de hu2H11-IGP13 desglucosilado (4,7 Fármaco/Ab por UV) del ej. 21;
- 25 Fig. 16: propiedades de la citotoxicidad de hu2H11-IGP13 (compuesto del ejemplo 21) contra células PC3 (Ag+), MDA-MB-231 (Ag+) y SK-MEL-28 (Ag-) ;
- Fig. 17: propiedades de la citotoxicidad del éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico del ej. 5 ;
- 30 Fig. 18: propiedades de la citotoxicidad del éster metílico del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico del ej. 6 ;
- Fig. 19: propiedades de la citotoxicidad del éster metílico del ácido N-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico del ej. 7 ;
- 35 Fig. 20 : datos de la citotoxicidad *in vitro* para conjugado huMy9-6 - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butirilo del ej.11 ;
- Fig. 21: datos de la citotoxicidad *in vitro* para conjugado huB4 - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butirilo del ej. 12 ;
- Fig. 22: datos de la citotoxicidad *in vitro* para conjugado hu2H11 - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butirilo del ej. 13 ;
- 40 Fig. 23 : datos de la citotoxicidad *in vitro* para conjugado huMy9-6 - 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionilo del ej. 14 ;
- Fig. 24: datos de la citotoxicidad *in vitro* para conjugado hu2H11 - 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionilo del ej. 15.
- 45

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 Waters Alliance con una columna WATERS XBridge C18 de 3,5 μm (100x3 mm) usando elución en gradiente 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 min, 5% de A: 95% de B durante 2 min) con un caudal de 1,1 ml/min; 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 A2: Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS)

Se usa un software Micromass MassLynx y el análisis se realiza en un HPLC serie Agilent 1100 con una columna XBridge C18 de 2,5 μm (50x3 mm) usando elución en gradiente con una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua/ácido fórmico al 0,1% (gradiente: 5% de A: 95% de B hasta 100% de A durante 5 minutos, 100% de A durante 0,5 min, 100% de A disminuyendo a 5% de A: 95% de B durante 1 min, 5% de A: 95% de B durante 0,5 min) con un caudal de 1,1 ml/minuto; espectrómetro Waters-Micromass ZQ con Electrospray (ionización positiva y negativa); Serie de Diodos en línea (210-254 nm).

Método A3: Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS)

El análisis se lleva a cabo en un Waters UPLC-SQD con una columna ACQUITY BEH C₁₈ de 1,7 μm – 2,1x50 mm, a 50°C, usando elución en gradiente con una mezcla de (A) H₂O / ácido fórmico al 0,1 % y (B) CH₃CN / ácido fórmico al 0,1 % (gradiente : 95% de A: 5% de B disminuyendo a 50% de A: 50% de B durante 0,8 min, 50% de A: 50% de B disminuyendo a 100% de B durante 1,2 min, 100% de B durante 1,85 min, 100% de B hasta 95% de A: 5% de B durante 1,95 min) con un caudal de 1 ml/minuto; Electrospray (ionización positiva y/o negativa).

Método A4 : Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS)

El análisis se lleva a cabo en un espectrómetro Waters ZQ con una columna XBridge C18 de 2,5 μm (50x3 mm), a 70°C, usando elución en gradiente con una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua / ácido fórmico al 0,1 % (gradiente : 5% de A: 95% B hasta 100% A durante 5,3 min, 100% A durante 5,5 min, 5% A : 95% de B durante 6,3 min) con un caudal de 0,9 ml/min; Electrospray (ionización positiva y/o negativa).

Método B: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (RMN)

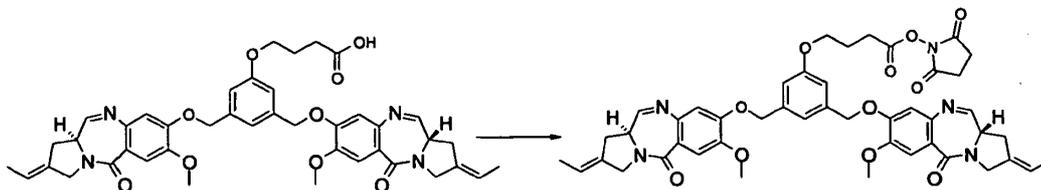
Los espectros de RMN de ¹H se registraron o en un espectrómetro BRUKER AVANCE DRX -500, un BRUKER AVANCE DRX -400 o un espectrómetro BRUKER AVANCE DRX -300. Se registraron los espectros de RMN de ¹³C indicados en un espectrómetro BRUKER AVANCE DRX -300

Método C: Espectros de masas por Ionización Química (CI)

Los espectros CI se registraron usando un espectrómetro de masas WATERS GCT (amoníaco).

Método D: Espectro de masas por Ionización Química (CI) Los espectros de masas CI se registraron usando un espectrómetro de masas FINNIGAN SSQ 7000 (amoníaco)

Ejemplo 1 : Se puede preparar éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico como sigue :

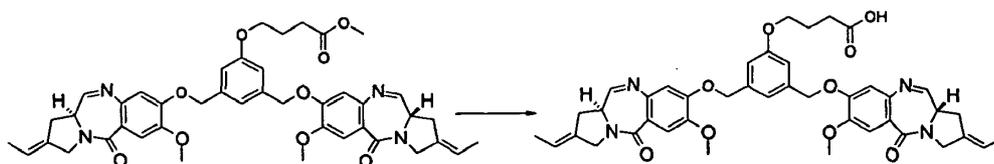


A una suspensión de ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico (11,3 mg) en tetrahidrofurano (0,4 ml) se añadió carbonato de N,N'-disuccinimidilo (7,7 mg) y N,N'-diisopropiletilamina (15,8 μl). Después de 2,5 h a ta, se añadió acetato de etilo (6 ml) a la mezcla de reacción y se lavó la disolución orgánica dos veces con agua (4 ml) después con una disolución acuosa de cloruro de sodio, saturada (5 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna de Merck MiniVarioFlash 2,5 g , Si60 15-40 μm), usando elución en gradiente con una mezcla de MeOH (metanol) (A) / DCM (diclorometano) (B), (gradiente : 2% de A: 98% de B hasta 4% de A: 96%B) para dar éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-

iloximetil]-fenoxi)-butírico (17,6 mg): LC/MS (Método A4): ES : m/z 846 (M+H)⁺ ; Tiempo de retención (TR) = 3,89 min.;

RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ= 1,75 (d, J=6,8 Hz, 6 H); 2,23 (m, 2H); 2,73 - 2,87 (m, 6H); 2,97 (m, 4H); 3,84 - 3,95 (m, 2H); 3,97 (s, 6H); 4,06 (m, 2H); 4,26 (m, 4H); 5,14 (d, J = 12,4 Hz, 2H) ; 5,21 (d, J = 12,4 Hz, 2H) ; 5,62 (m, 2H); 6,84 (s, 2H); 6,96 (s, 2H); 7,09 (s, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,63 (m, 2H);

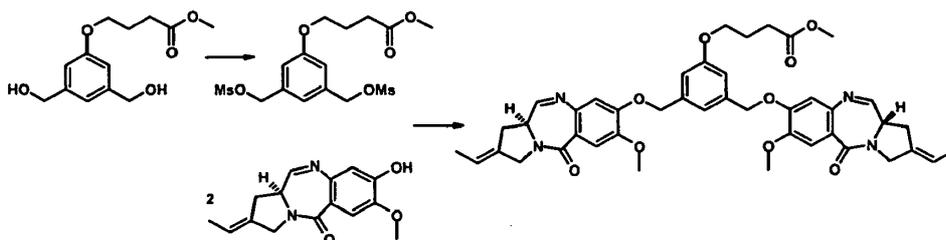
Se puede preparar ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico como sigue:



A una disolución de éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico (60 mg) en tetrahidrofurano (0,9 ml) se añadió MeOH (0,3 ml), agua (0,3 ml) y una disolución acuosa de hidróxido de litio (1 M, 87 µl). Después de 3 horas, se diluyó la mezcla de reacción con agua (10 ml) y se ajustó el pH a 2 por adición de una disolución acuosa de ácido clorhídrico 1 N. La fase acuosa se extrajo tres veces con DCM (10 ml) y las disoluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash 10 g, SiOH 15-40 µm), eluido con una mezcla de DCM/MeOH/ácido acético (100:4:0,5) para dar ácido 4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico: LC/MS (Método A2): ES : m/z=749 MH⁺ ; m/z=375 (M + 2H)²⁺ /2 ; TR = 3,7 min;

RMN de 1H (400 MHz, DMSO-d₆, δ en ppm): δ= 1,69 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,95 (m, 2H) ; 2,39 (t, J = 6.5 Hz, 2H) ; 2,91 (m, 2H) ; 3,05 (m, 2H) ; 3,83 (s, 6H) ; 3,98 (m, 2H) ; 4,01 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,10 (m, 4H) ; 5,11 (d, J = 12.5 Hz, 2H) ; 5,20 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,55 (m, 2H) ; de 6,90 a 7,15 (m, 5H) ; 7,34 (s, 2H) ; 7,77 (m, 2H) ; 12,1 (m ancho, 1H).

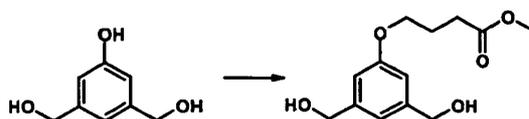
Se puede preparar éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico como sigue :



A una disolución enfriada (0°C) de éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-(hidroximetil)-fenoxi)-butírico (50 mg) y trietilamina (110 µl) en THF (tetrahidrofurano) (1,4 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonilo (46 µl). Después de 1 h, la mezcla de reacción se diluyó con DCM (10 ml) y se lavó dos veces con agua (5 ml). La disolución orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna de Merck SuperVarioFlash 10 g, SiOH 15-40 µm), usando elución en gradiente con una mezcla de MeOH (A)/DCM (B); (gradiente: 100% de B disminuyendo a 5% de A: 95% de B) para dar 71,8 mg del compuesto dimesilato. A una mezcla de tomamicina (80 mg), yoduro de potasio (49 mg), carbonato de potasio (122 mg) en DMF (dimetilformamida) (1 ml), se añadió una disolución del compuesto di-mesilato (71,8 mg) en DMF (1,6 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 16 h, a 30°C. Se añadió agua (12 ml) y se filtró el sólido resultante, se lavó con agua y se secó al vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna de Merck SuperVarioFlash 30 g; SiOH 15-40 µm), usando elución en gradiente con una mezcla de MeOH (A)/DCM (B), (gradiente : 100% de B disminuyendo a 5% de A: 95%B) para dar éster metílico del ácido (4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico (65,4 mg): LC/MS (Método A2): ES : m/z=763 MH⁺ ; m/z=382 (M + 2H)²⁺ /2 ; TR = 4,0 min;

RMN de 1H (500 MHz, CDCl₃-d₁, δ en ppm) : 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 2,11 (m, 2H); 2,53 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 2,98 (m, 4H) ; 3,69 (s, 3H); 3,89 (m, 2H); 3,97 (s, 6H); 4,00 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,28 (s ancho, 4H) ; 5,12 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,61 (m, 2H); 6,82 (s, 2H); 6,92 (s, 2H); 7,06 (s, 1H) ; 7,52 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

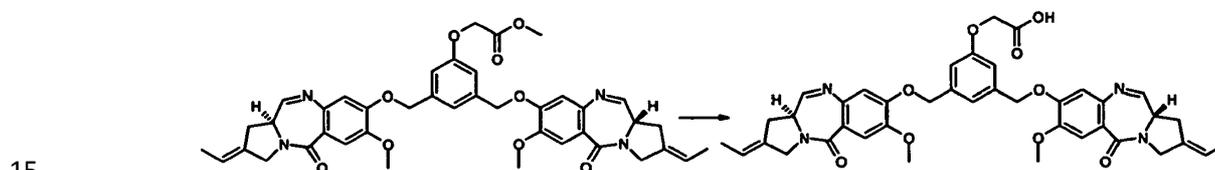
Se puede preparar éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-hidroximetil)-fenoxi)-butírico como sigue :



5 A una disolución de 3,5-bis-hidroxiimetilfenol (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) (200 mg), yoduro de potasio (50 mg) y carbonato de potasio (540 mg) en THF (2,5 ml) se añadió
 10 éster metílico del ácido 4-bromo-butírico (400 μ l). Se agitó la mezcla de reacción durante 20 h a temperatura ambiente después se separó por filtración la parte insoluble. Se concentró el líquido filtrado a vacío y se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna de Merck SuperVarioFlash 30 g; Si60 15-40 μ m); usando elución en gradiente con una mezcla de MeOH (A)/ DMC (B); (gradiente : 100% de B disminuyendo a 5% de A: 95%B) para dar éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-hidroxiimetil-fenoxi)-butírico (53,5 mg) : LC/MS (Método A2): ES : ES m/z=255 MH⁺ m/z = 237 (M + H - H₂O)⁺; TR = 2,5 min;

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ en ppm): δ = 1,96 (m, 2H); 2,47 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,61 (s, 3H) ; 3,96 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,43 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,11 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,71 (s, 2H) ; 6,82 (s, 1H).

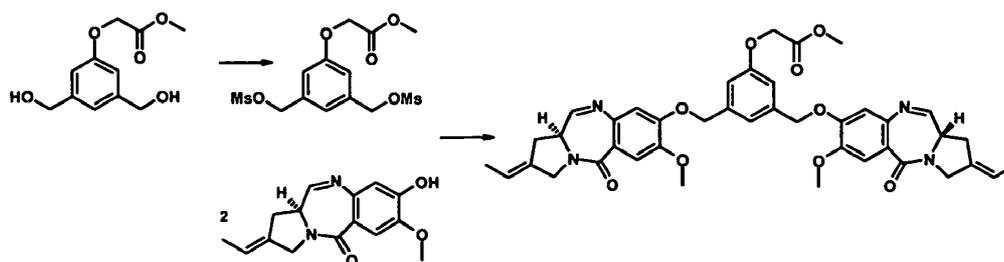
Ejemplo 2: Ácido 4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-acético:



15 Se puede preparar ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-acético siguiendo el procedimiento para la preparación de ácido 4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico empezando
 20 con éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-acético:

LC/MS (Método A2): ES : m/z=721 MH⁺ ; m/z=361 (M + 2H)²⁺ /2 ; TR = 3,5 min

Éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-acético



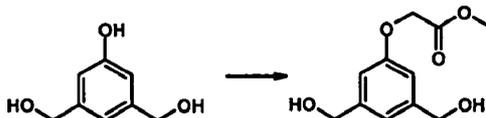
25 El éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-acético se puede preparar siguiendo el procedimiento para la preparación del éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico, partiendo del éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-hidroxiimetil-fenoxi)-acético: LC/MS (Método A2):

30 ES : m/z=735 MH⁺ ; m/z=368 (M + 2H)²⁺ /2 ; TR = 3,8 min;

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃-d₁, δ en ppm) : δ = 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 2,96 (m, 4H) ; 3,78 (s, 3H); 3,88 (m, 2H); 3,97 (s, 6H); 4,27 (s ancho, 4H) ; 4,64 (s, 2H); 5,13 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (m, 2H); 6,80 (s, 2H); 6,96 (s, 2H); 7,11 (s, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

35

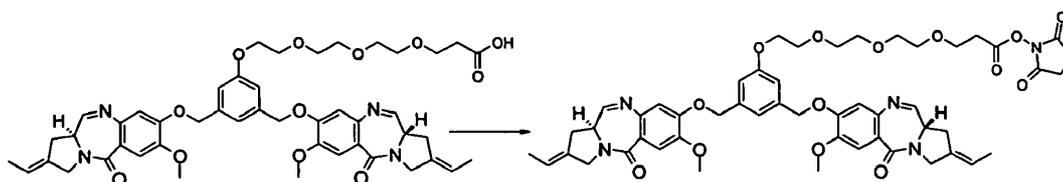
Éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-acético :



Se puede preparar éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-acético siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 4-(3,5-bis-hidroximetil-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido 4-bromo-acético : LC/MS (Método A2): ES : m/z=227 MSH⁺ ; m/z=209 (M+H - H₂O)⁺ ; TR = 1,9 min;

RMN de 1H (400 MHz, DMSO-d₆, δ en ppm): δ = 3,70 (s, 3H) ; 4,43 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 4,74 (s, 2H) ; 5,14 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,72 (s, 2H) ; 6,88 (s, 1H).

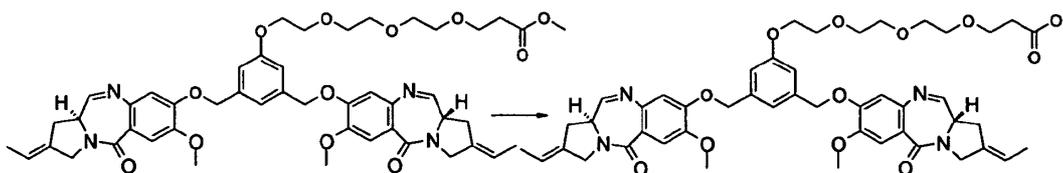
Ejemplo 3: Éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico:



Se puede preparar éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloxi metil]-fenoxi)-butírico, empezando con ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló [2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico : LC/MS (Método A3): ES : m/z 964 (M+H)⁺ ; TR = 0,90 min;

RMN de 1H (500 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ= 1,75 (dd, J=6,7 Hz, 6 H) ; 2,82 (m, 4 H) ; 2,89 (t, J=6,6 Hz, 2 H) ; 2,97 (m, 4H) ; 3,57-4,23 (m, 16H) ; 3,97 (s, 6H) ; 4,27 (m, 4H) ; 5,13 (d, J=12,7 Hz, 2 H) ; 5,20 (d, J=12,2 Hz, 2 H) ; 5,61 (m, 2 H) ; 6,82 (s, 2 H) ; 6,96 (s, 2 H) ; 7,07 (s, 1 H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,4 Hz, 2H).

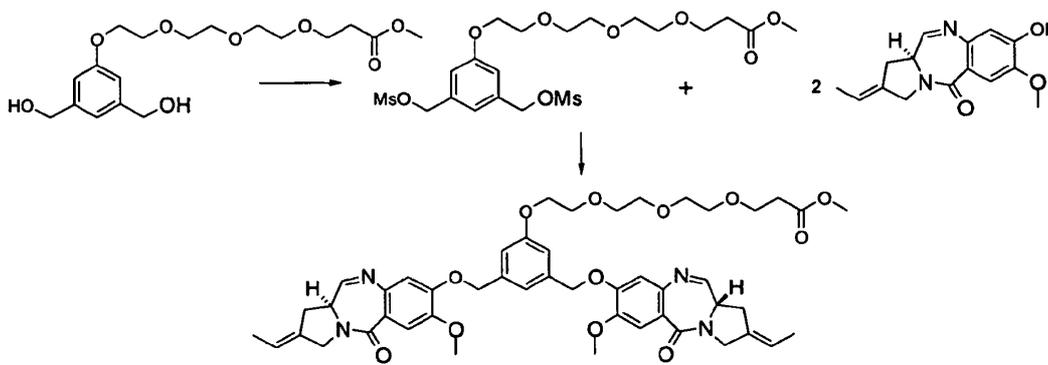
ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico:



Se puede preparar ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico siguiendo el procedimiento para la preparación del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloxi metil]-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló [2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico : LC/MS (Método A3): ES : m/z 867 (M+H)⁺ ; m/z 434 (M + 2H)²⁺ /2 ; TR = 0,84 min;

RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ= 1,76 (dd, J=8,6, 1,5 Hz, 6 H) ; 2,61 (t, 2H) ; 2,94 - 3,00 (m, 4 H) ; 3,63 - 3,75 (m, 8 H) ; 3,80 (t, J=6,5 Hz, 2 H) ; 3,85 - 3,95 (m, 4 H) ; 3,98 (s, 6 H) ; 4,17 (t, J=4,9 Hz, 2 H) ; 4,27 (a s, 4H) ; 5,14 - 5,21 (m, 2H) ; 5,18 (d, J=12,7 Hz, 2 H) ; 5,23 (d, 2 H) ; 5,23 (d, J = 12,7 Hz, 2H) ; 5,62 (td, J = 4,5; 2,2 Hz, 2H) ; 6,88 (d, J=0,5 Hz, 2 H) ; 6,97 - 7,02 (m, 2H) ; 7,09 (s, 1H) ; 7,54 (s, 2H) ; 7,68 (d, J = 4,9 Hz, 2H) ;

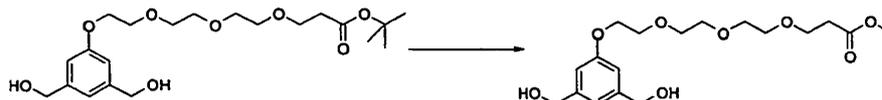
Éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico:



5 Se puede preparar éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-hidroximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico: LC/MS (Método A3): ES : m/z 881 (M+H)⁺ ; m/z 441 (M+2H)²⁺ /2 ; TR = 0,91 min;

10 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ = 1,75 (d ancho, J=6,7 Hz, 6 H) ; 2,60 (t, J = 6,7 Hz, 2H) ; 2,97 (m, 4H); 3,54 - 4,21 (m, 16H); 3,68 (s, 3H); 3,97 (s, 6H); 4,27 (m, 4 H) ; 5,13 (d, J = 12,2 Hz, 2H) ; 5,21 (d, J=12,2 Hz, 2 H) ; 5,61 (m, 2H); 6,83 (s, 2H); 6,96 (s, 2H); 7,08 (s, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,2 Hz, 2H) .

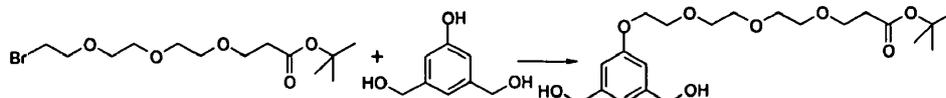
Puede prepararse éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-bis-hidroximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi) propiónico como se indica a continuación:



15 A una disolución de éster terc-butílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-hidroximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico (607 mg) en DCM (8,7 ml) se añadió ácido trifluoroacético (2,2 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 3 días a ta, después se concentró a vacío y se disolvió el residuo obtenido en metanol (5 ml). A la disolución metanólica enfriada (0°C) se añadió (trimetilsilil)diazometano 2 M en hexanos (3,6 ml) hasta persistencia del color amarillo.

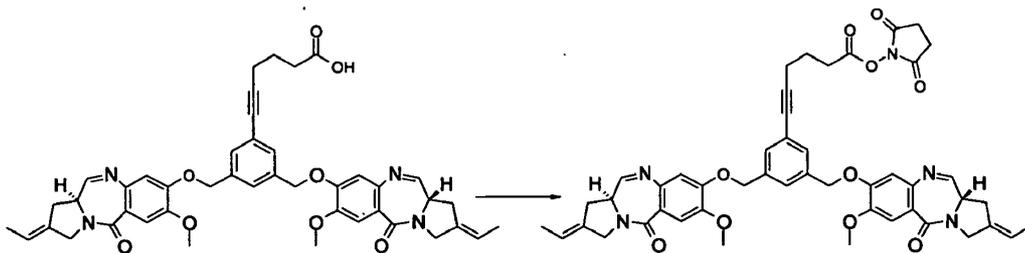
20 Después se añadió ácido acético (10 µl) y la disolución resultante se concentró a vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-40g), usando elución en gradiente con una mezcla de DCM (A) y MeOH (B) (gradiente : 99% de A: 1% de B disminuyendo a 90% de A: 10% B) para dar éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-hidroximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico (232 mg). LC/MS (Método A3): ES : m/z 373 (M+H)⁺ ; m/z 395 (M+Na)⁺ ; TR = 0,50 min Éster terc-butílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-hidroximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico:

25



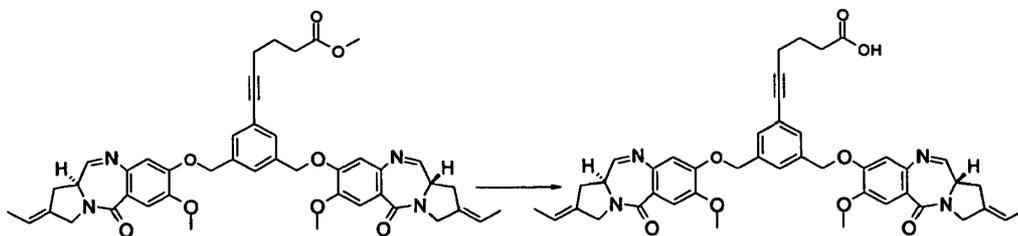
30 Se puede preparar éster terc-butílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-hidroximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-butírico, empezando con éster terc-butílico del ácido 3-{2-[2-(2-Bromo-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico (patente internacional WO 2004/091542) : LC/MS (Método A3): ES : m/z 415 (M+H)⁺ ; m/z 432 (M+NH₄)⁺ ; TR = 0,75 min

Ejemplo 4 : Éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico



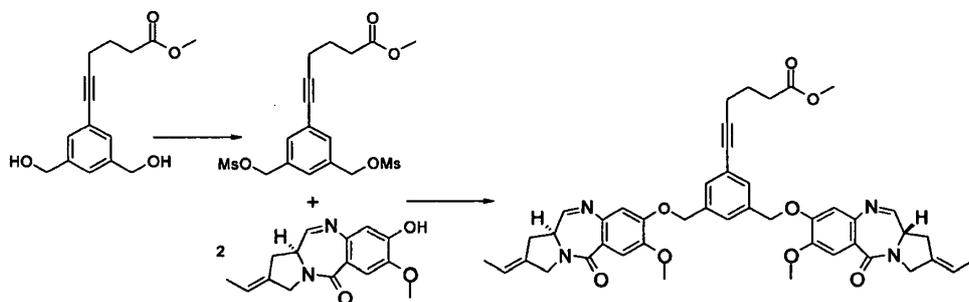
- 5 Se puede preparar éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c] [1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico, empezando con ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloxi metil]-fenil)-hex-5-inoico: LC/MS (Método A3): ES : m/z 854 (M+H)⁺ ; TR = 1,25 min

- 10 Ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c] [1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico



- 15 Se puede preparar ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c] [1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico siguiendo el procedimiento para la preparación del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloxi metil]-fenil)-hex-5-inoico: LC/MS (Método A3): ES : m/z 757 (M+H)⁺ ; TR = 0,89 min;

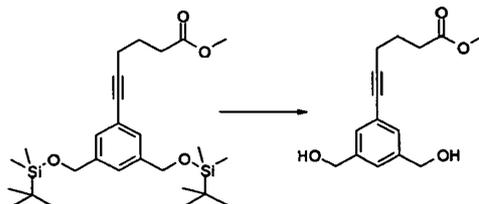
- 20 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ= 1,76 (d, J=6,8 Hz, 6 H) ; 1,98 (m, 2H) ; 2,55 (m, 4 H) ; 2,97 (m, 4H) ; 3,91 (m, 2 H) ; 3,97 (s, 6H) ; 4,27 (m, 4 H) ; 5,15 (d, J=12,8 Hz, 2 H) ; 5,21 (d, J=12,8 Hz, 2 H) ; 5,61 (m, 2 H) ; 6,88 (s, 2 H) ; 7,48 (s, 3 H) ; 7,53 (s, 2 H) ; 7,67 (m, 2 H) Éster metílico del ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c] [1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico



- 25 Se puede preparar éster metílico del ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló [2.1c] [1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido 6-(3,5-Bis-hidroxi metil)-fenil)-hex-5-inoico : LC/MS (Método A3): ES : m/z 771 (M+H)⁺ ; TR = 1,00 min;

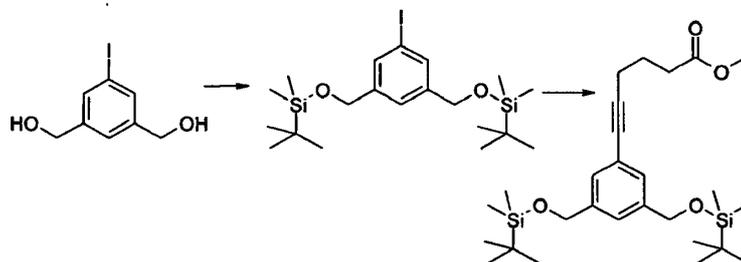
- 30 RMN de 1H (500 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ= 1,75 (d, J = 6,6 Hz, 6H) ; 1,93 (m, 2 H) ; 2,50 (m, 4 H) ; 2,96 (m, 4H) ; 3,69 (s, 3H) ; 3,90 (m, 2H) ; 3,97 (s, 6H) ; 4,27 (m, 4H) ; 5,12 (d, J=12,3 Hz, 2 H) ; 5,19 (d, J=12,3 Hz, 2 H) ; 5,61 (m, 2 H) ; 6,81 (s, 2 H) ; 7,43 (s, 3 H) ; 7,54 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,4 Hz, 2H).

Se prepara éster metílico del ácido 6-(3,5-Bis-hidroxitometil-fenil)-hex-5-inoico como sigue :



5 A una disolución enfriada (0°C) de éster metílico del ácido 6-[3,5-Bis-(terc-butil-dimetil-sililoximetil)-fenil]-hex-5-inoico (140 mg) en tetrahidrofurano anhidro (0,3 ml) se añadió suavemente una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en THF (716 µl). Después de 75 min a ta, se añadió acetato de etilo (20 ml) y se lavó la fase orgánica tres veces con agua (5 ml) y una vez con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio (5 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash 15 g; Si60 15-40 µm), usando elución en gradiente con una mezcla de heptano (A) / acetato de etilo (B), (gradiente: 50% de A: 50% de B disminuyendo hasta 10% de A: 90%B) para dar éster metílico del ácido 6-(3,5-Bis-hidroxitometil-fenil)-hex-5-inoico (64,3 mg) como un aceite amarillo pálido. LC/MS (Método A3): ES : m/z 263 (M+H)⁺ ; TR = 0,62 min

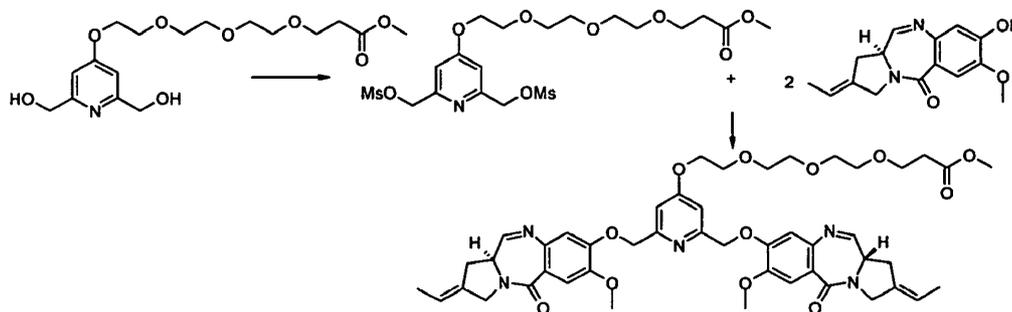
Se puede preparar éster metílico del ácido 6-[3,5-Bis-(terc-butil-dimetil-sililoximetil)-fenil]-hex-5-inoico como sigue



15 A una disolución de 1,3-Bis-hidroxitometil-5-iodo-benceno (Zeng; F. ; Zimmerman, S. C. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118 (22); 5326-5327) (1,7 g) en diclorometano (10 ml), se añadieron trietilamina (3,59 ml), cloruro de terc-butildimetilsililo (2,91 g) y DMF (2 ml). Después de 1 hora, se añadió acetato de etilo (200 ml) y se lavó la fase orgánica tres veces con agua (50 ml) y una vez con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio (50 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío para dar un residuo (3,65 g). A una disolución del residuo previo (200 mg) en DMF (0,90 ml) se añadió yoduro de cobre(I) (7,7 mg), diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (28,5 mg), éster metílico del ácido 5-hexinoico (102,4 mg) y trietilamina (113 µl). Después de 45 min, se añadió acetato de etilo (40 ml) y se lavó la fase orgánica tres veces con agua (10 ml) y una vez con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio (10 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna de Merck SuperVarioFlash 30 g, Si60 15-40 µm), usando elución en gradiente con una mezcla de heptano (A) / acetato de etilo (B), (gradiente: 100% de A disminuyendo hasta 90% de A: 10%B) para dar éster metílico del ácido 6-(3,5-Bis-(terc-butil-dimetil-sililoximetil)-fenil)-hex-5-inoico (145,3 mg) como un aceite amarillo. MS (Método C) : cl: m/z 494 (M+NH₄)⁺ ;

RMN de 1H (400 MHz, DMSO-d₆, δ en ppm): δ = 0,07 (s, 12H) ; 0,89 (s, 18H); 2. 55 - 2,69 (m, 2H); 3,63 (s, 3 H) ; 4,67 (s, 4H); 7,15 (s grande, 2H) ; 7,28 (s ancho, 1 H).

30 **Ejemplo 5 : Éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propiónico:**

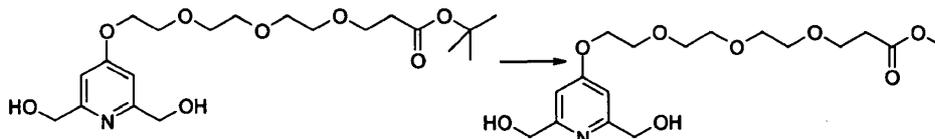


Se puede preparar éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-ioximetil]-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-ioximetil]-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico: LC/MS (Método A3): ES : m/z 882 (M+H)⁺; m/z 441,5 (M+2H)²⁺ / 2 ; TR = 0,82 min;

5

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ= 1,76 (d, J=6,8 Hz, 6 H); 2,59 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 2,97 (m, 4H); 3,58 - 3,72 (m, 9 H); 3,75 (t, J=6,5 Hz, 2 H); 3,80 - 3,97 (m, 4 H); 4,00 (s, 6H); 4,20 (m ancho, 2 H); 4,27 (m, 4H); 5,31 - 5,42 (m, 4 H); 5,61 (m ancho, 2 H); 6,87 (s, 2 H); 7,02 - 7,15 (m ancho, 2 H); 7,56 (s, 2H); 7,65 (d, J = 4,4 Hz, 2H).

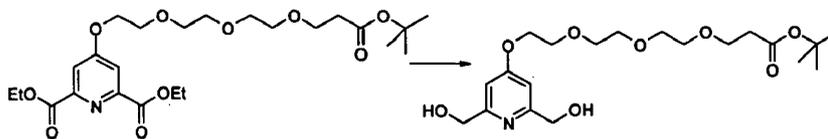
10 Éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico:



Se puede preparar éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-hidroximetil)-fenoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico, empezando con éster terc-butílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico: LC/MS (Método A3): ES : m/z 374 (M+H)⁺ ; m/z 418 (M+HCO₂H-H)⁻ ; TR = 0,31 min

15

Éster terc-butílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico:

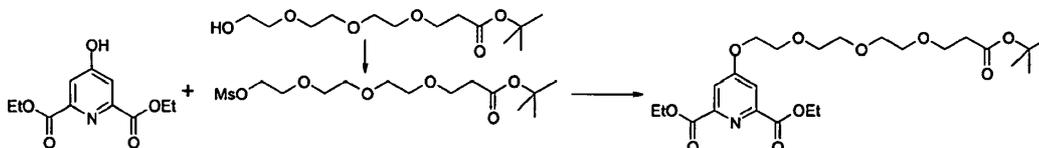


A una disolución de éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonil-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dicarboxílico (1,36 g) en etanol absoluto (72 ml) se le añadieron borohidruro sódico (309 mg) y cloruro de calcio (921 mg). Después de agitar durante 30 min, cesó el desprendimiento de hidrógeno y la reacción se enfrió rápidamente con agua. Después de concentración a presión reducida, se añadió cloruro de amonio y se extrajo la fase acuosa tres veces con acetato de etilo. Las disoluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-80 g), usando elución en gradiente con una mezcla de DCM (A) y MeOH (B) (gradiente : 100% de A disminuyendo hasta 90% de A: 10% B) para dar éster terc-butílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico (720 mg): LC/MS (Método A3): ES : m/z 416 (M+H)⁺ ; TR = 0,52 min

20

25

Éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-(2-terc-Butoxicarbonil-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dicarboxílico:



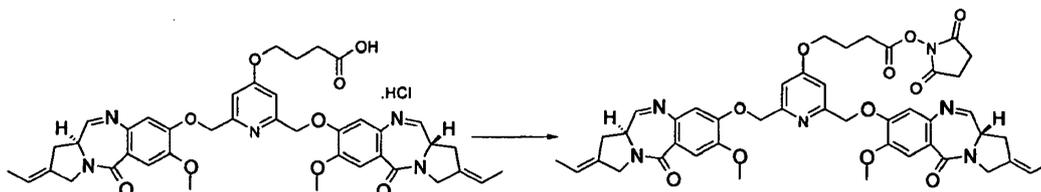
30

A una disolución enfriada (0°C) de éster terc-butílico del ácido 12-hidroxi-4,7,10-trioxadecanoico (1,91 ml) en DCM (12,9 ml) se añadió trietilamina (1,13 ml), se añadió cloruro de metanosulfonilo (622 µl). Después de 3 horas, se concentró a vacío la mezcla de reacción para dar un residuo después se disolvió en acetato de etilo (13 ml). Se separó por filtración la parte insoluble, se lavó dos veces con acetato de etilo (7 ml) y se concentraron a vacío las disoluciones orgánicas combinadas para dar un residuo (2,77 g). A una disolución de 1,64 g del residuo en acetonitrilo seco (10 ml) se añadió el éster dietílico de ácido quelidámico (Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonallato, U.; Vendrame, T. J. Org. Chem. 1.989, 54, 5.988) (1 g) y carbonato de potasio (2,88 g). Después de calentar para hacerlo hervir a reflujo durante 24 h, se separó por filtración la parte insoluble y se lavó con acetato de etilo. Se concentró después a vacío la fase orgánica para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep 200 g; Si60 15-40 µm), usando elución en gradiente con una mezcla de DCM (A) y MeOH (B) (gradiente: 100 % de A disminuyendo a 97 % de A: 3% de B) para dar éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonil-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-piridin-2,6-dicarboxílico (1,36 g): LC/MS (Método A4): ES: m/z 500 (M+H)⁺ ; m/z 522 (M+Na)⁺ ; m/z 444 (M-C₄H₈+H)⁺ ; TR = 4,32 min

35

40

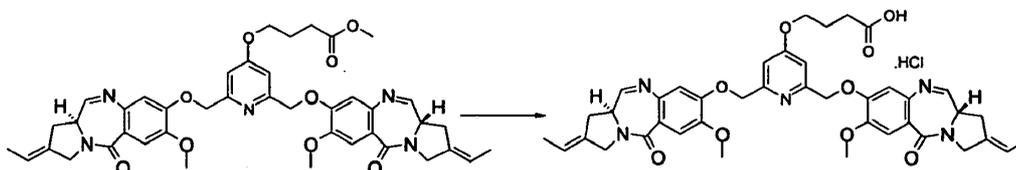
Ejemplo 6: Éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico :



5 Se puede preparar éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo [2.1c] [1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butírico, empezando con ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico C/MS (Método 3) : ES : m/z 847 (M+H)⁺ ; m/z 424 (M+2H)²⁺ /2 ; TR = 0,80 min;

10 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : 1,75 (d ancho, J=6,6 Hz, 6 H) ; 2,23 (m ancho, 2 H) ; 2,76 - 2,89 (m ancho, 6 H) ; 2,97 (m ancho, 4 H) ; 3,91 (m ancho, 2 H) ; 4,00 (s ancho, 6 H) ; 4,14 (m ancho, 2 H) ; 4,27 (m ancho, 4 H) ; 5,28 (m ancho, 4 H) ; 5,61 (m ancho, 2 H) ; 6,87 (s ancho, 2 H) ; 7,03 (s ancho, 2 H) ; 7,56 (s ancho, 2 H) ; 7,65 (m ancho, 2 H)

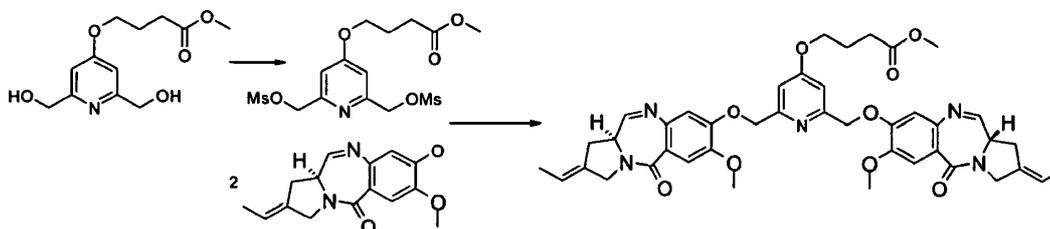
15 Hidrocloruro del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c] [1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico:



20 Se puede preparar hidrocloruro del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo [2.1c] [1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico siguiendo el procedimiento para la preparación de ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico: LC/MS (Método A3): ES : m/z 750 (M+H)⁺ ; m/z 375,5 (M+2H)²⁺ /2 m/z 332,5 (M-C₄H₆O₂+2H)²⁺ /2; TR = 0,73 min;

25 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ= 1,75 (d, J = 6,6 Hz, 6H) ; 2,02 (m, 2 H) ; 2,42 (m, 2H); 2,97 (m, 4H); 3,83 - 4,14 (m, 4 H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,27 (m, 4H) ; 5,20-5,42 (m, 4H); 5,61 (m, 2H); 6,85 (s, 2H); 6,94 (s, 2H); 7,56 (s, 2H); 7,63 (m, 2H).

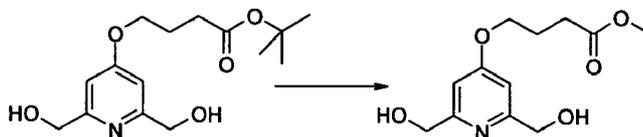
Éster metílico del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c] [1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico:



30 Se puede preparar éster metílico del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo [2.1c] [1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido 4-(2,6-Bis-hidroxiometil-piridin-4-iloxi)-butírico: LC/MS (Método A4): ES : m/z 764 (M+H)⁺ m/z 664 (M-C₅H₈O₂+H)⁺ m/z 762 (M-H)⁻ TR = 3,64 min ;

35 RMN de 1H (500 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ= 1,76 (d, J=6,8 Hz, 6 H) ; 2,12 (m, 2 H) ; 2,50 (t, J=7,3 Hz, 2 H) ; 2,97 (m, 4H); 3,68 (s, 3H); 3,90 (m, 2H); 4,00 (s, 6H); 4,07 (m ancho, 2 H) ; 4,27 (m, 4H); 5,29 (m ancho, 4 H) ; 5,61 (m, 2H); 6,86 (s, 2H); 6,99 (s ancho, 2 H) ; 7,56 (s, 2H); 7,65 (d, J = 4,4 Hz, 2H).

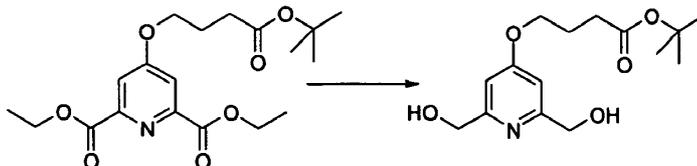
Éster metílico del ácido 4-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-butírico:



Se puede preparar éster metílico del ácido 4-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-butírico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-hidroximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico, empezando con éster terc-butílico del ácido 4-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-butírico : LC/MS (Método A3): ES : m/z 256 (M+H)⁺ TR = 0,25 min

5

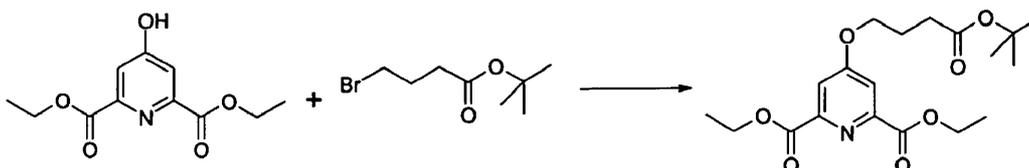
Éster terc-butílico del ácido 4-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-butírico:



Se puede preparar éster terc-butílico del ácido 4-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-butírico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster terc-butílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etoxi]etoxi}-etoxi)-propiónico, empezando con éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonil-propoxi)-piridin-2,6-dicarboxílico: LC/MS (Método A4): ES : m/z 298 (M+H)⁺ ; m/z 156 (M-C₈H₁₄O₂+H)⁺; TR = 2,45 min

10

Éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonil-propoxi)-piridin-2,6-dicarboxílico

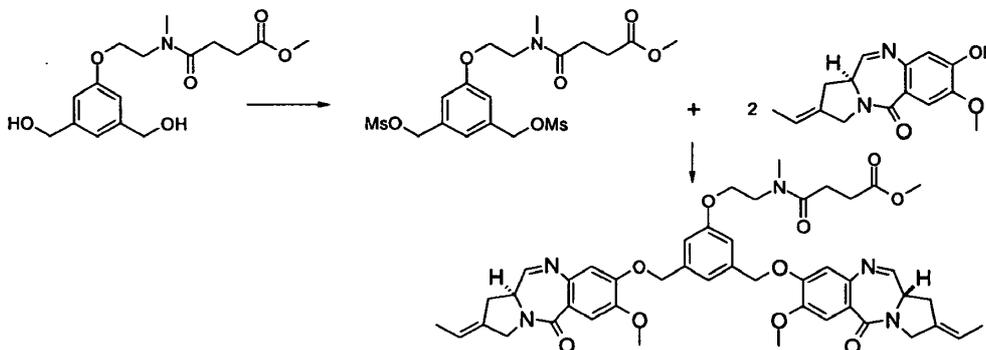


Se puede preparar éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonil-propoxi)piridin-2,6-dicarboxílico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonil-etoxi)-etoxi]etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dicarboxílico, empezando con éster terc-butílico del ácido 4-bromo-butírico : LC/MS (Método A4): ES : m/z 382 (M+H)⁺ m/z 404 (M+Na)⁺ m/z 785 (2M+Na)⁺ m/z 240 (M-C₈H₁₄O₂+H)⁺ TR = 4,65 min

15

Ejemplo 7 : Éster metílico del ácido N-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico :

20

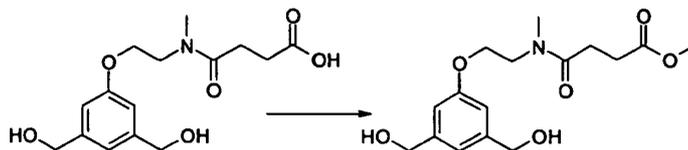


Se puede preparar éster metílico del ácido N-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etil]-N-metilsuccinámico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico, empezando con éster metílico del ácido N-[2-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico: LC/MS (Método A3): ES : m/z 834 (M+H)⁺ TR = 0,87 min ;

25

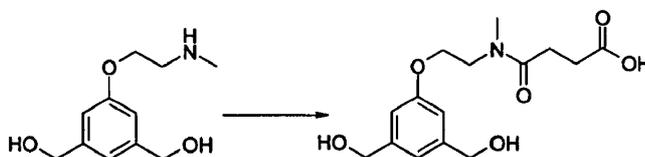
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃-d₁, δ ppm) : δ = 1,75 (d, J = 6,6 Hz, 6H) ; 2,54 - 3,21 (m, 11 H) ; 3,61 - 4,17 (m, 6 H) ; 3,69 (s, 3H) ; 3,97 (s, 6H) ; 4,27 (m, 4 H) ; 5,10 - 5,21 (m, 4 H) ; 5,61 (m, 2H) ; 6,82 (s, 2H) ; 6,91 - 6,95 (m, 2 H) ; 7,06 - 7,12 (m, 1 H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,63 (d, J = 4,4 Hz, 2H).

Se puede preparar éster metílico del ácido N-[2-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico como sigue :



- 5 A una disolución enfriada (0°C) de ácido N-[2-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico (225 mg) en metanol (1 ml), se añadió (trimetilsilil)diazometano 2 M en hexanos (840 µl) hasta persistencia del color amarillo. Después de 40 min, se añadieron acetato de etilo (5 ml) y ácido acético (50 µl); después, un minuto más tarde, una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio hasta pH=7. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash 25 g, Si60 15-40 µm), usando elución en gradiente con una mezcla de DCM (A)/MeOH (B), (gradiente : 98% de A: 2% de B disminuyendo hasta 90% de A: 10% de B) para dar éster metílico del ácido N-[2-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico (103 mg). LC/MS (Método A3): ES : m/z 348 (M+Na)⁺; m/z 326 (M+H)⁺; m/z 308 (M-H₂O+H)⁺; TR = 0,43 min

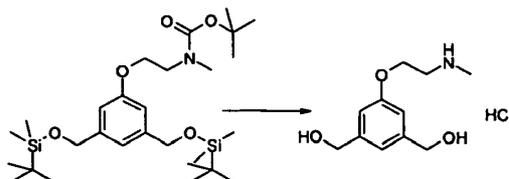
Se puede preparar ácido N-[2-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico como sigue :



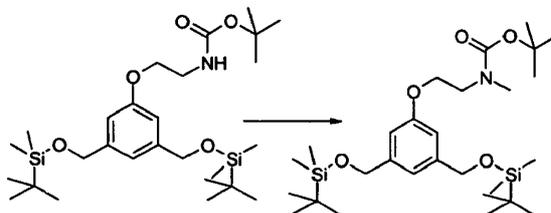
- 15 Se puede preparar ácido N-[2-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico siguiendo el procedimiento para la preparación de ácido N-[2-(3,5-Bis-hidroximetil-fenoxi)-etil]-succinámico, empezando con 3,5-Bis-hidroximetil-(2-metilamino-etoxi)-benceno: LC/MS (Método A3):

ES : m/z 312 (M+H)⁺; m/z 294 (M-H₂O+H)⁺; m/z 310 (M-H)⁻; TR = 0,35 min

Hidrocloruro de 3,5-Bis-hidroximetil-(2-metilamino-etoxi)-benceno



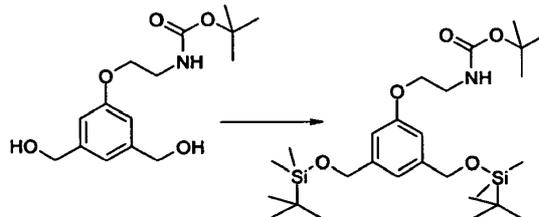
- 20 A una disolución de 1-(2-(terc-butoxicarbonil)-metilamino-etoxi)-3,5-bis-(terc-butil-dimetil-sililoxi metil)-benceno (590 mg) en dioxano (4 ml) se añadió una disolución de ácido clorhídrico 4 N en dioxano (3,3 ml). Después de 15 h a ta, se filtró el sólido resultante, se lavó con dioxano y se secó a vacío para dar hidrocloreto de 3,5-bis-hidroximetil-(2-metilamino-etoxi)-benceno (240 mg) como un polvo blanco. LC/MS (Método A2): ES : m/z 212 (M+H)⁺; TR = 0,14 min Se puede preparar 1-(2-(terc-butoxicarbonil)-metilamino-etoxi)-3,5-bis-(terc-butil-dimetil-sililoxi metil)-benceno como sigue :



- 30 A una disolución de 1-(2-(terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-3,5-bis-(terc-butil-dimetil-sililoximetil)-benceno (270 mg) en tetrahidrofurano (5 ml) se añadió yodometano (70 µl) y se enfrió la mezcla de reacción (0°C). A la disolución enfriada, se añadió hidruro de sodio (68 mg). Después de 1 hora, se permitió que la temperatura se calentara hasta temperatura ambiente. Después de 16 horas, se añadió suavemente una mezcla de THF y agua 1:1 (2 ml), después ácido cítrico hasta pH=2. La fase acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck

SuperVarioFlash 25 g, Si60 15-40 μ m), usando elución en gradiente con una mezcla de heptano (A) / acetato de etilo (B), (gradiente: 100% de A disminuyendo hasta 85% de A: 15% de B) para dar 1-(2-(terc-butoxicarbonil)-metilamino-etoxi)-3,5-bis-(terc-butil-dimetil-sililoxi metil)-benceno (220 mg) : LC/MS (Método A2): ES : m/z 562 (M+Na)⁺ ; m/z 308 (M+H- C₅H₈O₂ OSiC₆H₁₆)⁺ ; TR = 1,50 min

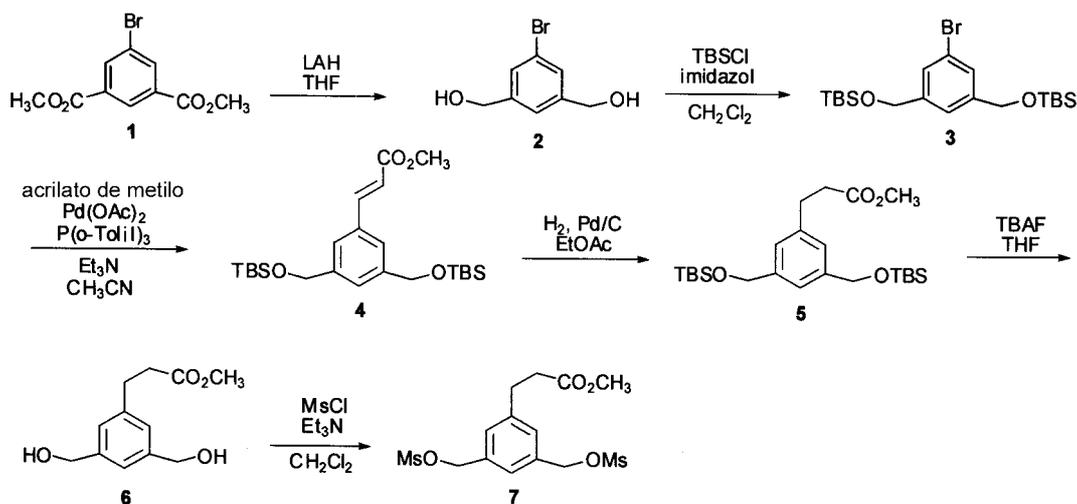
- 5 Se puede preparar 1-(2-(terc-butoxicarbonil)-amino-etoxi)-3,5-bis-(terc-butil-dimetil-sililoxi metil)-benceno como sigue :



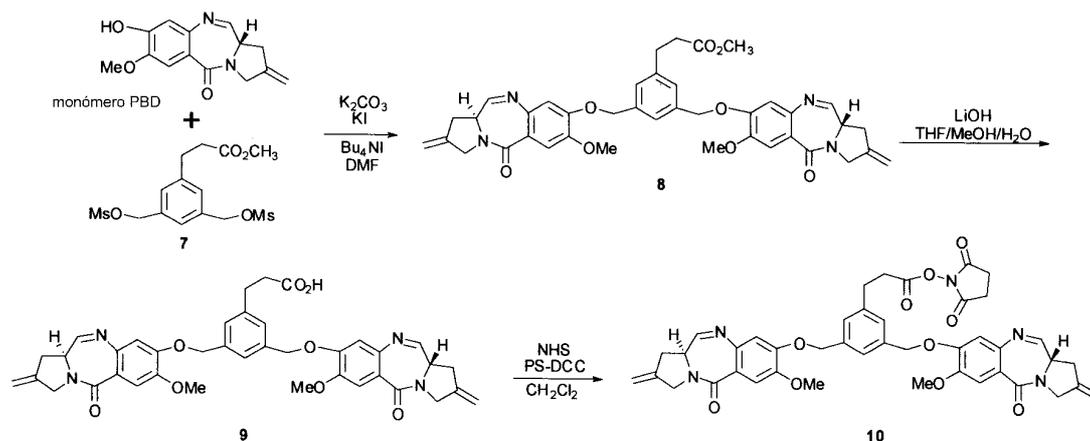
- 10 A una disolución enfriada (0°C) de 1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (600 mg) en DMF (8 ml) se le añadió terc-butildimetilclorosilano (913 mg) y trietilamina (936 μ l). Después de 18 horas, se añadió agua y se extrajo la fase acuosa dos veces con acetato de etilo. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a vacío para dar 1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etoxi)-3,5-bis-(terc-butil-dimetil-sililoxi metil)-benceno (1 g): LC/MS (Método A2): ES : m/z 548 (M+Na)⁺ ; m/z 294 (M+H- C₅H₈O₂ -OSiC₆H₁₆)⁺ ; TR = 1,45 min

Ejemplo 8: Éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-metiliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló [2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenil)-propanoico, compuesto 10

- 15 **Esquema 1**



Esquema 2



5 Compuesto **2**: A una suspensión de hidruro de litio y aluminio (2,19 g; 54,8 mmoles) en THF anhidro (50 ml) se añadió disolución de 5-bromoisoftalato de dimetilo (9,98 g; 36,5 mmoles) en THF (100 ml) a 0°C, durante un periodo de 1 h. Después de terminar la adición, se agitó la mezcla a ta durante 2 h. En ese tiempo, se añadieron 150 ml de THF. Se volvió a enfriar la mezcla a 0°C y se enfrió rápidamente con NaCl acuoso saturado. Se separó por filtración el precipitado blanco y se lavó además el sólido con THF extra (100 ml). Se secó la disolución de THF combinada con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. La purificación adicional con cromatografía por desorción súbita sobre gel de sílice (95:5 CH_2Cl_2/CH_3OH) proporcionó **2** como un sólido blanco (7,42 g; 95%).

15 Compuesto **3**: Se suspendió compuesto **2** (3,36 g; 15,5 mmoles) en CH_2Cl_2 anhidro (31 ml). Se añadió TBSCl (5,14 g; 34,1 mmoles), seguido por imidazol (3,16 g; 46,5 mmoles). Se agitó la mezcla a ta durante 1 h. Se separó por filtración el precipitado blanco y se concentró el líquido filtrado con rotavapor. Se purificó el residuo resultante por cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, 97:3 hexanos/EtOAc) para dar **3** como aceite incoloro (6,15 g; 89%): 1H R.M.N. (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,081 (s, 12H), 0,92 (s, 18H), 4,67 (s, 4H), 7,18 (s, 1H), 7,31 (s, 2H).

20 Compuesto **4**: Un matraz que contiene compuesto **3** (4,16 g; 9,36 mmoles), acrilato de metilo (1,3 ml; 14,0 mmoles), $Pd(OAc)_2$ (105 mg; 0,47 mmoles); $P(o-tolil)_3$ (285 mg; 0,94 mmoles) y Et_3N (9 ml) en 19 ml de CH_3CN se calentó para hacerlo hervir a reflujo en atmósfera de argón, durante 16 h. Después de enfriar a ta, se añadió H_2O de hielo (20 ml). Se extrajo la mezcla con EtOAc (3x40 ml). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con HCl 1 N, salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. La purificación adicional del residuo con cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, hexanos/EtOAc 97:3) para dar **4** como aceite incoloro (3,91 g; 93%):

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,089 (s, 12H); 0,93 (s, 18H); 3,79 (s, 3H); 4,72 (s, 4H); 6,41 (d, J = 16 Hz, 1H); 7,29 (s, 1H); 7,34 (s, 2H); 7,68 (d, J = 16 Hz, 1H). EIMS m/z 473 ($[M]^+ + Na$).

25 Compuesto **5**: Se hidrogenó la mezcla de **4** (2,54 g; 5,63 mmoles) y Pd/C (563 mg) en 55 ml de EtOAc a presión atmosférica, durante 30 min. Después se hizo pasar la disolución por celite, se lavó el sólido con EtOAc extra (25 ml). Se concentraron las disoluciones de EtOAc combinadas para proporcionar **5** como aceite incoloro (2,55 g; 99+%), que es suficientemente puro para la siguiente etapa.

RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 0,067 (s, 12H); 0,91 (s, 18H); 2,60 (t, J = 8,0 Hz, 2H); 2,92 (t, J = 8,0 Hz, 2H); 3,65 (s, 3H); 4,68 (s, 4H); 7,00 (s, 2H); 7,12 (s, 1H). EIMS m/z 475 ($[M]^+ + Na$).

30 Compuesto **6**: A una disolución de **5** (1,48 g; 3,28 mmoles) en THF anhidro (33 ml) se añadieron 8,2 ml de disolución 1 M de TBAF en THF, a 0°C. Después de agitar a esta temperatura durante 1 h, se añadió NH_4Cl acuoso saturado (30 ml) a la mezcla. Se extrajo la mezcla con EtOAc (3x40 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. La purificación adicional del residuo por cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, DCM/ CH_3OH 95:5) da **6** como aceite incoloro (625 mg; 85%), que se solidifica después de dejarlo reposar en el refrigerador.

35 RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 2,59 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 2,91 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,63 (s, 3H), 4,61 (s, 4H), 7,08 (s, 2H), 7,16 (s, 1H).

Compuesto **7**: Se disolvió el diol **6** (59 mg; 0,26 mmoles) en DCM (2,6 ml). Se enfrió la disolución a 0°C y se trató con Et₃N (82 µl; 0,58 mmoles) y MsCl (46 µl; 0,58 mmoles). Se agitó la mezcla a 0°C durante 30 min y se enfrió rápidamente con H₂O de hielo (2 ml). Se separaron las capas y se extrajo además la capa acuosa con DCM (3x2 ml). Se lavaron con salmuera las capas de DCM combinadas, se secó con Na₂SO₄ y se concentró. Además secado con bomba de alto vacío proporcionó **7** como aceite amarillo pálido, que se usó inmediatamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

5

Compuesto **8**: A una mezcla de monómero de PBD (165 mg; 0,64 mmoles) y **7** (se asume que es 0,26 mmoles) en DMF (2,7 ml) se añadió K₂CO₃ (147 mg; 1,06 mmoles), KI (22 mg; 0,13 mmoles) y Bu₄Ni (49 mg; 0,13 mmoles) secuencialmente. Se agitó la mezcla en argón a ta, durante 7 h. Después se retiró DMF con alto vacío. Se repartió el residuo entre DCM y agua y se separaron las capas. La capa acuosa se extrajo además con DCM (3x3 ml). Las capas de DCM combinadas se lavaron con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación del residuo con cromatografía sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 25:1) proporcionó **8** como sólido similar a vidrio amarillo pálido (101 mg; 54%). EIMS m/z 763 ([M]⁺+Na+2H₂O), 745 ([M]⁺+Na+H₂O), 727 ([M]⁺+Na).

10

Compuesto **9**: A una disolución agitada de éster **8** metílico (16 mg; 0,023 mmoles) en THF-MeOH-H₂O (3:1:1; 0,45 ml) se añadió LiOH ac. 1 M (0,025 ml; 1,1 eq.) a ta y se controló la reacción por TLC. Después de 3,5 h, se diluyó la mezcla con H₂O (5 ml) y se ajustó el pH a 2 con HCl 1 N. Después se extrajo la mezcla con DCM (3 X 5 ml). Las capas de DCM combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. La purificación adicional por cromatografía por desorción súbita sobre gel de sílice (DCM:MeOH:AcOH = 100:4:0,5) proporcionó el ácido **9** deseado (8,2 mg; 60% brsm); EIMS m/z 749 ([M]⁺+Na+2H₂O); 731 ([M]⁺+Na+H₂O); 713 ([M]⁺+Na); más una pequeña cantidad (~ 2 mg) de éster **8** metílico.

15

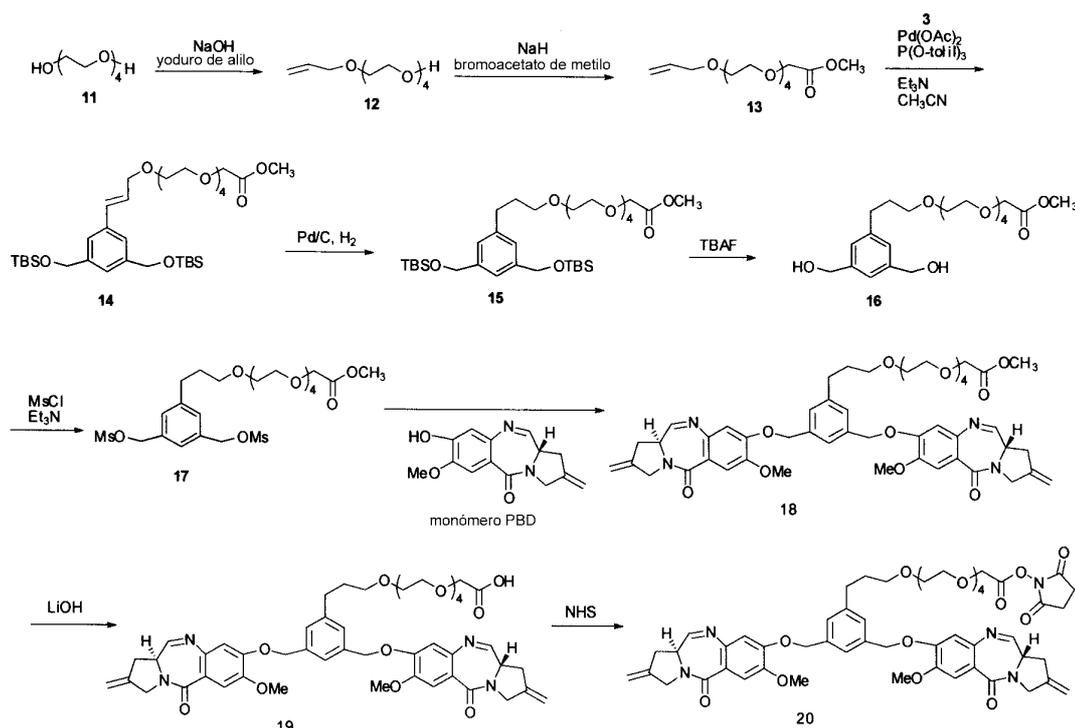
20

Compuesto **10**: A una disolución de ácido **9** (8,2 mg; 0,011 mmoles) en CH₂Cl₂ (1 ml) se añadieron poli-DCC (38 mg; 0,059 mmoles) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (2,7 mg; 0,024 mmoles). Se agitó la mezcla a ta, durante 2 h, después se filtró por un pequeño lecho de celite, se lavó con DCM, se concentró. Se purificó el residuo resultante por cromatografía por desorción súbita (DCM:MeOH/100:3) para proporcionar el producto **10** deseado (7 mg; 81 %). EIMS m/z 874 ([M]⁺+Na+2MeOH); 842 ([M]⁺+Na+MeOH); 810 ([M]⁺+Na).

25

Ejemplo 9 : Éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido (2-{2-[2-(2-{3-[3,5-Bis-(7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1.2-a][1.4]diazepin-8-iloximetil]-fenil]-propoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-acético, compuesto 20

Esquema 3



30

Compuesto **12**: Se añadió NaOH acuoso (50%; 6,9 ml) a tetraetilenglicol (68,08 g; 350 mmoles). Se agitó la mezcla a ta, durante 2 h, seguido por adición de yoduro de alilo (8 ml; 87,6 mmoles). Después de agitar durante otras 24 h, se repartió la mezcla entre H₂O y EtOAc (50/50 ml). La capa acuosa se extrajo además con EtOAc (5 x30 ml). Se

secaron las capas de EtOAc combinadas sobre Na₂SO₄ y se concentró. La cromatografía por desorción súbita del residuo (gel de sílice, hexanos:EtOAc 4:6 a 0:1) proporcionó **12** como aceite incoloro:

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ= 2,44 (a s, 1H); 3,63 – 3,71 (m, 16H); 3,99 – 4,01 (m, 2H); 5,13 – 5,17 (m, 1H); 5,22 – 5,27 (m, 1H); 5,84 – 5,92 (m, 1H); ¹³C R.M.N. δ 61,8, 69,4, 70,4, 70,59, 70,61, 70,63, 72,2, 72,5, 117,0, 134,8. EIMS m/z 257 ([M]⁺+Na).

Compuesto **13**: A una suspensión de NaH (89 mg; 2,2 mmoles) en THF anhidro (2,5 ml) se le añade una disolución de **12** (370 mg; 1,58 mmoles) en THF (5 ml) a 0°C, en argón. Se agitó la mezcla a esta temperatura durante 30 min, después ta durante otros 30 min. Se volvió a enfriar la mezcla a 0°C y se añadió gota a gota bromoacetato de metilo (0,29 ml; 3,16 mmoles) gota a gota. Después de agitar a 0°C durante 1 h, se retiró el baño de hielo y se continuó la agitación durante otras 24 h, a ta. La mezcla se filtró a través de celite y se concentró el líquido filtrado. La purificación adicional del residuo con cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, hexanos/EtOAc 1:1) dio **13** como aceite amarillo pálido (220 mg):

RMN de ¹H. (400 MHz, CDCl₃) δ= 3,57 - 3,74 (m, 19H), 3,98 - 4,0 (m, 2H), 4,26 (s, 2H), 5,15 (d, J = 10,4Hz, 1H), 5,24 (dd, J = 16, 1,6Hz, 1H), 5,84 - 5,93 (m, 1H); ¹³C N MR δ= 51,7, 68,6, 69,4, 70,56, 70,60, 70,62, 70,9, 72,2, 117,0, 134,8, 170,9. EIMS m/z 329 ([M]⁺+Na).

Compuesto **14**: Se calentó para hacer hervir a reflujo un matraz que contiene compuesto **3** (1,30 g; 2,92 mmoles), **13** (0,986 g; 3,220 mmoles), Pd(OAc)₂ (33 mg; 0,15 mmoles), P(o-tolil)₃ (89 mg; 0,29 mmoles) y Et₃N (2 ml) en 30 ml de CH₃CN en atmósfera de argón, durante 12 h. Después de enfriar a ta, se retiró el acetonitrilo por evaporación y se añadió acetato de etilo (40 ml) y se hizo pasar la mezcla por celite, se enjuagó con acetato de etilo y se concentró. La purificación adicional del residuo con cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, hexanos/EtOAc 6:4) para dar **14** (1,02 g) como aceite incoloro.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ= 0,076 (s, 12H), 0,92 (s, 18H), 3,61 - 3,72 (m, 19H), 4,14 (s, 2H), 4,15 - 4,17 (m, 2H), 4,69 (s, 4H), 6,23 - 6,28 (m, 1H), 6,57 (d, J = 16,0Hz, 1H), 7,16(s, 1H), 7,19 (s, 2H); ¹³C R.M.N. δ= -5,2, 14,2, 18,4, 26,0, 51,7, 64,9, 68,6, 69,4, 70,57, 70,61, 70,64, 70,7, 70,9, 71,9, 122,8, 123,2, 125,9, 132,8, 136,5, 141,7,170,9. EIMS m/z 693 ([M]⁺+Na).

Compuesto **15**: Se hidrogenó una mezcla de **14** (0,062 g; 0,092 mmoles) y Pd/C (9 mg) en 2,5 ml de EtOAc a presión atmosférica, durante 30 min. Después se hizo pasar la disolución por celite, se lavó el sólido con EtOAc extra (10 ml). Se concentraron las disoluciones de EtOAc combinadas para proporcionar **15** como aceite incoloro que se usó sin purificación adicional.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ= 0,072 (s, 12H), 0,92 (s, 18H), 1,87 - 1,89 (m, 2H), 2,64 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,43 - 3,70 (m, 21H), 4,14 (s, 2H), 4,68 (s, 4H), 6,98 (s, 2H), 7,10 (s, 1H). EIMS m/z 695 ([M]⁺+Na).

Compuesto **16**: A una disolución de **15** de la etapa previa en THF anhidro (1,8 ml) se añadieron 0,23 ml de disolución 1 M de TBAF en THF, a 0°C. Después de agitar a esta temperatura durante 1 h, se añadió a la mezcla NH₄Cl acuoso, saturado (2 ml). Se extrajo la mezcla con EtOAc (3x5 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. La purificación adicional del residuo con cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, CH₂Cl₂/CH₃OH 95:5) dio **16** como aceite incoloro (27 mg; 85%).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ= 1,86 - 1,89 (m, 2H), 2,66 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,40 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,50 - 3,70 (m, 19H), 4,10 (s, 2H), 4,61 (s, 4H), 7,09 (s, 2H), 7,13 (s, 1H). EIMS m/z 467 ([M]⁺+Na).

Compuesto **17**: Se disolvió el diol **16** (26,8 mg; 0,06 mmoles) en DCM (1,2 ml). Se enfrió la disolución a 0°C y se trató con Et₃N (18,5 µl, 0,13 mmoles) y MsCl (10,3 µl, 0,13 mmoles). Se agitó la mezcla a 0°C durante 30 min y se enfrió rápidamente con H₂O de hielo (2 ml). Se separaron las capas y se extrajo además la capa acuosa con DCM (3x2 ml). Se lavaron con salmuera las capas de DCM combinadas, se secó con Na₂SO₄ y se concentró. Secado además en bomba de alto vacío proporcionó **17** como aceite amarillo pálido, que se usó inmediatamente para la etapa siguiente sin purificación adicional. EIMS m/z 623,1 ([M]⁺+Na).

Compuesto **18**: A una mezcla de monómero de PBD (40 mg; 0,15 mmoles) y **17** de la etapa previa en DMF (1,57 ml) se añadió K₂CO₃ (25 mg; 0,18 mmoles) y KI (10 mg; 0,06 mmoles) secuencialmente. Se agitó la mezcla en argón a ta, durante 20 h. Después se retiró DMF con alto vacío. Se repartió el residuo entre DCM y agua y se separaron las capas. La capa acuosa se extrajo además con DCM (3x3 ml). Las capas de DCM combinadas se lavaron con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación del residuo con cromatografía sobre gel de sílice (DCM/CH₃OH, 25:1) proporcionó **18** como sólido parecido a cristal amarillo pálido. EIMS m/z 1011,5 ([M]⁺+Na+2CH₃OH); 979,5 ([M]⁺+Na+CH₃OH); 947,5 ([M]⁺+Na).

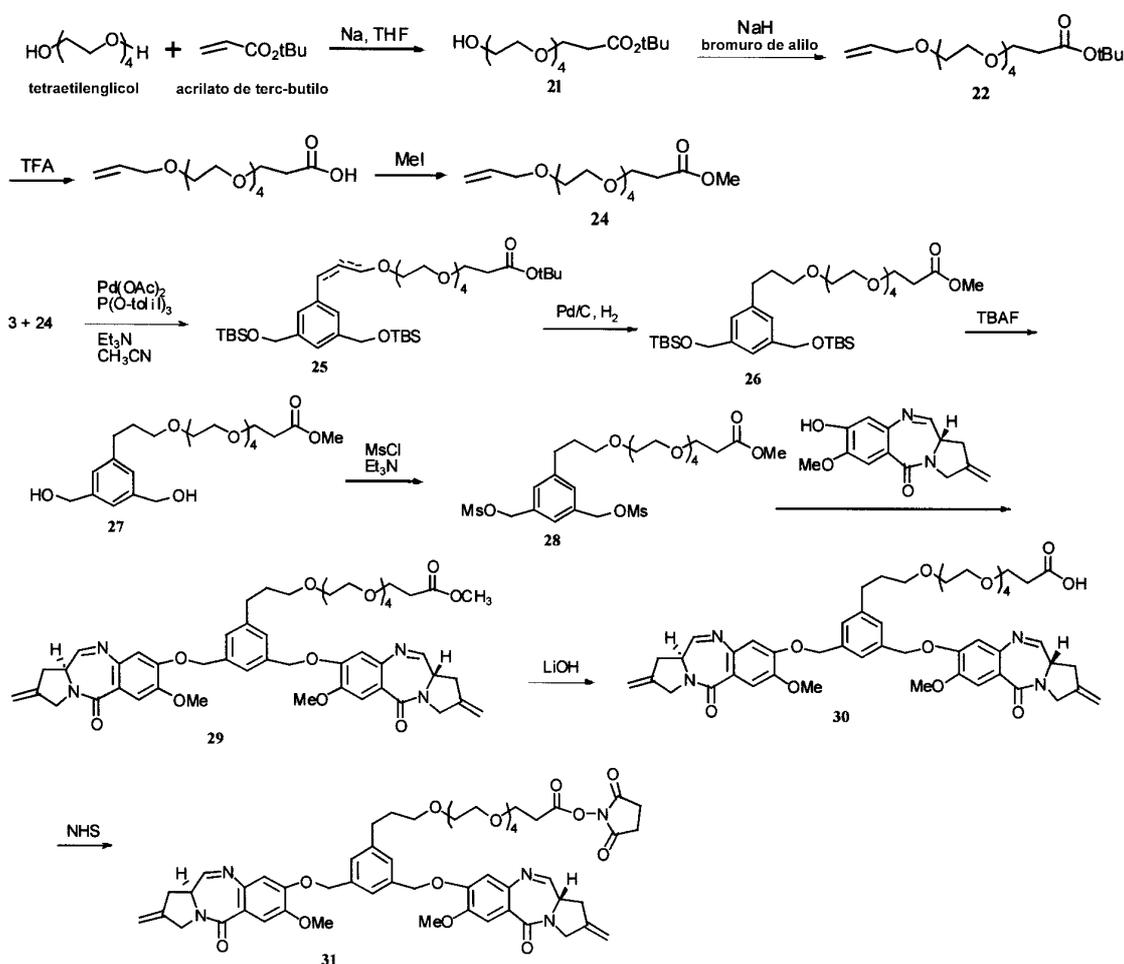
Compuesto **19**: A una disolución agitada de éster **18** metílico (16 mg; 0,017 mmoles) en THF-MeOH-H₂O (3:1:1; 0,7 ml) se añadió LiOH ac. 1 M (0,019 ml; 1,1 eq.) a ta y se controló la reacción por TLC (cromatografía de capa fina). Después de 5 h, se diluyó la mezcla con H₂O (5 ml) y se ajustó el pH a 2 con HCl 1 N. Después se extrajo la mezcla con DCM (3x5 ml). Las capas de DCM combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró.

Purificado además por cromatografía por desorción súbita sobre gel de sílice (DCM:MeOH:AcOH = 100:4:0,5) proporcionó el ácido **19** deseado. EIMS m/z 933,4 ($[M]^+ + Na$)

5 Compuesto **20**: A una disolución de ácido **19** (5,9 mg; 0,006 mmoles) en CH_2Cl_2 (1,0 ml) se añadieron EDC (2 mg; 0,0097 mmoles) y NHS (1,0 mg; 0,0084 mmoles). Se agitó la mezcla a ta, durante 3 h, después se filtró por un pequeño lecho de celite, se lavó con DCM y se concentró para proporcionar el producto **10** deseado que se usó sin purificación adicional ya que se encontró que el material se descomponía con la purificación con sílice. EIMS m/z 1030,4 ($[M]^+ + Na$).

10 **Ejemplo 10 : Éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido (3-{2-[2-(2-{3-[3,5-Bis-(7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1.2-a][1.4]diazepin-8-ioximetil]-fenil]-propoxi}-etoxi)etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico, compuesto **31****

Esquema 4



15 Compuesto **21**: A una disolución de tetraetilenglicol (162 ml, 940 mmoles) en THF anhidro (500 ml) se añadió sodio (215 mg; 9,4 mmoles). Cuando se disolvió el sodio, se añadió acrilato de terc-butilo (45 ml, 310 mmoles). Se agitó la mezcla durante 20 h, a ta y se neutralizó con 8 ml de HCl 1 N. Después de retirar el disolvente, se repartió el residuo entre salmuera y EtOAc. La capa acuosa se extrajo además con EtOAc. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. Se purificó el residuo resultante por cromatografía por desorción súbita sobre gel de sílice (hexanos:acetato de etilo= 4:6) proporcionando el éster **21** deseado.

20 RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 1,41 (s, 9H), 2,34 (br. S, 1H); 2,47 (t, J = 6,4Hz, 2H); 3,56 – 3,71 (m, 18H). EIMS m/z 345 ($[M]^+ + Na$).

Compuesto **22**: A una disolución de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (1,27 g; 3,75 mmoles) y NaOH (225 mg; 5,63 mmoles) en H_2O (7 ml) se añadió una mezcla de **21** (1,20 g; 3,75 mmoles) y bromuro de alilo (0,48 ml; 5,63

- mmoles) en DCM (14 ml). Se agitó vigorosamente el sistema de dos fases durante 45 min. Se separó la capa acuosa y se extrajo tres veces con DCM. Se concentraron las capas de DCM combinadas. La adición de Et₂O (15 ml) dio como resultado precipitación de bromuro de tetrabutilamonio que se separó por filtración. El líquido filtrado se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. La purificación adicional del residuo con cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, hexanos/EtOAc 1:1) dio **22** como aceite incoloro.
- 5 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃) δ= 1,42 (s, 9H), 2,47 (t, J = 6,4Hz, 2H), 3,56 - 3,70 (m, 18H), 4,00 (m, 2H), 5,15 (dq, J = 6,0, 1,2Hz, 1H), 5,25 (dq, J = 16, 1,6Hz, 1H), 5,84 - 5,94 (m, 1H). EIMS m/z 385,2 ([M]⁺+Na).
- Compuesto **23**: Se agitó una disolución de compuesto **22** (478 mg; 1,32 mmoles) en ácido trifluoroacético (9 ml) a ta, durante 1,5 h, en ese tiempo se consumió todo el material de partida. Se retiró TFA a vacío y se secó además el residuo con ayuda de tolueno. El producto bruto se usó directamente en la etapa siguiente.
- 10 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃) δ= 2,60 (t, J = 6,0Hz, 2H), 3,56 - 3,70 (m, 18H), 4,01 (d, J = 5,6Hz, 2H), 5,16 (dd, J = 6,4, 1,2Hz, 1H), 5,25 (dd, J = 16, 1,6Hz, 1H), 5,84 - 5,94 (m, 1H). EIMS m/z 329,2 ([M]⁺+Na).
- Compuesto **24**: La disolución de ácido **23** en DMF (6,6 ml) se trató con Cs₂CO₃ (451 mg; 1,38 mmoles) y MeI (90 µl; 1,45 mmoles). Se agitó la mezcla a ta, durante 2 h. Después se evaporó DMF a alto vacío. Se suspendió el residuo en EtOAc y se separó por filtración el sólido. El filtrado se concentró. La purificación adicional del residuo con cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, hexanos/EtOAc 97:3) dio **24** como aceite incoloro.
- 15 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃) δ= 2,58 (t, J = 6,4Hz, 2H), 3,56 - 3,70 (m, 18H), 4,00 (d, J = 5,6Hz, 2H), 5,14 (dd, J = 6,4, 1,2Hz, 1H), 5,24 (dd, J = 16, 1,6Hz, 1H), 5,84 - 5,94 (m, 1H). EIMS m/z 343,2 ([M]⁺+Na).
- Compuesto **25**: Se calentó para hacer hervir a reflujo un matraz que contiene compuesto **3** (0,066 g; 0,15 mmoles), **24** (0,05 g; 0,16 mmoles), Pd(OAc)₂ (1,7 mg; 0,0074 mmoles), P(o-tolil)₃ (4,5 mg; 0,015 mmoles) y Et₃N (0,1 ml) en 3 ml de CH₃CN en atmósfera de argón, durante 8 h. Después de enfriar a ta, se retiró el acetonitrilo por evaporación y se añadió acetato de etilo (40 ml) y se hizo pasar la mezcla por celite, se enjuagó con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se concentró. La purificación adicional del residuo con cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, hexanos/EtOAc 6:4) para dar **25** como aceite incoloro:
- 20 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃) δ= 0,076 (s, 12H), 0,92 (s, 18H), 2,57 (t, J = 6,4Hz, 2H), 3,57 - 3,68 (m, 20H), 3,73 (t, J = 6,4Hz, 2H), 4,14 (d, J = 6,0Hz, 2H), 4,69 (s, 4H), 6,23 - 6,29 (m, 1H), 6,56 (d, J = 16,0Hz, 1H), 7,16 (s, 2H), 7,19 (s, 1H). EIMS m/z 707,4 ([M]⁺+Na).
- Compuesto **26**: Se hidrogenó una mezcla de **25** (0,216 g; 0,31 mmoles) y Pd/C (32 mg) en 6,3 ml de EtOAc, a presión atmosférica, durante 30 min. Después se hizo pasar la disolución por celite, se lavó el sólido con EtOAc extra (10 ml). Se concentraron las disoluciones de EtOAc combinadas para proporcionar **26** como aceite incoloro que se usó sin purificación adicional.
- 30 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃) δ= 0,071 (s, 12H), 0,91 (s, 18H), 1,87 (m, 2H), 2,58 (t, J = 6,4Hz, 2H), 2,64 (t, 2H), 3,44 (t, J = 6,4Hz, 2H), 3,54 - 3,67 (m, 20H), 3,72 (t, J = 6,4Hz, 2H), 4,68 (s, 4H), 6,98 (s, 2H), 7,10 (s, 1H). EIMS m/z 709,4 ([M]⁺+Na).
- Compuesto **27**: A una disolución de **26** de la etapa previa en THF anhidro (3 ml) se añadieron 0,38 ml de disolución 1 M de TBAF en THF, a 0°C. Después de agitar a esta temperatura durante 1 h, se añadió NH₄Cl acuoso saturado (2 ml) a la mezcla. Se extrajo la mezcla con EtOAc (3 x5 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. La purificación adicional del residuo por cromatografía por desorción súbita (gel de sílice, CH₂Cl₂/CH₃OH 95:5) da **27** como aceite incoloro.
- 40 RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃) δ= 1,87 (m, 2H), 2,56 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,69 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 3,42 (t, J = 6,4Hz, 2H), 3,54 - 3,67 (m, 20H), 3,70 (t, J = 6,4Hz, 2H), 4,64 (s, 4H), 7,12 (s, 2H), 7,16 (s, 1H). EIMS m/z 481,3 ([M]⁺+Na).
- Compuesto **28**: Se disolvió el diol **27** (54 mg; 0,126 mmoles) en DCM (2,4 ml). Se enfrió la disolución a 0°C y se trató con Et₃N (41 µl, 0,29 mmoles) y MsCl (23 µl, 0,29 mmoles). Se agitó la mezcla a 0°C durante 30 min y se enfrió rápidamente con H₂O de hielo (2 ml). Se separaron las capas y se extrajo además la capa acuosa con CH₂Cl₂ (3x2 ml). Se lavaron con salmuera las capas de DCM combinadas, se secó con Na₂SO₄ y se concentró. Además secado con bomba de alto vacío proporcionó **28** como aceite amarillo pálido, que se usó inmediatamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. EIMS m/z 637,2 ([M]⁺+Na).
- 45 Compuesto **29**: A una mezcla de monómero de PBD (76 mg, 0,29 mmoles) y **28** de la etapa previa en DMF (2,9 ml) se añadió K₂CO₃ (49 mg, 0,35 mmoles) y KI (20 mg, 0,12 mmoles) secuencialmente. Se agitó la mezcla en argón a ta, durante 20 h. Después se retiró DMF con alto vacío. Se repartió el residuo entre DCM y agua y se separaron las capas. La capa acuosa se extrajo además con DCM (3x3 ml). Las capas de DCM combinadas se lavaron con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró. La purificación del residuo con cromatografía sobre gel de sílice (DCM/CH₃OH, 100:3) proporcionó **29** como sólido parecido a cristal amarillo pálido. EIMS m/z 1.025,6 ([M]⁺+Na+2CH₃OH); 993,5 ([M]⁺+Na+CH₃OH); 961,5 ([M]⁺+Na).
- 50
- 55

Compuesto **30**: A una disolución agitada de éster **29** metílico (11,8 mg; 0,012 mmoles) en THF-MeOH-H₂O (3:1:1; 0,5 ml) se añadió LiOH ac. 1 M (0,014 ml; 1,1 eq.) a ta y se controló la reacción por TLC. Después de 5 h, se enfrió rápidamente la mezcla con AcOH (0,014 mmoles) y se evaporaron los volátiles. Purificado además por cromatografía por desorción súbita sobre gel de sílice (DCM:MeOH:AcOH = 95:5) proporcionó el ácido **30** deseado. EIMS m/z 947,5 ([M]⁺+Na)

Compuesto **31**: A una disolución de ácido **30** (4,6 mg; 0,005 mmoles) en DCM (1,0 ml) se añadieron EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) como agente de acoplamiento (1,4 mg; 0,0075 mmoles) y NHS (0,74 mg; 0,0065 mmoles). Se agitó la mezcla a ta, durante la noche, después se filtró por un pequeño lecho de celite, se lavó con DCM y se concentró para proporcionar el producto **31** deseado. Purificado además por cromatografía por desorción súbita sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 100:3) proporcionó el éster **31** de NHS deseado. EIMS m/z 1.022,5 ([M]⁺+Na)

Ejemplo 11 : conjugado huMy9-6 - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butirilo

Se tratan 1,45 ml de una disolución de anticuerpo huMy9-6 a una concentración de 6,4 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato de potasio 0,05 M y cloruro de sodio 0,05 M, pH 8, con un exceso molar de 7,5 veces de una disolución 9,5 mM de éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico del ejemplo 1 en dimetilacetamida (DMA) tal que la concentración final de huMY9-6 es 5 mg/ml y la concentración de DMA en el tampón es 20 %. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente, durante 195 min., se filtró sobre Millex^R-HV 0,45 µm (PVDF Durapore Millipore #SLHV013SL) y después se cargó en una columna de filtración de gel de grado prep SuperdexTM 200 (Columna HiloadTM 16/60 GE# 17-1069-01) que se ha equilibrado previamente en un tampón acuoso que contiene fosfato 0,010 M, cloruro de sodio 0,140 M, pH 6,5. Se recogen las fracciones que contienen anticuerpo conjugado, se mezcló y se concentró sobre Vivaspin 2 (10.000 MWCO HY Sartorius #VS02H02) para proporcionar producto (1,8 ml). Se analizó el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico ($\epsilon_{319nm} = 9087 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280nm} = 12166 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo hu2H11 ($\epsilon_{280nm} = 206,539 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 2,1 restos de 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butirilo por molécula de anticuerpo (1,6 mg/ml).

Ejemplo 12 : conjugado huB4- 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butirilo

Se trata 3,4 ml de una disolución de anticuerpo huB4 a una concentración de 8 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato de potasio 0,05 M y cloruro de sodio 0,05 M, pH 8, con un exceso molar de 8 veces de una disolución 11,5 mM de éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloxi metil]-fenoxi)-butírico del ejemplo 1 en DMA tal que la concentración final de huB4 sea 5,6 mg/ml y la concentración de DMA en el tampón sea 20 %. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente, durante 3 h, se filtró sobre Millex^R-HV 0,45 µm (PVDF Durapore Millipore #SLHV013SL) y después se cargó en una columna de filtración de gel de grado prep SuperdexTM 200 (Columna HiloadTM 16/60 GE# 17-1069-01) que se ha equilibrado previamente en un tampón acuoso que contiene fosfato 0,010 M, cloruro de sodio 0,140 M, pH 6,5. Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo conjugado, se mezclaron y se concentró sobre Vivaspin 15R (10.000 MWCO HY Sartorius #VS02H02) para proporcionar producto (5 ml). Se analizó el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico ($\epsilon_{319nm} = 9087 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280nm} = 12166 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo huB4 ($\epsilon_{280nm} = 222,960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 4,48 restos de 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butirilo por molécula de anticuerpo (1,49 mg/ml).

Ejemplo 13 : conjugado hu2H11- 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butirilo

Se tratan 3,45 ml de una disolución de anticuerpo hu2H11 (véase la patente internacional WO 2008/010101 ; registrada por ATCC con el número de registro **PTA-7662**) a una concentración de 5,1 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato de potasio 0,05 M y cloruro de sodio 0,05 M, pH 8, con un exceso molar de 8 veces de una disolución 10,5 mM de éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloxi metil]-fenoxi)-butírico del ejemplo 1 en DMA tal que la concentración final de hu2H11 sea 4,3 mg/ml y la concentración de DMA en el tampón sea 20 %. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente, durante 3 h, se filtró sobre Millex^R-HV 0,45 µm (PVDF Durapore Millipore #SLHV013SL) y después se cargó en una columna de filtración de gel de grado prep SuperdexTM 200 (Columna HiloadTM 16/60 GE# 17-1069-01) que se ha equilibrado previamente en un tampón acuoso que contiene fosfato 0,010 M, cloruro de sodio 0,140 M, pH 6,5. Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo conjugado, se mezclaron y se concentró sobre Vivaspin 15R (10.000 MWCO HY Sartorius #VS02H02) para proporcionar producto

(2,2 ml). Se analizó el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico ($\epsilon_{319nm} = 9087 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280nm} = 12166 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo hu2H11 ($\epsilon_{280nm} = 208,380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 3,74 restos de 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butirilo por molécula de anticuerpo (1,55 mg/ml).

Ejemplo 14 : conjugado huMy9-6 - 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionilo

Se tratan 8,2 ml de una disolución de anticuerpo huMy9-6 a una concentración de 7,2 mg/ml en un tampón acuoso que contiene ácido N-(2-hidroxietil)-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 0,05 M; cloruro de sodio 0,05 M y ácido etilendiaminotetra-acético 2 mM (AEDT), pH 8, con un exceso molar de 10 veces de una disolución 10,4 mM de éster del ácido N-hidroxisuccinimidílico de 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico del ejemplo 3 en DMA tal que la concentración final de huMY9-6 es 3 mg/ml y la concentración de DMA en el tampón es 20%. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente, durante 3 h, se filtró sobre Millex^R-SV 5 μM (PVDF Durapore Millipore #SLSV025SL) y después se cargó en una columna de filtración de gel de grado prep SuperdexTM 200 (Columna HiloalTM 26/60 GE# 17-1071-01) que se ha equilibrado previamente en un tampón acuoso que contiene fosfato 0,010 M, cloruro de sodio 0,140 M, pH 6,5. Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo conjugado, se combinaron y se concentró sobre Amicon Ultra-15 (Ultracel 10k Millipore #UFC901024) para proporcionar producto (7 ml). Se analizó el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico ($\epsilon_{319nm} = 7566 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280nm} = 7078 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo huMy9-6 ($\epsilon_{280nm} = 206539 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 4,80 restos de 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionilo por molécula de anticuerpo (3,44 mg/ml).

Ejemplo 15 : conjugado hu2H11 - 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionilo

Se tratan 13,2 ml de una disolución de anticuerpo hu2H11 a una concentración de 4,7 mg/ml en un tampón acuoso que contiene ácido N-(2-hidroxietil)-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 0,05 M, cloruro de sodio 0,05 M y ácido etilendiaminotetra-acético (AEDT) 2 mM, pH 8, con glicofurol y un exceso molar de 10 veces de una disolución 10,6 mM de éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico del ejemplo 3 en DMA tal que la concentración final de hu2H11 es 3 mg/ml, la concentración de glicofurol en el tampón es 10% y la concentración de DMA en el tampón es 20 %. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente, durante 3 h, se filtró sobre Millex^R-SV 5 μM (PVDF Durapore Millipore #SLSV025SL) y después se cargó en una columna de filtración de gel de grado prep SuperdexTM 200 (Columna HiloalTM 26/60 GE# 17-1071-01) que se ha equilibrado previamente en un tampón acuoso que contiene fosfato 0,010 M, cloruro de sodio 0,140 M, pH 6,5. Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo conjugado, se combinaron y se concentró sobre Amicon Ultra-15 (Ultracel 10k Millipore #UFC901024) para proporcionar producto (3,6 ml). Se analizó el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico ($\epsilon_{319nm} = 7566 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280nm} = 7078 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo hu2H11 ($\epsilon_{280nm} = 208380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 4,08 restos de 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionilo por molécula de anticuerpo (1,33 mg/ml).

Ejemplo 16 : conjugado hu2H11- 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló [2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoilo

Se tratan 0,95 ml de una disolución de anticuerpo hu2H11 a una concentración de 3,2 mg/ml en un tampón acuoso que contenía fosfato de potasio 0,05 M y cloruro de sodio 0,05 M, pH 8, con un exceso molar de 8 veces de una disolución 10,5 mM de éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico del ejemplo 4 en DMA tal que la concentración final de hu2H11 es 2,5 mg/ml y concentración de DMA en el tampón es 20 %. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente, durante 4 h, se filtró sobre Millex^R-HV 0,45 μM (PVDF Durapore Millipore #SLHV013SL) y después se cargó en una columna de filtración de gel de grado prep SuperdexTM 200 (Columna HiloalTM 16/60 GE# 17-1069-01) que se ha equilibrado previamente en un tampón acuoso que contiene fosfato 0,010 M, cloruro de sodio 0,140 M, pH 6,5. Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo conjugado, se combinaron y se concentró sobre Amicon Ultra-4 (Ultracel 10k Millipore #UFC801096) para proporcionar producto (275 μl). Se analizó el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el éster metílico del ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico ($\epsilon_{319} = 13594 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280} = 19416 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo hu2H11 ($\epsilon_{280nm} = 208380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 1,75 restos de 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-

iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoilo por molécula de anticuerpo (0,48 mg/ml).

Ejemplo 17 : Preparación de Disolución Patrón de IGP-08-NHS

5 Se prepararon disoluciones frescas de IGP-08-NHS (compuesto 10 del ej. 8) en un patrón 0,005 M basado en un peso molecular de 787,81 en DMA. Se analizó la disolución patrón espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción de referencia determinado a 320 nm ($\epsilon_{320} = 9137 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Ejemplo 18: huMy9-6-IGP-08

10 Se selecciona anticuerpo huMy9-6 que se une al antígeno CD33 para la conjugación de derivados de PBD. Se trata una disolución de anticuerpo huMy9-6 en una concentración de 5 mg/ml en un tampón acuoso que contiene ácido N-(2-hidroxiethyl)-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 0,05 M y ácido etilendiaminotetra-acético (AEDT) 2 mM, pH 8, con un exceso molar de 6 veces de una disolución de IGP-08-NHS (compuesto 10 del ejemplo 8) en DMA tal que la concentración final de DMA en el tampón es 20%.

15 Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente, durante 120 min. y después se carga en una columna de filtración de gel Sephadex G25 (Columna de Desalación 26/10 HiPrep™ GE# 17-5087-01) que se había equilibrado previamente en un tampón acuoso que contenía citrato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,135 M, pH 5,5. Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo conjugado y se combinaron para proporcionar producto. Se dializó la muestra combinada durante la noche contra el mismo tampón de elución (citrato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,135 M, pH 5,5) para purificar además el producto. Se analiza el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el compuesto 8 del ejemplo 8 ($\epsilon_{320} = 9137 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280} = 7743 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo huMy9-6 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 206460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 4,5 moléculas de PBD (Compuesto 9 del ejemplo 8) por molécula de anticuerpo.

20

Ejemplo 19: huB4-IGP-08

25 Se selecciona anticuerpo Hu-Anti-B4 que se une al antígeno CD19 expresado preferentemente en la superficie de las células de linfoma humano, para la conjugación de derivados de PBD. Se trata una disolución de anticuerpo huB4 en una concentración de 8 mg/ml, en un tampón acuoso que contiene fosfato de potasio 0,05 M, cloruro de sodio 0,05 M y ácido etilendiaminotetra-acético (AEDT) 2 mM, pH 7,1 con un exceso molar de 5 veces de una disolución de IGP-08-NHS (compuesto 10 del ejemplo 8) en dimetilacetamida (DMA) tal que la concentración final de DMA en el tampón es 20 %. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente, durante 70 min y después se carga en una columna de filtración de gel Sephadex G25 (Columnas NAP™, GE# 17-0852-02) que se habían equilibrado previamente en un tampón acuoso que contenía fosfato 0,010 M, cloruro de sodio 0,140 M, pH 6,5. Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo conjugado y se combinaron para proporcionar producto. Se dializó la muestra combinada durante la noche contra el mismo tampón de elución (fosfato 0,010 M, cloruro de sodio 0,140 M, pH 6,5) para purificar además el producto. Se analiza el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el compuesto 8 del ej. 8 ($\epsilon_{320} = 9137 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280} = 7743 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo huB4 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 222960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 3,1 moléculas de PBD (Compuesto 9 del ejemplo 8) por molécula de anticuerpo.

30

35

Ejemplo 20: Preparación de Disolución Patrón de IGP-13-NHS

40 Se prepararon disoluciones frescas de IGP-13-NHS (compuesto 31 del ej. 10) en un patrón 0,0062 M basado en un peso molecular de 1.022,1 en DMA. Se analizó la disolución patrón espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción de referencia determinado a 320 nm ($\epsilon_{320} = 9137 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Ejemplo 21: hu2H11-IGP-13

45 Se selecciona anticuerpo hu2H11 que se une al antígeno EpCAM para la conjugación de derivados de PBD. Se trata una disolución de anticuerpo hu2H11 en una concentración de 5 mg/ml en un tampón acuoso que contiene ácido N-(2-hidroxiethyl)-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 0,05 M y ácido etilendiaminotetra-acético (AEDT) 2 mM, pH 8, con un exceso molar de 8 veces de una disolución de IGP-13-NHS (compuesto 31 del ejemplo 10) en DMA tal que la concentración final de DMA en el tampón es 15%. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente, durante 120 min. y después se carga en una columna de filtración de gel Sephadex G25 (Columna de Desalación 26/10 HiPrep™ GE# 17-5087-01) que se había equilibrado previamente en un tampón acuoso que contenía citrato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,135 M, pH 5,5. Se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo conjugado y se combinaron para proporcionar producto. Se dializó la muestra combinada durante la noche contra el mismo tampón de elución (citrato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,135 M, pH 5,5) para purificar además el producto. Se analiza el conjugado final espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinaron para el compuesto 29 del ejemplo 10 ($\epsilon_{320} = 9137 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280} = 7743 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y anticuerpo hu2H11 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 215525 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se enlazó un promedio de 4,7 moléculas de PBD (Compuesto 31 del ejemplo 10) por molécula de anticuerpo.

50

55

Ejemplo 22: Ensayo de Unión

Las afinidades de unión relativas del anticuerpo anti-B4 y su conjugado de tomamicina en células Ramos que expresan el antígeno se determinan usando un ensayo basado en fluorescencia. Se añaden el conjugado anticuerpo -tomamicina 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 23: potencia y especificidad *in vitro* de derivado de tomamicina o conjugados de derivado de tomamicina (ensayo de viabilidad)**Protocolo general para usar:**

Se añaden muestras de derivado de tomamicina libre o conjugado de derivado de tomamicina a una placa de cultivo de tejidos plana de 96 pozos y se valoró usando diluciones en serie que oscilaban de 1×10^{-12} M a 3×10^{-7} M. Se añaden células de tumores positivas de antígeno o células de tumores negativas de antígeno a los pozos de tal manera que había muestras por triplicado para cada concentración de fármaco para cada línea celular. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, 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-disulfopenil)-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 tomamicina o conjugado.

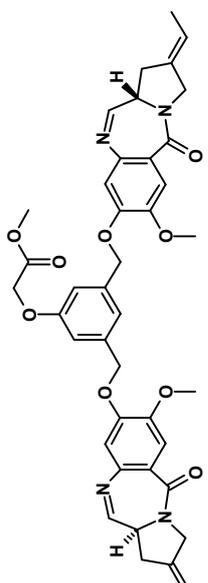
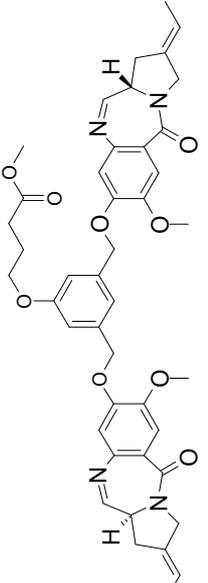
Se analizó la citotoxicidad de los compuestos y su especificidad frente a los conjugados de la invención contra las líneas celulares MOLT-4, BJAB, HL60/QC, HL60/ATCC y Ramos. Los resultados se ilustran en las figuras 1, 2, 3, 6 y 8.

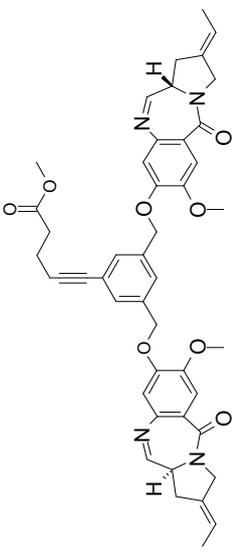
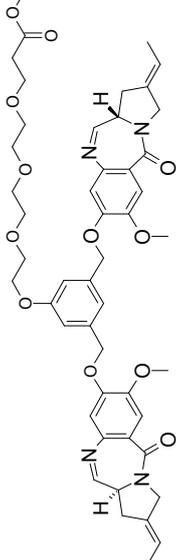
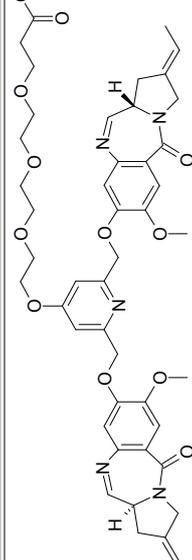
Ejemplo 24 : ensayo clonogénico**Procedimiento general para usar**

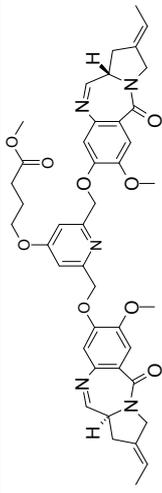
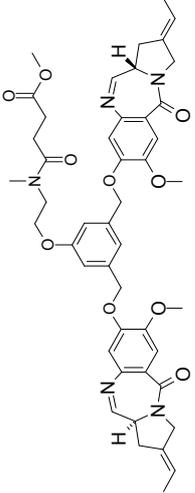
Se pusieron en placas células MDA-MB-231 a 3.000 células por pozo, en dos placas de 6 pozos, separadas; Se pusieron en placas células PC-3 y SK-MEL-28, a 2.000 células por pozo, en dos placas separadas. Se añadió el(los) artículo(s) para análisis para dar concentraciones finales de 0, 5×10^{-13} , 5×10^{-12} , 5×10^{-11} , 5×10^{-10} y 5×10^{-9} M por pozo (o intervalo de dosificación similar) a cada placa. Por ejemplo, cuando se pusieron en placas células en 1 ml y 1 ml de una concentración 2x del compuesto o conjugado de ensayo, se añadieron a los pozos apropiados para dar la concentración final deseada en 2 mls. Se preparó la disolución final del artículo para ensayo en el mismo medio que la línea celular; por lo tanto, se tuvieron que preparar diferentes diluciones de conjugado para cada línea celular diferente. Las placas de ensayo se pusieron en una incubadora a 37°C en CO₂ al 5%. Se controló el crecimiento celular y cuando las células en los pozos (control) "0" habían formado colonias pero no eran confluentes, normalmente 7 días para estas líneas celulares, se retiró el sobrenadante por aspiración. Se lavaron las células una vez con PBS (Disolución Tampón de Fosfato) y se aspiró el sobrenadante. A cada pozo, se añadieron 0,5 ml por pozo de un violeta cristal al 0,1% / formalina al 10% /PBS. Se incubaron las placas a temperatura ambiente, durante 10-15 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se lavaron los pozos 3 veces con H₂O destilada y después se secó con aire. Se contaron las colonias en cada pozo y el número de colonias en cada pozo dosificado se dividió entre el número de colonias en el pozo "0" para dar la fracción de supervivencia. Después se calcularon los valores IC₅₀ a partir de los datos.

Los compuestos y las moléculas de conjugado descritas en los ejemplos han presentado un IC₅₀ entre < 1 y 10.000 pM (véanse las figuras adjuntas y la Tabla I para valores específicos para las diversas líneas celulares).

Tabla I: datos *in vitro* (IC₅₀ en pM) para los derivados de tomaiicina no conjugados para diversas líneas celulares.

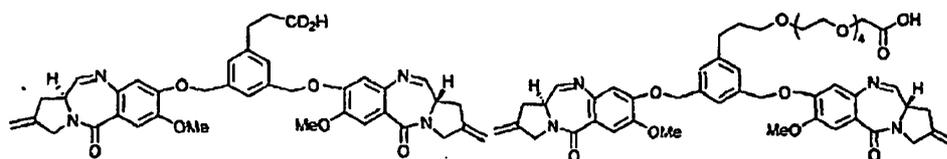
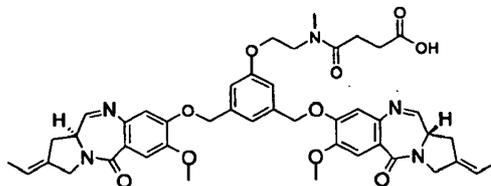
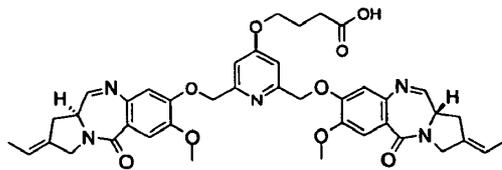
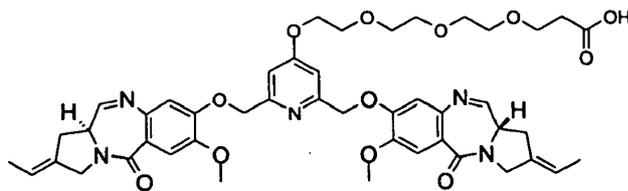
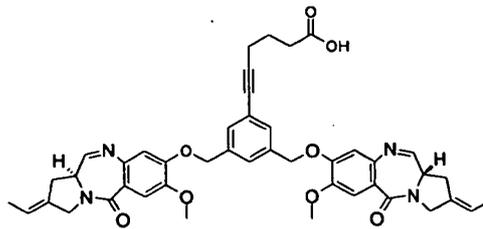
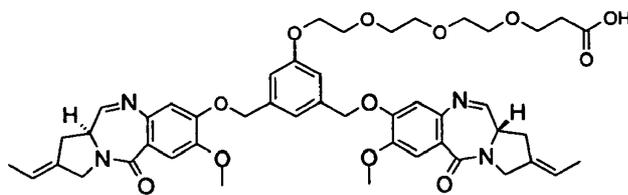
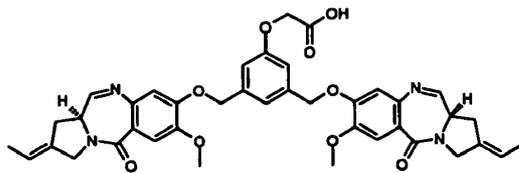
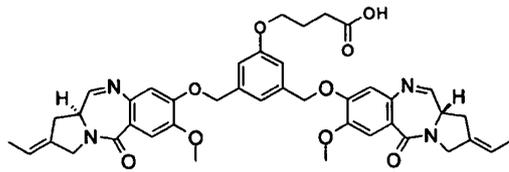
	Ramos	HL60/QC	HL60/AT CC	MDA-MB-231	PC-3	SK-MEL-28
compuesto 9 del esquema 2 (=IGP-08)	2.700	3.500	2.600			
compuesto 8 del esquema 2 (=IGP-08-OMe)	8,0	1,1	4,0	17,0	27,0	10,0
compuesto 18 del esquema 3 (éster metílico de compuesto del ej.9)	5.000		5.000			
 <p>éster metílico del compuesto del ej. 2</p>	1,4		12,0			
 <p>éster metílico del compuesto del ej. 1</p>	< 0,76		< 0,76			
compuesto del ej.1 en la forma ácida	580,0	1.200,0	2.000,0			

	Ramos	HL60/QC	HL60/AT CC	MDA-MB-231	PC-3	SK-MEL-28
 <p>éster metílico del compuesto del ej. 4</p>	1,2		2,2	12,0	27,0	15,0
 <p>éster metílico del compuesto del ej. 3</p>			12,0	16,0	7,4	9,7
<p>compuesto 29 del esquema 4 (=IGP-13-OMe)</p>				50,0	300,0	710,0
 <p>éster metílico del compuesto del ej. 5</p>				8,0	500,0	71,0

	Ramos	HL60/QC	HL60/AT CC	MDA-MB-231	PC-3	SK-MEL-28
 <p>éster metílico del compuesto del ej. 6</p>				1,7	11,0	8,7
 <p>éster metílico del compuesto del ej. 7</p>				9,0	500,0	90,0

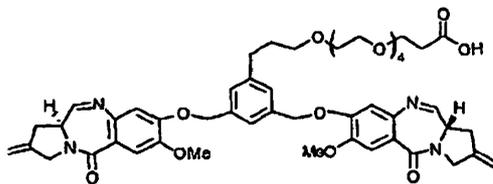
REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado del siguiente grupo:



5

10



así como los correspondientes ésteres N-hidroxisuccinimidílicos.

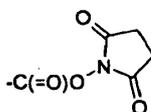
o sus sales, hidratos o sales hidratadas aceptables farmacéuticamente o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros.

- 5 **2.** Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la siguiente nomenclatura :
- ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c] [1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butírico ;
 - ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-acético;
- 10 • ácido 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico;
- ácido 6-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c] [1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-hex-5-inoico;
- 15 • ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico;
- ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-butírico;
 - ácido N-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico;
- 20 • ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-metiliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirrolo[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenil)-propanoico;
- ácido (2-{2-[2-(2-{3-[3,5-Bis-(7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1.2-a][1.4]diazepin-8-iloximetil]-fenil]-propoxi)-etoxi]etoxi]-etoxi)-etoxi)-acético;
 - ácido (3-{2-[2-(2-{3-[3,5-Bis-(7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1.2-a][1.4]diazepin-8-iloximetil]-fenil]-propoxi)-etoxi]etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoico;

así como los correspondientes ésteres N-hidroxisuccinimidílicos.

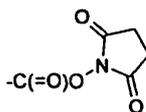
o sus sales, hidratos o sales hidratadas aceptables farmacéuticamente o las estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

- 30 **3.** Una molécula de conjugado que comprende uno o más compuesto(s) según la reivindicación 1 ó 2 unida covalentemente a un agente de unión a la célula mediante el grupo ligante -COOH o



de un ligante del (de los) compuesto(s).

4. Un conjugado según la reivindicación 3 en donde el agente de unión a la célula está modificado con un agente de modificación para mejorar la reactividad de dicho agente de unión a la célula hacia el grupo ligante -COOH o



- 35 del ligante del compuesto.

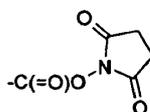
5. Una molécula de conjugado de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en la que dicho agente de unión a la célula se elige de anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contenga al menos un sitio de unión, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas para transporte de nutrientes o cualquier otra molécula o sustancia de unión a la célula.

5 6. Una molécula de conjugado de acuerdo con la reivindicación 3 a 5, en la que dicho agente de unión a la célula se elige de anticuerpos monoclonales; anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanizados; anticuerpos totalmente humanos; anticuerpos monocatenarios; fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y F_v, interferones; péptidos; linfocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormonas tales como insulina, TRH (hormonas liberadoras de tirotrópina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos; factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGF α , factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF y GM-CSF; vitaminas, tales como folato y transferrina.

7. Una molécula de conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en la que el agente de unión a la célula y dicho(s) compuesto(s) están unidos por un grupo amido.

15 8. Proceso de preparación de una molécula de conjugado unida por amida en la que el agente de unión a la célula se hace reaccionar con el compuesto ácido de N-hidroxi-succinimida de la reivindicación 1 ó 2.

9. Un proceso según la reivindicación 8 en donde el agente de unión a la célula está modificado con un agente de modificación para mejorar la reactividad de dicho agente de unión a la célula hacia el grupo ligante -COOH o



20 del ligante del compuesto.

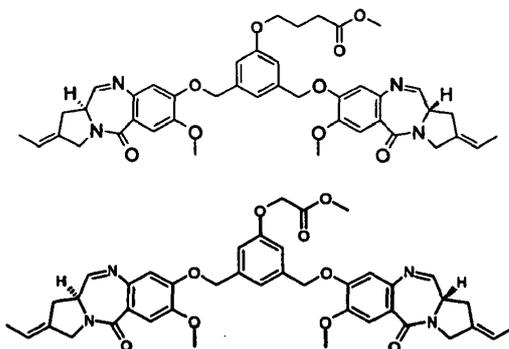
10. Un proceso según las reivindicaciones 8 ó 9 en donde el agente de unión a la célula es un anticuerpo o un anticuerpo monoclonal.

11. Un proceso según las reivindicaciones 8 a 10 en donde el conjugado se purifica mediante cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, HPLC, cromatografía sobre hidroxiapatita, diálisis o diafiltración.

12. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 o un compuesto como se define en las reivindicaciones 1 o 2 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 13. Uso de una cantidad efectiva de una molécula de conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 o un compuesto como se define en las reivindicaciones 1 o 2, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.

14. Compuesto seleccionado del siguiente grupo:



35

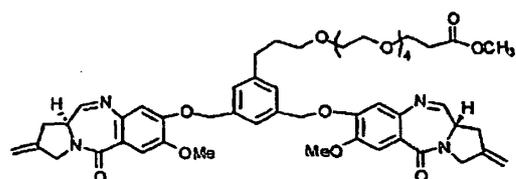
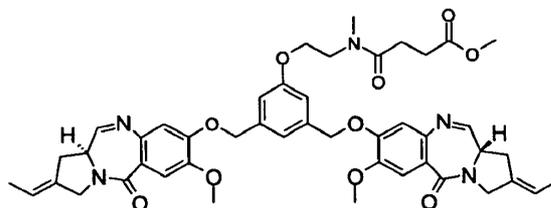
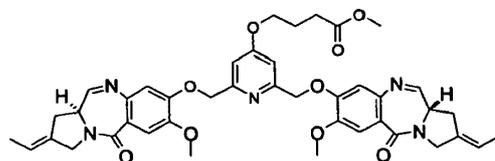
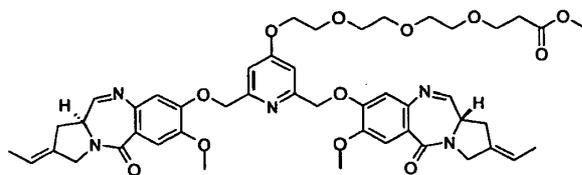
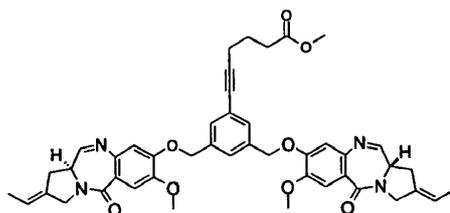
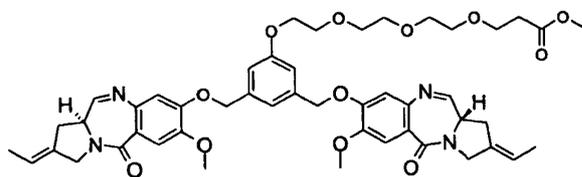


Fig. 1. Curvas de la determinación de la potencia *in vitro* del éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro- pirrolo[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-ilo ximetil]-fenoxi)-butírico del ej. 1.

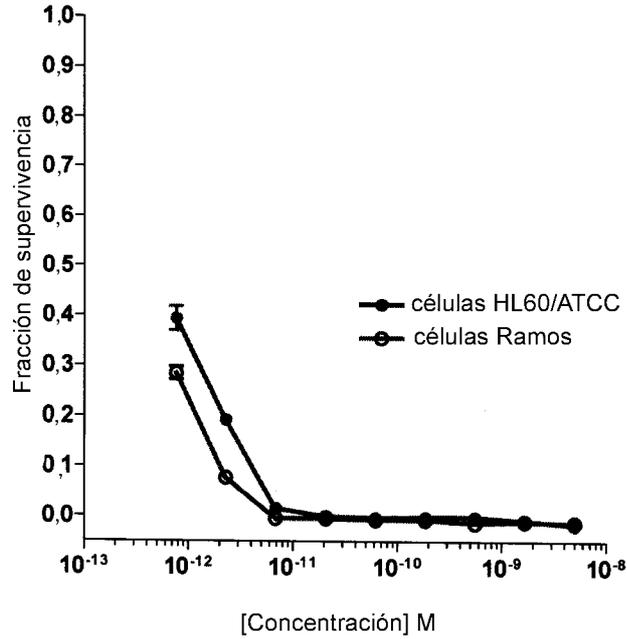


Fig. 2. Curvas de la determinación de la potencia *in vitro* del éster metílico del ácido 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro- pirrolo[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-ilo ximetil]-fenoxi)-acético del ej. 2.

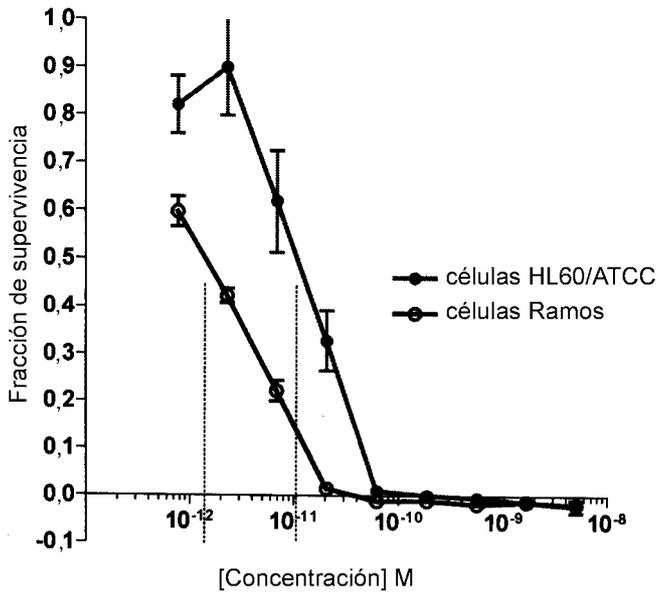


Fig. 3. Curvas de la determinación de la potencia *in vitro* de compuestos 8 (IGP08) y 9 (IGP08-OMe) del ejemplo 8 mostrando mayor potencia para el éster IGP08-OMe que para el ácido IGP08

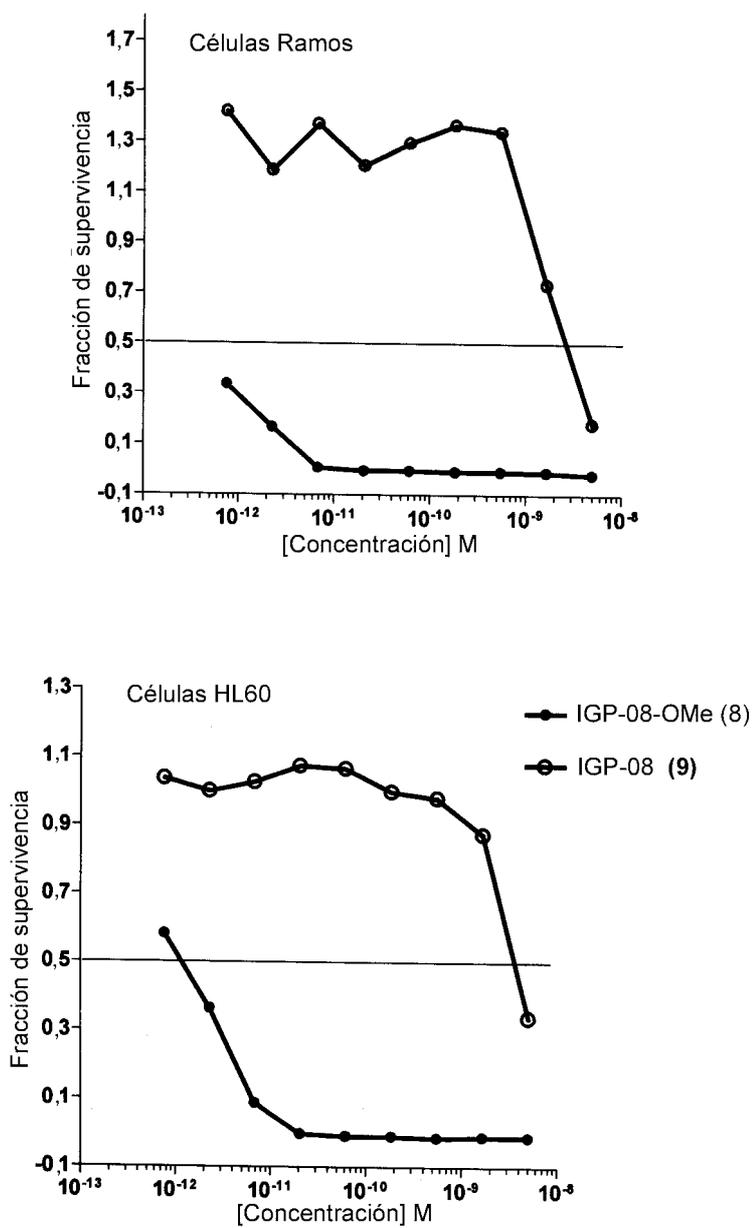


Fig. 4. Análisis MS (espectro de masas) del conjugado huMy9-6 desglucosilado - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-butirilo (2,1 FÁRMACO/Ab por UV) del ej. 11

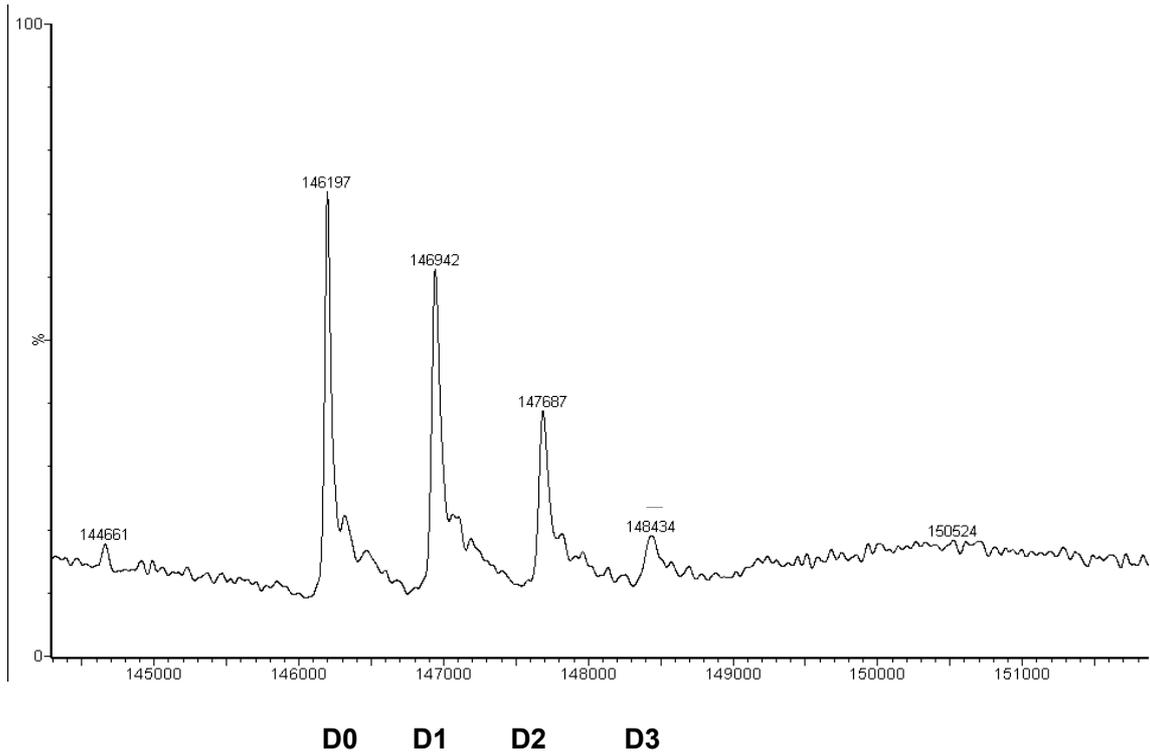


Fig. 5. Análisis MS del conjugado huB4 desglucosilado - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butirilo (4,48 F/A por UV) del ej. 12

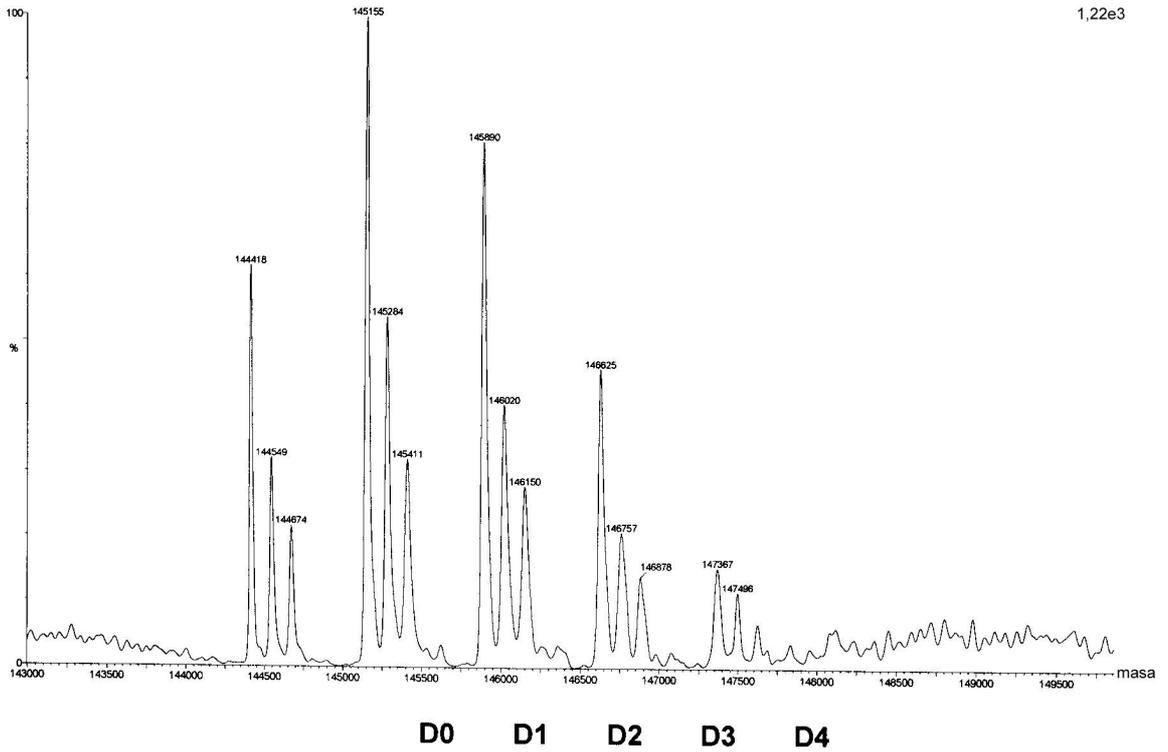


Fig. 6. Análisis MS del conjugado hu2H11 desglucosilado- 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4] benzodiazepin-5-ona-8-ilo ximetil]-fenoxi)-butirilo (3,74 F/A por UV) del ej. 13

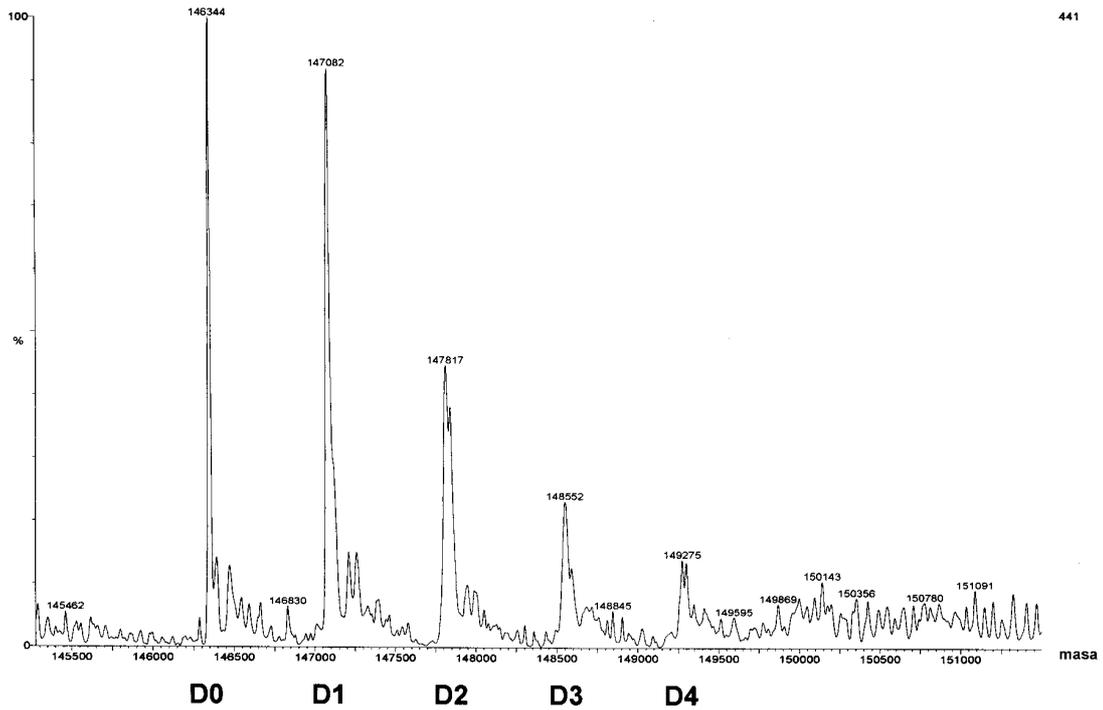


Fig. 7. Análisis MS del conjugado huMy9-6 - 3 -(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propionilo (4,80 F/A por UV) del ej. 14

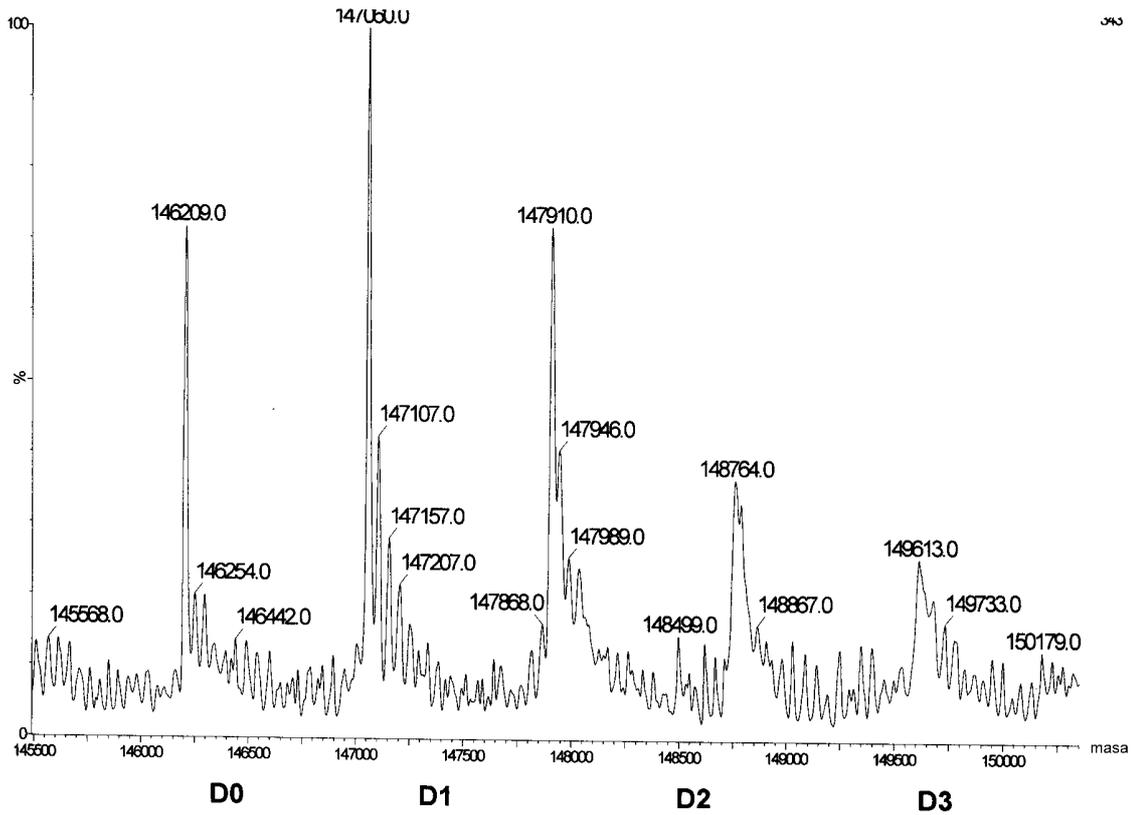


Fig. 8. Análisis MS de conjugado hu2H11 desglucosilado- 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propionilo (4,08 F/A por UV) del ej. 15

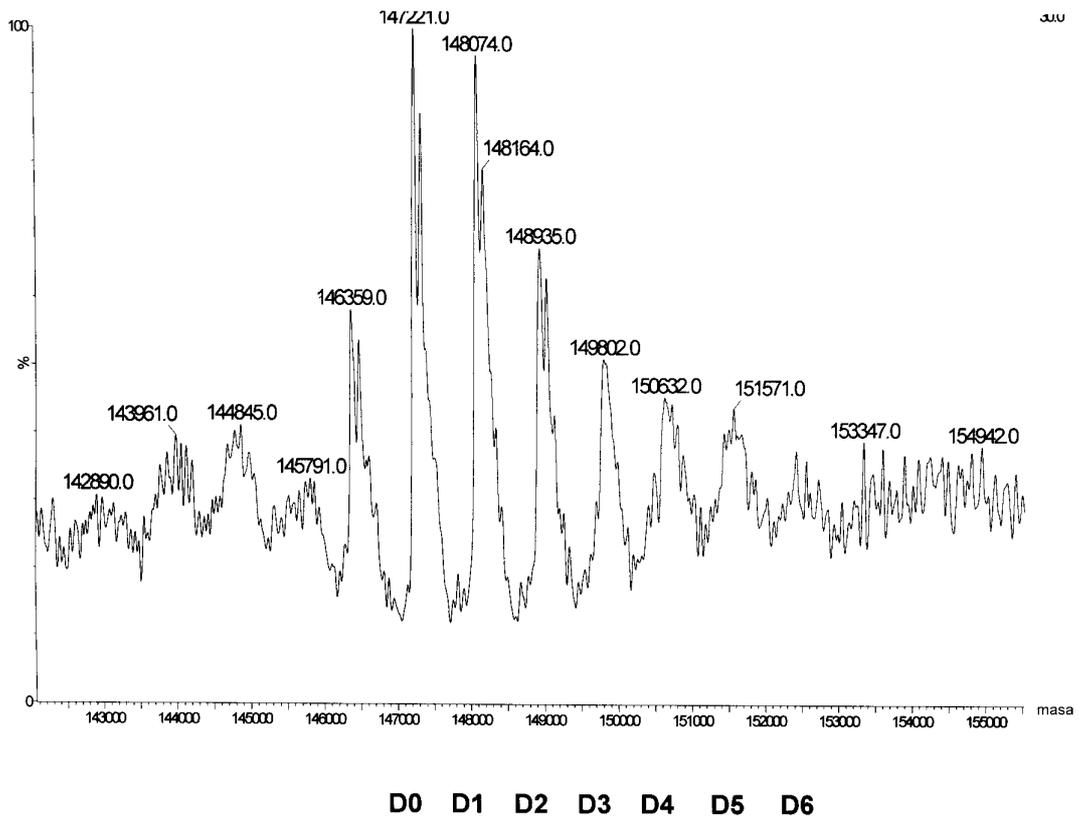


Fig. 9. Análisis por espectro de masas de huMy9-6 desglucosilado - IGP08; (Fármacos/Anticuerpo = 4,2) del ejemplo 18

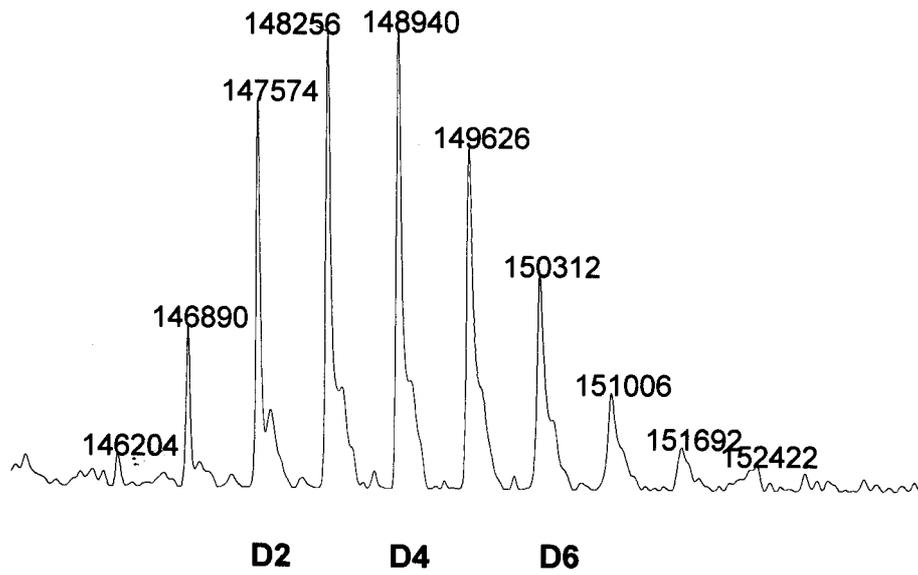
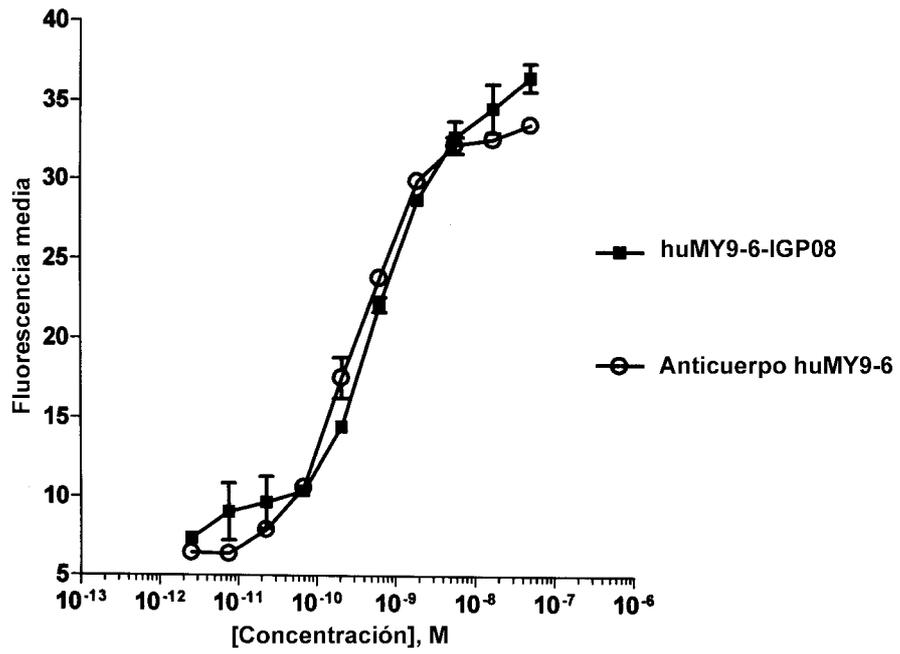
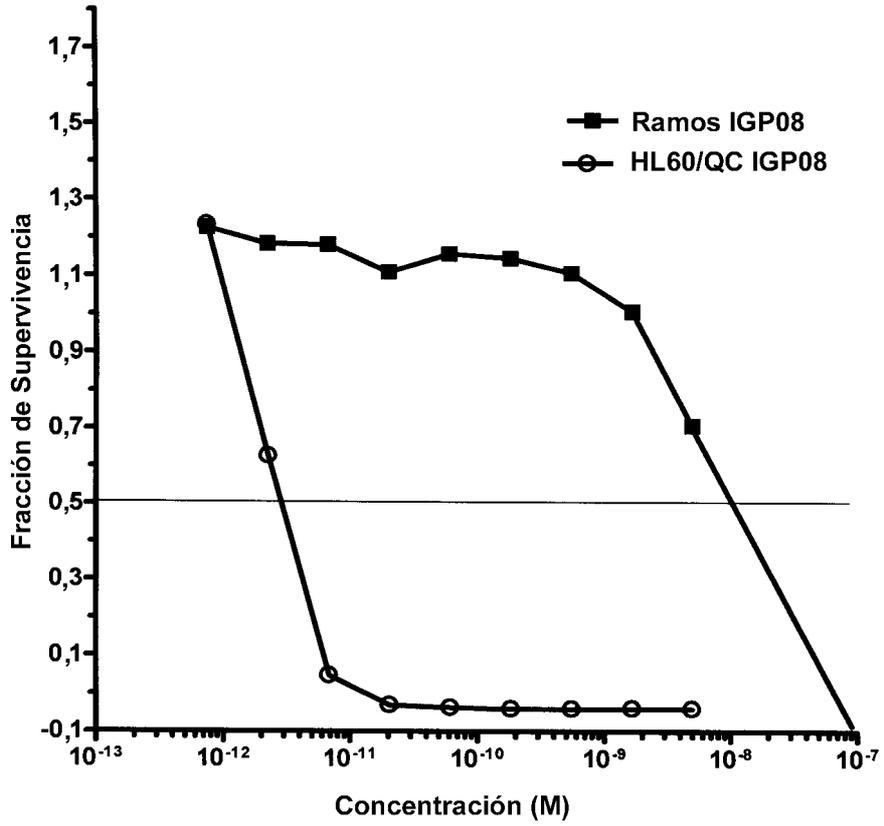


Fig. 10. Unión de anticuerpo huMY9-6 y Conjugado huMY9-6-IGP08 a antígeno CD33 del ej. 18



Conjugado/anticuerpo	EC 50
huMY9-6-IGP08	6,631e-10 M
anticuerpo huMY9-6	3,073e-10 M

Fig. 11. Datos de Citotoxicidad de My9-6-IGP08 en HL60/QC (Ag+) y Células (Ag-) Ramos



Conjugado	(nM)	
	HL60/QC	Ramos
My9-6-IGP-08	0,0029	11

Fig. 12. Análisis MS de huB4 desglucosilado - IGP08 del ej.19

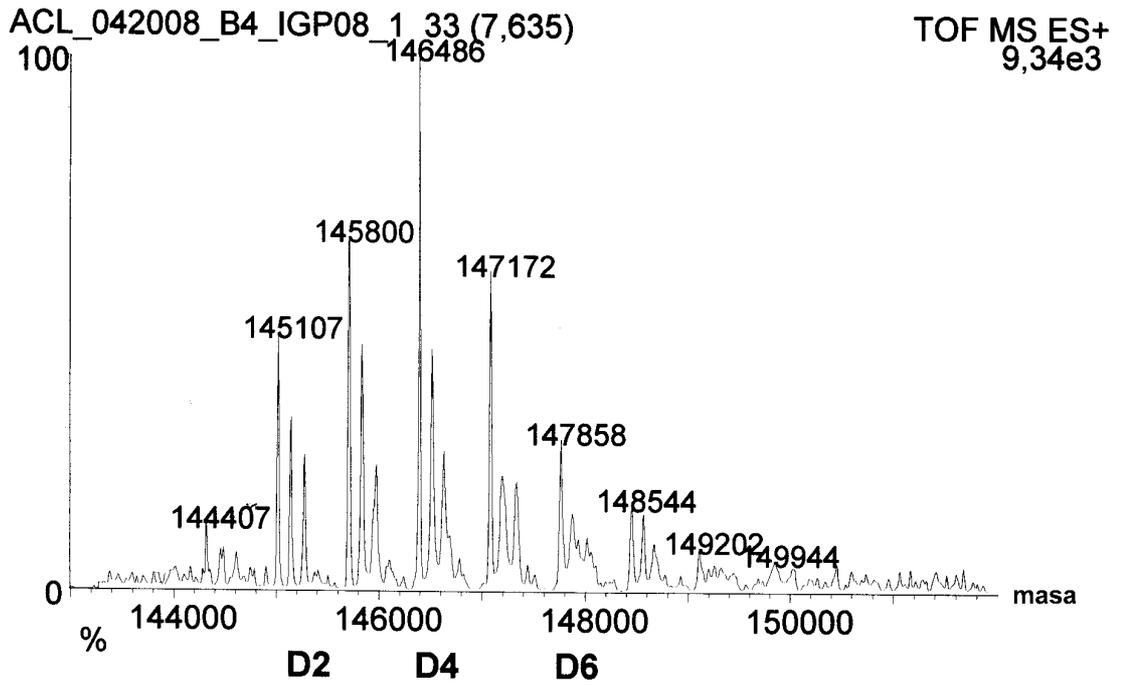
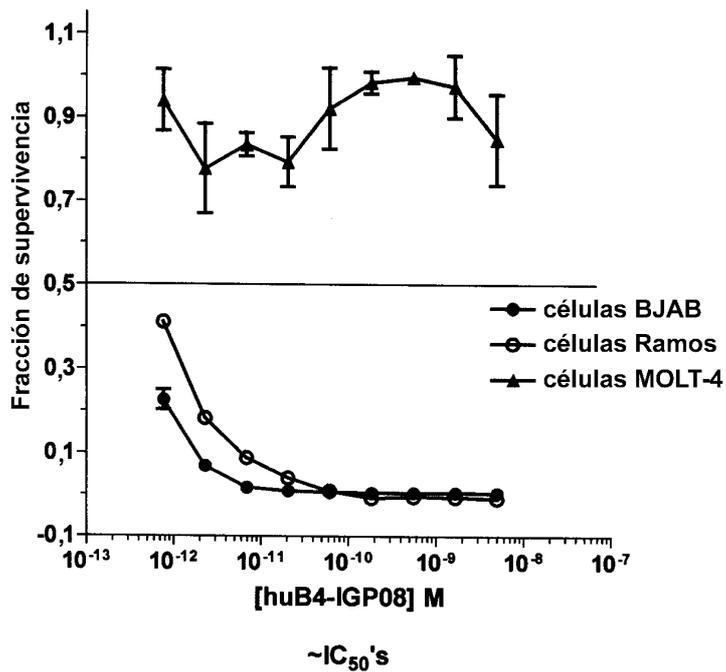
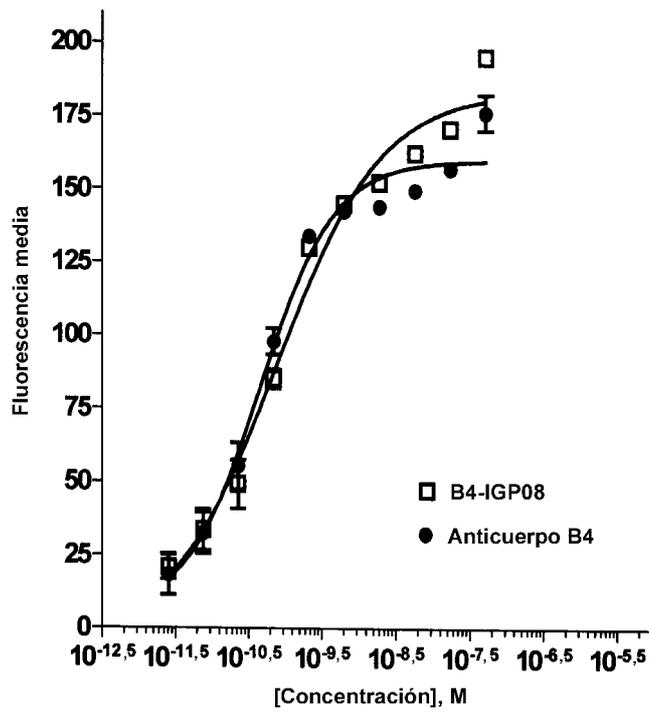


Fig. 13. Citotoxicidad: huB4-IGP08 (3,1 F/A) frente a células BJAB (Ag+), Ramos (Ag+) y MOLT-4 (Ag-)



células BJAB	< 7,6e-13 M
células Ramos	< 7,6e-13 M
células MOLT-4	4,0e-9 M

Fig. 14. Unión de anticuerpo hu-B4 y conjugado huB4-IGP08 del ejemplo 19



Conjugado/anticuerpo	EC 50
huB4-IGP08	$7,779e-11$ M
anticuerpo huB4	$4,598e-11$ M

Fig. 15. Análisis MS de hu2H11 desglucosilado - IGP-13 (4,7 F/A por UV) del ej. 21

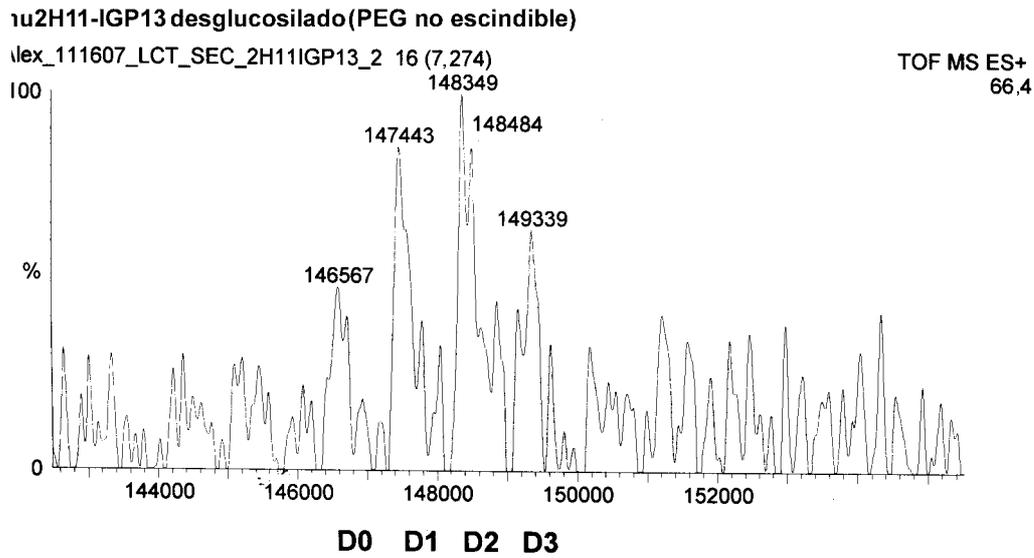
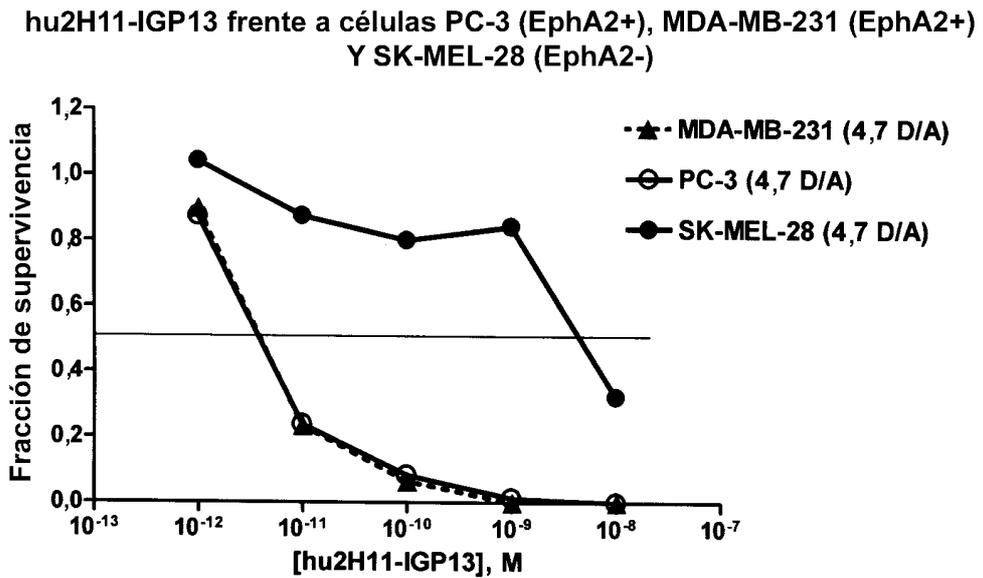


Fig. 16. Datos de citotoxicidad in vitro para hu2H11-IGP-13 con cargas de fármaco crecientes en las líneas celulares PC-3 (Ag+), MDA-MB-231 (Ag+) y SK-MEL-28 (Ag-)



Conjugado	IC50		
	PC-3	MDA-MB-231	SK-MEL-28
hu2H11-IGP13 (2,1 D/A)	6.0e-12 M	6.0e-12 M	1.8e-8 M
hu2H11-IGP13 (3,2 D/A)	4.0e-12 M	5.0e-12 M	1.8e-8 M
hu2H11-IGP13 (4,0 D/A)	3.5e-12 M	4.5e-12 M	5.3e-9 M
hu2H11-IGP13 (4,7 D/A)	2.5e-12 M	2.5e-12 M	3.4e-9 M

Fig.17. Datos de citotoxicidad in vitro para éster metílico del ácido 3-(2-{2-[2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etoxi]-etoxi)-propiónico del ej. 5

MDA-MB-231, PC-3 y SK-MEL-28 en un análisis clonogénico de exposición continua

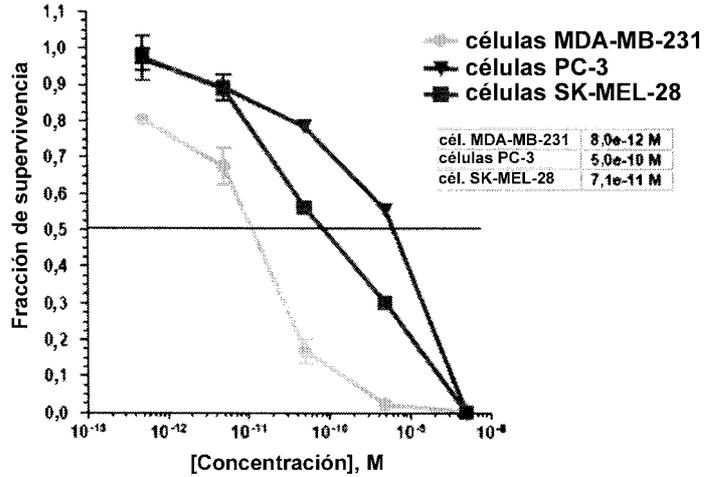


Fig.18. Datos de citotoxicidad in vitro para el éster metílico del ácido 4-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-butírico del ej. 6

MDA-MB-231, PC-3 y SK-MEL-28 en un análisis clonogénico de exposición continua

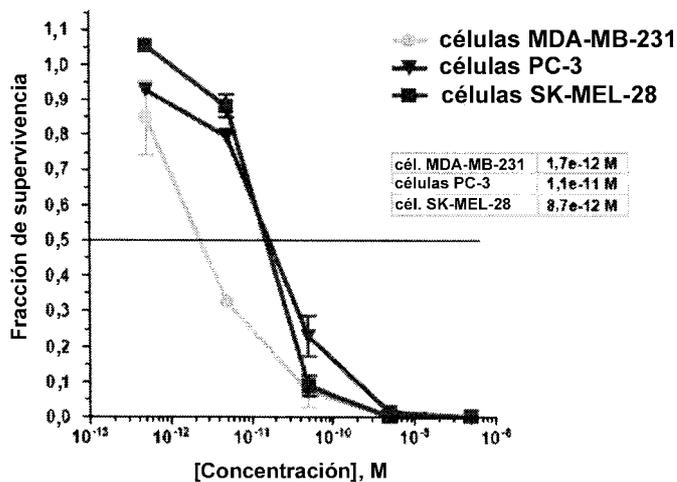


Fig. 19. Datos de citotoxicidad in vitro para el éster metílico del ácido N-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-etil]-N-metil-succinámico del ej. 7

MDA-MB-231, PC-3 y SK-MEL-28 en un análisis clonogénico de exposición continua

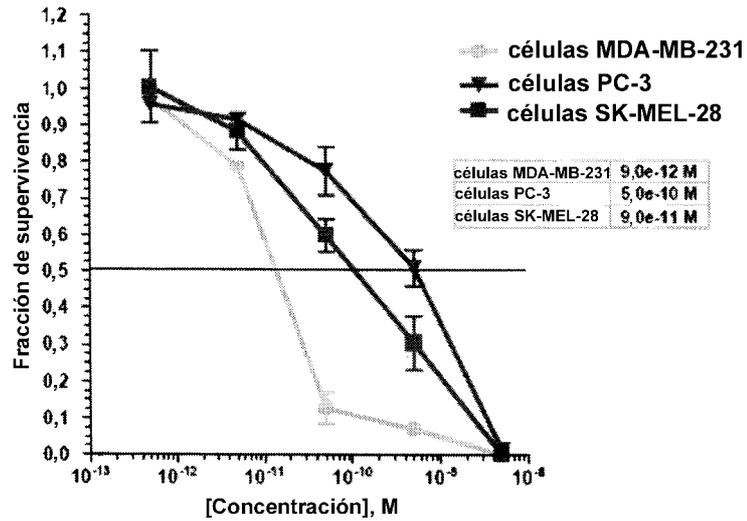
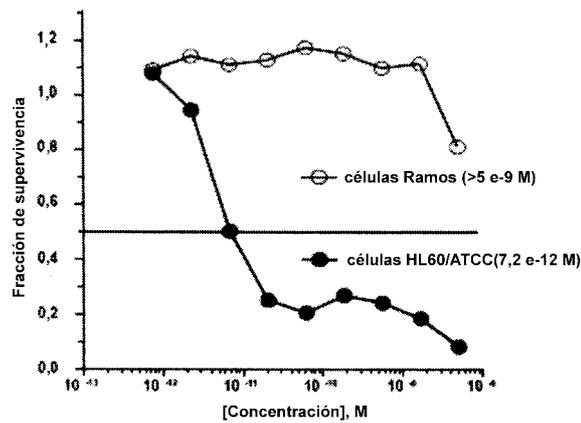


Fig. 20. Datos de citotoxicidad in vitro para conjugado huMy9-6 - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-fenoxi)-butirilo del ej. 11, en células HL60/ATCC (Ag+) y Ramos (Ag-)

huMY9-6-tomaimicina 3,3 F/A



	IC ₅₀ , M
HL60 / ATCC ^x	7,2 10 ⁻¹²
Ramos [^]	>5 10 ⁻⁹
Selectividad	>694x

Fig. 21: Datos de citotoxicidad in vitro para conjugado huB4 - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-ilo-ximetil]-fenoxi)-butirilo del ej. 12, en células Ramos (Ag+) y MOLT-4 (Ag-)

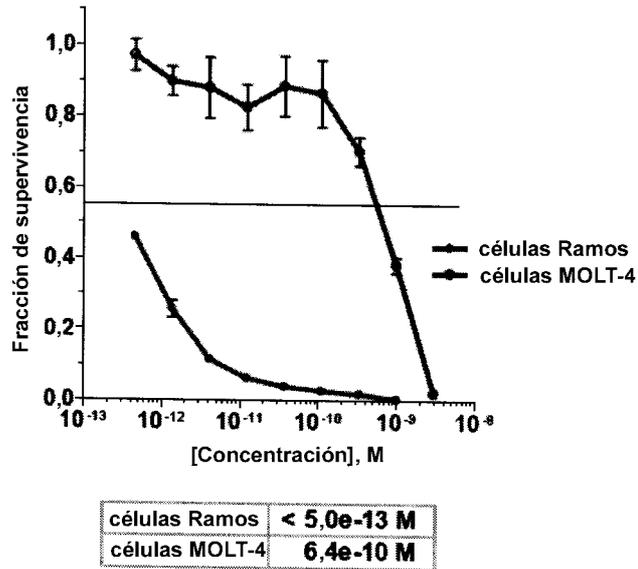


Fig. 22 Datos de citotoxicidad in vitro para conjugado hu2H11 - 4-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-ilo-ximetil]-fenoxi)-butirilo de ejemplo 13, en células MDA-MB-231 (Ag+), PC-3 (Ag+) y SK-MEL-28 (Ag-)

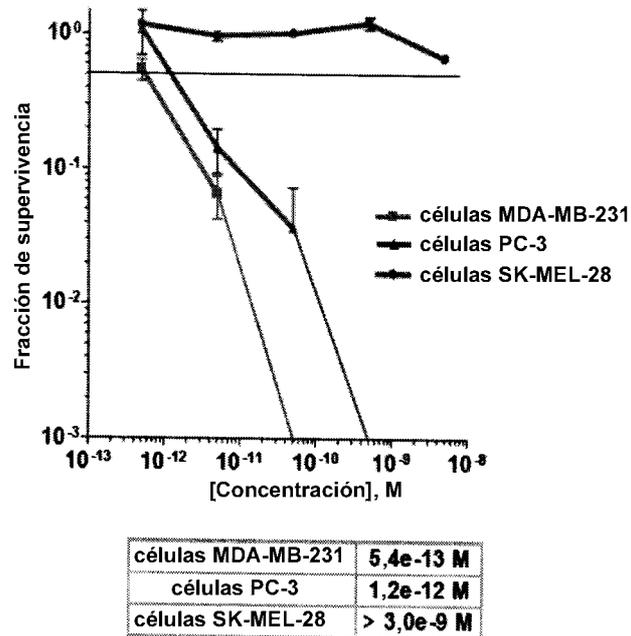
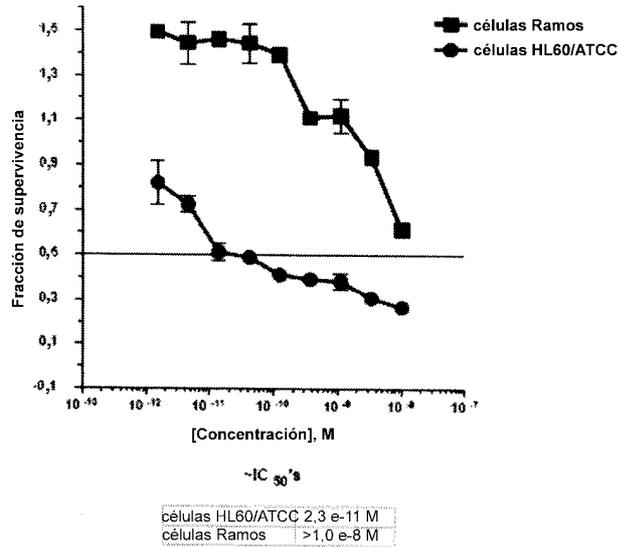


Fig. 23 Datos de citotoxicidad in vitro para conjugado huMy9-6 - 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propionilo del ej. 14, en células HL60/ATCC (Ag+) y Ramos (Ag-)

Citotoxicidad: huMY9-6-tomaimicina, 4,79 F/A

Ramos @ 2.000 células/pozo, 6 días exposición desarrollada durante 4,5 horas con WST;
HL60/ATCC @ 5.000 células/pozo, 7 días exposición desarrollada con WST durante 2 horas



Fig

Fig. 24 Datos de citotoxicidad in vitro para conjugado hu2H11 - 3-(2-{2-[2-(3,5-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahydro-pirroló[2.1c][1.4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-fenoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propionilo del ej. 15, en células MDA-MB-231 (Ag+), PC-3 (Ag+) y SK-MEL-28 (Ag-)

Citotoxicidad: hu2H11-tomaimicina
3,7 F/A frente a células MDA-MB-231, PC-3 y SK-MEL-28 en un análisis clonogénico de exposición continua

