

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 057**

51 Int. Cl.:

C07D 519/00 (2006.01)

A61K 31/5517 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 14173641 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2789622**

54 Título: **Pirrolobenzodiazepinas usadas para tratar enfermedades proliferativas**

30 Prioridad:

15.04.2010 US 324453 P

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

10.07.2017

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)
Milstein Building Granta Park Cambridge
CB21 6GH, GB y
SEATTLE GENETICS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOWARD, PHILIP WILSON;
MASTERSON, LUKE;
TIBERGHIE, ARNAUD;
JEFFREY, SCOTT;
BURKE, PATRICK y
SENTER, PETER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 623 057 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

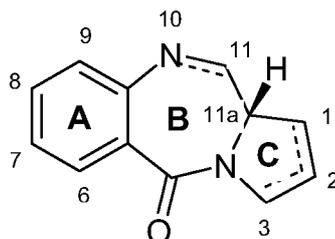
Pirrolobenzodiazepinas usadas para tratar enfermedades proliferativas

- 5 La presente invención se relaciona con pirrolobenzodiazepinas (PBD), en particular, dímeros de pirrolobenzodiazepina que tienen un enlace doble C2-C3 y un grupo arilo en la posición C2 en una unidad monomérica y un enlace doble C2-C3 y también un doble o triple enlace conjugados en la posición C2 o un grupo alquilo en la posición C2 en la otra unidad monomérica.

10 **Antecedentes de la invención**

Algunas pirrolobenzodiazepinas (PBD) tiene la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferida es PuGpu. El primer antibiótico antitumoral PBD, antramycin, fue descubierto en 1965 (Leimgruber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se han reportado muchos PBD que se encuentran de manera natural y se han desarrollado más de 10 rutas de síntesis para diversos análogos (Thurston, *et al.*, *Chem. Rev.* 1994, 433-465 (1994)). Los miembros de la familia incluyen abbeimicina (Hochlowski, *et al.*, *J. Antibiotics*, 40, 145-148 (1987)), chicamicina (Konishi, *et al.*, *J. Antibiotics*, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (patente Japonesa 58-180 487; Thurston, *et al.*, *Chem. Brit.*, 26, 767-772 (1990); Bose, *et al.*, *Tetrahedron*, 48, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto, *et al.*, *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, *et al.*, *J. Antibiotics*, 29, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, *et al.*, *J. Antibiotics*, 29, 2492-2503 (1982); Langley and Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 702-704 (1988); Itoh, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima, *et al.*, *J. Antibiotics*, 25, 437-444 (1972)). Las PBD son de la estructura general:

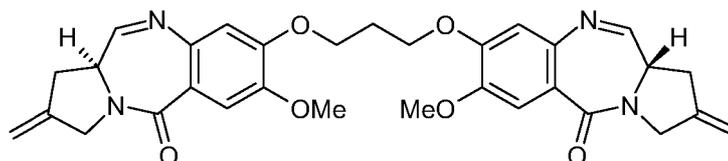
25



Difieren en el número, tipo y posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos A aromáticos como los anillos C pirrolo y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B existen ya sea una imina (N = C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) o carbinolamina metiléter (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11, el cual es el centro electrófilo responsable para alquilar ADN. La totalidad de los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición C11a quiral la cual les proporciona un giro dextrógiro (mano derecha) cuando se observan desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les proporciona una forma tridimensional apropiada para isohelicidad con el surco menor de la forma B de ADN, lo que genera un ajuste estrecho en el sitio de unión (Kohn, *In Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor, les permite interferir con el procesamiento de ADN y por lo tanto su uso como agentes antitumorales.

Previamente se ha descrito que la actividad biológica de estas moléculas se puede potenciar al unir dos unidades PBD juntas a través de sus funcionalidades C8/C'-hidroxilo mediante un engarce alquilen flexible (Bose, D. S., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D. E., *et al.*, *J. Org. Chem.*, 61, 8141-8147 (1996)). Se considera que los dímeros de PBD forman lesiones de ADN selectivas de secuencia tales como el reticulado intercatenario 5'-Pu-GATC-Py-3' palindrómico (Smellie, M., *et al.*, *Biochemistry*, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., *et al.*, *Biochemistry*, 44, 4135-4147), el cual se considera que es el responsable principal de su actividad biológica. Un ejemplo de un dímero PBD, SG2000 (SJG-136):

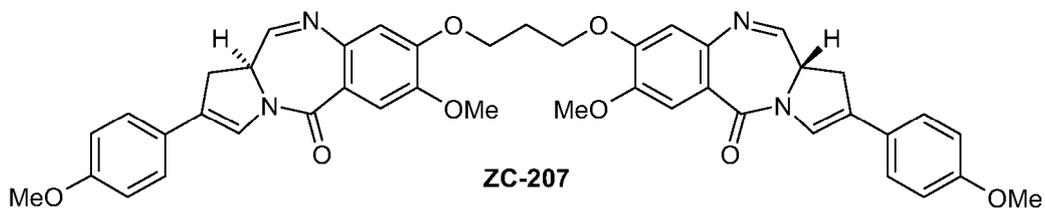
45



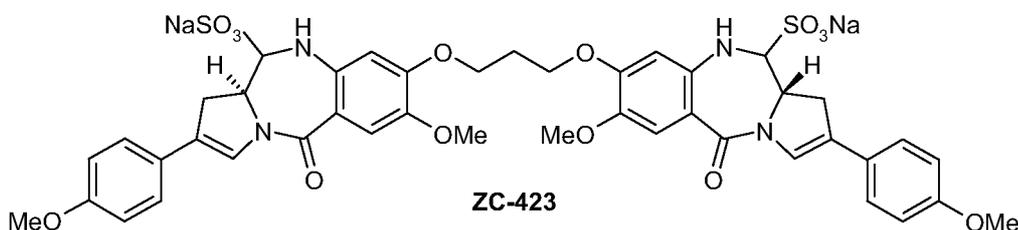
recientemente ha completado en serios clínicos en fase I en el área de oncología y está a punto de entrar en la fase II (Gregson, S., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 44, 737-748 (2001); Alley, M. C., *et al.*, *Cancer Research*, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, J. A., *et al.*, *Cancer Research*, 64, 6693-6699 (2004)).

50

Más recientemente, los presentes inventores han descrito previamente en el documento WO 2005/082251 compuestos PBD diméricos que presentan sustituyentes arilo C2, tales como SG2202 (ZC-207):



y en el documento WO2006/111759, bisulfitos de tales compuestos PBD, por ejemplo, SG2285 (ZC-423):



Estos compuestos se han demostrado que son agentes citotóxicos altamente útiles (Howard, P. W., *et al.*, Bioorg. Med. Chem. (2009), doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.12).

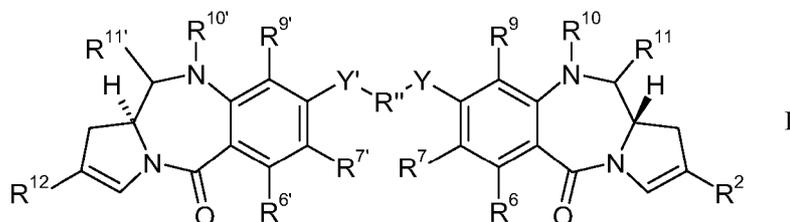
Debido a la manera en la cual estos compuestos altamente potentes actúan en ADN reticular, estas moléculas se han elaborado simétricamente. Esto proporciona una síntesis directa, ya sea al construir las porciones PBD simultáneamente que tienen forma de antemano el enlace dimérico o al reaccionar porciones PBD construidas de antemano con el grupo de Engarce dímico.

La Solicitud Internacional Co-dependiente PCT/GB2009/002498, presentada el 16 de octubre de 2009 desvela un compuesto PBD dimérico asimétrico que presenta grupos arilo en la posición C2 de cada monómero, en los que uno de estos grupos presenta un sustituyente designado para proporcionar un ancla para enlace del compuesto a otra porción.

Descripción de la invención

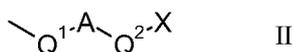
Los inventores de la presente invención han desarrollado compuestos de PBD diméricos asimétricos que presentan grupos arilo en la posición C2 de cada monómero, presentando dicho grupo arilo un sustituyente designado para proporcionar un ancla para engarzar el compuesto a otro resto, y también un enlace insaturado conjugado con el doble enlace en C2-C3 o un grupo alquilo en la otra unidad monomérica.

La presente invención comprende un compuesto con la fórmula I:

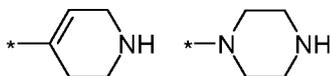


en la que:

R² es de fórmula II:



en la que A es un grupo arilo de 5 a 7 átomos de carbono, X se selecciona del grupo que comprende: OH, SH, CO₂H, COH, N=C=O, NHHH₂, CONHNNH₂,



5

NHR^N, en el que R^N se selecciona del grupo que comprende H y alquilo de 1 a 4 átomos de carbono y:

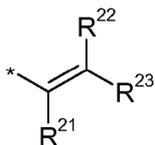
- 10 (i) Q¹ es un enlace sencillo y Q² se selecciona de un enlace sencillo y -Z-(CH₂)_n, en el que Z se selecciona de un enlace sencillo, O, S y NH y es de 1 a 3; o
 (ii) Q¹ es -CH=CH-, y Q² es un enlace sencillo;

R¹² se selecciona entre:

15 (iia) alquilo alifático saturado C₁₋₅;

(iiib) cicloalquilo saturado C₃₋₆;

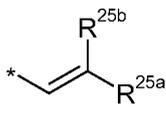
20 (iic)



25

en el que cada uno de R²¹, R²² y R²³ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo, en el que el número total de átomos de carbono en el grupo R¹² no es superior a 5;

(iic)

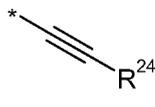


30

en el que uno de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona entre: fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo, metilo, metoxi; piridilo; y tiofenilo; y

(iie)

35



40

en el que R²⁴ se selecciona entre: H; alquilo C₁₋₃ saturado; alqueno C₂₋₃; alquino C₂₋₃; ciclopropilo; fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo, metilo, metoxi; piridilo; y tiofenilo;

R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn y halo; en la que R y R' se seleccionan independientemente de alquilo de 1 a 12 átomos de carbono opcionalmente sustituido, heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono y grupos arilo de 5 a 20 átomos de carbono;

45

R⁷ se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NHRR', nitro Me₃Sn y halo; ya sea:

(a) R¹⁰ es H, y R¹¹ es OH, OR^A, en el que R^A es un alquilo de 1 a 4 átomos de carbono;

(b) R¹⁰ y R¹¹ forman un enlace doble nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los cuales están unidos; o

50

(c) R¹⁰ es H y R¹¹ es SO₂M, en el que z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;

Rⁿ es un grupo alquileo de 3 a 12 átomos de carbono, cadena la cual puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, S, NR^{N2} (en el que R^{N2} es H o alquilo de 1 a 4 átomos de carbono) y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridina;

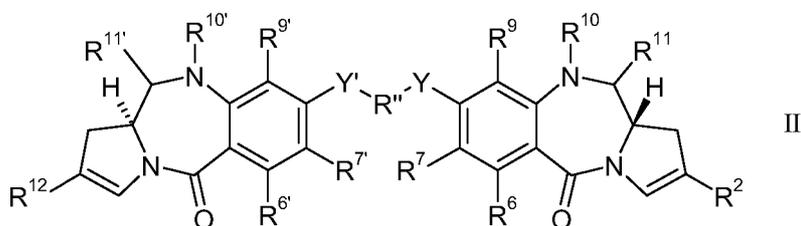
Y e Y' se seleccionan de O, S, o NH;

5 R⁶, R⁷, R⁹ se seleccionan de los mismos grupos que R⁶, R⁷ y R⁹, respectivamente, y R¹⁰ y R¹¹ son iguales que R¹⁰ y R¹¹, en los que, si R¹¹ y R¹¹ son SO₂M, M puede representar un catión divalente farmacéuticamente aceptable.

10 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona el uso de un compuesto del primer aspecto de la invención en la elaboración de un medicamento para tratar una enfermedad proliferativa. El segundo aspecto también proporciona un compuesto del primer aspecto de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

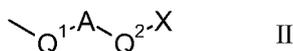
15 Una persona con habilidad habitual en el ámbito será capaz fácilmente de determinar si un conjugado de candidato trata o no una condición proliferativa para algún tipo de célula particular. Por ejemplo, los análisis los cuales se pueden utilizar convenientemente para determinar la actividad proporcionada por un compuesto particular se describen en los ejemplos siguientes.

20 Un tercer aspecto a la presente invención comprende un compuesto de fórmula II

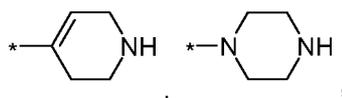


en la que:

25 R² es de fórmula II:



30 en la que A es un grupo arilo de 5 a 7 átomos de carbono, X se selecciona del grupo que comprende: OH, SH, CO₂H, COH, N=C=O, NHNH₂, CONHNH₂,

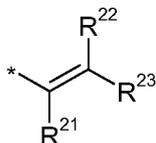


35 NHR^N, en el que R^N se selecciona del grupo que comprende H y alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, y:

- (i) Q¹ es un enlace sencillo y Q² se selecciona de un enlace sencillo y -Z-(CH₂)_n-, en el que Z se selecciona de un enlace sencillo, O, S y NH y es de 1 a 3; o
- (ii) Q¹ es -CH=CH-, y Q² es un enlace sencillo;

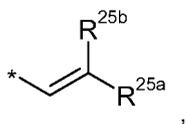
40 R¹² se selecciona entre:

- (iia) alquilo alifático saturado C₁₋₅;
- (iib) cicloalquilo saturado C₃₋₆;
- (iic)



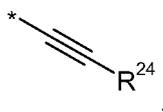
en el que cada uno de R²¹, R²² y R²³ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo, en el que el número total de átomos de carbono en el grupo R¹² no es superior a 5;

5 (iid)



10 en el que uno de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona entre: fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo, metilo, metoxi; piridilo; y tiofenilo; y

(iie)



15 en el que R²⁴ se selecciona entre: H; alquilo C₁₋₃ saturado; alqueno C₂₋₃; alquino C₂₋₃: ciclopropilo; fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo, metilo, metoxi; piridilo; y tiofenilo;

20 R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn y halo; en la que R y R' se seleccionan independientemente de alquilo de 1 a 12 átomos de carbono opcionalmente sustituido, heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono y grupos arilo de 5 a 20 átomos de carbono; R⁷ se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NHRR', nitro Me₃Sn y halo; ya sea:

25 (a) R¹⁰ es Troc y R¹¹ es OTBS;

(b) R¹⁰ es SEM y R¹¹ es un grupo oxo;

30 Rⁿ es un grupo alqueno de 3 a 12 átomos de carbono, cadena la cual puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, S, NR^{N2} (en el que R^{N2} es H o alquilo de 1 a 4 átomos de carbono) y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridina;

Y e Y' se seleccionan de O, S, o NH;

R⁶, R⁷, R⁹ se seleccionan de los mismos grupos que R⁶, R⁷ y R⁹, respectivamente, y R¹⁰ y R¹¹ son iguales que R¹⁰ y R¹¹.

35 Un cuarto aspecto de la presente invención comprende un procedimiento de elaboración de un compuesto de fórmula I a partir de un compuesto de fórmula II por desprotección del enlace imina.

40 Los compuestos PBD diméricos o asimétricos de la presente invención se elaboran por diferentes estrategias a aquellas utilizadas previamente en la elaboración de compuestos PBD diméricos simétricos.

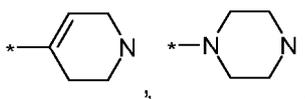
45 En particular, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento el cual involucra agregar cada uno de cada uno de los sustituyentes C2 a un núcleo dimérico PBD simétrico en etapas de procedimiento separadas. En consecuencia, un quinto aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de elaboración de un compuesto del primero o tercer aspecto de la invención que comprende uno de las etapas de procedimiento que se establecen en lo siguiente.

50 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a Conjugados que comprende dímeros de PBD enlazados a un agente de dirección, en el que un PBD es un dímero de fórmula I (anterior) y que tiene la siguiente fórmula III:



55 en la que L es una unidad de Ligando (es decir, un agente diana), que es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, LU es una unidad de Engarce y D es una unidad de Fármaco que comprende el PBD.

El dímero D de PBD es de fórmula I, excepto si X se selecciona entre el grupo que comprende: O, S, C(=O), C=, NH(C=O), NHHH, CONHHH,



NR^N, en el que R^N se selecciona entre el grupo que comprende H y alquilo C₁₋₄.

5 La unidad de engarce es como se define a continuación.

Breve descripción de la Figura

La Figura 1 muestra el efecto de un conjugado de la invención sobre un tumor.

10

Definiciones

Cationes farmacéuticamente aceptables

15 Los ejemplos de cationes monovalentes y divalentes farmacéuticamente aceptables se describen en Berge *et al.*, J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977), la cual se incorpora en la presente como referencia.

El catión farmacéuticamente aceptable puede ser inorgánico u orgánico.

20 Los ejemplos de cationes inorgánicos monovalentes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a iones de metal alcalino tales como Na⁺ y K⁺. Los ejemplos de cationes inorgánicos divalentes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a cationes alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺. Los ejemplos de cationes orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a ion amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Los ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

25

Sustituyentes

30

La frase "opcionalmente sustituido", como se utiliza en la presente, se relaciona con un grupo original el cual puede estar no sustituido o el cual puede estar sustituido.

35 A menos que se especifique en otro sentido, el término "sustituido", como se utiliza en la presente, se relaciona con un grupo original el cual presenta uno o más sustituyentes. El término "sustituyente" se utiliza en la presente en el sentido convencional y se refiere a una porción química la cual está unida covalentemente, o, si es apropiado, está fusionada a un grupo original. Son bien conocidos una amplia variedad de sustituyentes y también son bien conocidos los procedimientos para su formación e introducción en diversos grupos originales.

40 Los ejemplos de sustituyentes se describen con mayor detalle en lo siguiente.

Alquilo de 1 a 12 átomos de carbono: el término "alquilo de 1 a 12 átomos de carbono" como se utiliza en la presente, se relaciona con una porción monovalente que se obtiene al separar un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarburo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, el cual puede ser alifático o alicíclico y el cual puede estar saturado o insaturado (por ejemplo, parcialmente insaturado, completamente insaturado). De esta manera, el término "alquilo" incluye las subclases alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, etc., descritas más adelante.

45

Los ejemplos de grupos alquilo saturados incluyen, pero no se limitan a metilo (C₁), etilo (C₂), propilo (C₃), butilo (C₄), pentilo (C₅), hexilo (C₆) y heptilo (C₇).

50

Los ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen, pero no se limitan a metilo (C₁), etilo (C₂), n-propilo (C₃), n-butilo (C₄), n-pentilo (C₅), n-hexilo (C₆) y n-heptilo (C₇).

Los ejemplos de grupos alquilo ramificados saturados incluyen isopropilo (C₃), isobutilo (C₄), sec-butilo (C₄), *terc*-butilo (C₄), isopentilo (C₅) y neopentilo (C₅).

5 Alqueno de 2 a 12 átomos de carbono: el término “alqueno de 2 a 12 átomos de carbono”, como se utiliza en la presente, se relaciona con un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono.

Los ejemplos de grupos alqueno insaturados incluyen, pero no se limitan a eteno (vinilo, -CH=CH₂), 1-propeno (-CH=CH-CH₃), 2-propeno (alilo, -CH₂-CH=CH₂), isopropeno (1-metilvinilo, -C(CH₃)=CH₂), buteno (C₄), pento (C₅) y hexeno (C₆).

10 Alquino de 2 a 12 átomos de carbono: El término “alquino de 2 a 12 átomos de carbono”, como se utiliza en la presente, se relaciona con un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono.

15 Los ejemplos de grupos alquino insaturados incluyen, pero no se limitan a etino (-C≡CH) y 2-propino (propargilo, -CH₂C≡CH).

20 Cicloalquilo de 3 a 12 átomos de carbono: El término “cicloalquilo de 3 a 12 átomos de carbono”, como se utiliza en la presente, se relaciona con un grupo alquilo el cual también es un grupo ciclilo; es decir, una porción monovalente obtenida al separar un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo alicíclico de un compuesto hidrocarburo cíclico (carbocíclico), porción la cual tiene de 3 a 7 átomos de carbono, que incluye 3 a 7 átomos en el anillo.

Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a aquellos derivados de:

25 compuestos de hidrocarburo monocíclico saturado:

ciclopropano (C₃), ciclobutano (C₄), ciclopentano (C₅), ciclohexano (C₆), cicloheptano (C₇), metilciclopropano (C₄), dimetilciclopropano (C₅), metilciclobutano (C₅), dimetilciclobutano (C₄), metilciclopentano (C₆), dimetilciclopentano (C₇) y metilciclohexano (C₇);

30 compuestos de hidrocarburo monocíclico insaturado:

ciclopropeno (C₃), ciclobuteno (C₄), ciclopenteno (C₅), ciclohexeno (C₆), metilciclopropeno (C₄), dimetilciclopropeno (C₅), metilciclobuteno (C₅), dimetilciclobuteno (C₆), metilciclopenteno (C₆), dimetilciclopenteno (C₇) y metilciclohexeno (C₇); y

35 compuestos de hidrocarburo policíclico saturado:

norcarano (C₇), norpinano (C₇), nornorano (C₇).

40 Heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono: El término “heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono” como se utiliza en la presente, se relaciona con una porción monovalente que se obtiene al separar un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo de un compuesto heterocíclico, porción la cual tiene de 3 a 20 átomos en el anillo, de la cual 1 a 10 son heteroátomos del anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos en el anillo, de los cuales 1 a 4 son heteroátomos del anillo.

45 En este contexto, los prefijos en inglés (por ejemplo, C₃₋₂₀ (de 3 a 20 átomos de carbono), C₃₋₇ (de 3 a 7 átomos de carbono), C₅₋₆ (de 5 a 6 átomos de carbono), etc.) indican el número de átomos en el anillo o el intervalo de números de átomos en el anillo, ya sea átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, el término “heterociclilo de 5 a 6 átomos de carbono”, como se utiliza en la presente, se relaciona con un grupo heterociclilo que tiene 5 o 6 átomos en el anillo.

Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos incluyen, pero no se limitan a aquellos derivados de:

55 N₁: aziridina (C₃), azetidina (C₄), pirrolidina (tetrahidropirrol) (C₅), pirrolina (por ejemplo, 3-pirrolina, 2,5-dihidropirrol) (C₅), 2H-pirrol o 3H-pirrol (isopirrol, isoazol) (C₅), piperidina (C₆), dihidropiridina (C₆), tetrahidropiridina (C₆), azepina (C₇);

O₁: oxirano (C₃), ozetano (C₄), oxolano (tetrahidrofurano) (C₅), oxol (dihidrofurano) (C₅), oxano (tetrahidropirano) (C₆), dihidropirano (C₆), pirano (C₆), oxepin (C₇),

S₁: tiirano (C₃), tietano (C₄), tiolano (tetrahidrotiofeno) (C₅), tiano (tetrahidrotiopirano) (C₆), tiepano (C₇);

60 O₂: dioxolano (C₅), dioxano (C₆) y dioxepano (C₇);

O₃: trioxano (C₆);

N₂: imidazolidina (C₅), pirazolidina (diazolidina) (C₅), imidazolina (C₅), pirazolina (dihidropirazol) (C₅), piperazina (C₆);

N₁O₁: tetrahidrooxazol (C₅), dihidrooxazol (C₅), tetrahidroisoxazol (C₅), dihidroisoxazol (C₅), morfina (C₆), tetrahidrooxazina (C₆), dihidrooxazina (C₆), oxazina (C₆);

65 N₁S₁: tiazolina (C₅), tiazolidina (C₅), tiomorfolina (C₆);

N₂O₁: oxadiazina (C₆);
 O₁S₁: oxatiol (C₅) y oxatiano (tioxano) (C₆); y
 N₁O₁S₁: oxatiazina (C₆).

5 Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos sustituidos incluyen aquellos derivados de sacáridos, en forma cíclica, por ejemplo, furanosas (C₅) tales como arabinofuranas, lixofuranas, ribofuranas y silofuranas y piranosas (C₆) tales como alopiranas, altropiranas, glucopiranas, manopiranas, gulopiranas, idopiranas, galactopiranas y talopiranas.

10 Arilo de 5 a 20 átomos de carbono: El término "arilo de 5 a 20 átomos de carbono", como se utiliza en la presente, pertenece a una porción monovalente que se obtiene al separar un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo aromático de un compuesto aromático, porción la cual tiene de 3 a 20 átomos en el anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos en el anillo.

15 En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C₃₋₂₀ (de 3 a 20 átomos de carbono), C₅₋₇ (de 5 a 7 átomos de carbono), C₅₋₆ (de 5 a 6 átomos de carbono), etc.), indican el número de átomos del anillo o el intervalo de número de átomos en el anillo, ya sea átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, el término "arilo de 5 a 6 átomos de carbono", como se utiliza en la presente, se relaciona con un grupo arilo que tiene 5 o 6 átomos en el anillo.

20 Los átomos en el anillo pueden ser todos átomos de carbono, tal como en "grupos carboarilo".

Los ejemplos de grupos carboarilo incluyen, pero no se limitan a aquellos derivados de benceno (es decir, fenilo) (C₆), naftaleno (C₁₀), azuleno (C₁₀), antraceno (C₁₄), fenantreno (C₁₄), naftaceno (C₁₈) y pireno (C₁₆).

25 Los ejemplos de grupos arilo los cuales comprenden anillos fusionados, por lo menos uno de los cuales es un anillo aromático incluyen, pero no se limitan a grupos derivados de indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1H-indeno) (C₉), indeno (C₉), isoindeno (C₉), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) (C₁₀), acenafteno (C₁₂), fluoreno (C₁₃), fenaleno (C₁₃), acefenantreno (C₁₅) y aceantreno (C₁₆).

30 De manera alternativa, los átomos en el anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, como en los "grupos heteroarilo". Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen, pero no se limitan a aquellos derivados de:

N₁: pirrol (azol) (C₅), piridina (azina) (C₆);

O₁: furano (oxol) (C₅);

35 S₁: tiofeno (tiol) (C₅);

N₁O₁: oxazol (C₅), isoxazol (C₅), isoxazina (C₆);

N₂O₁: oxadiazol (furazan) (C₅);

N₃O₁: oxatriazol (C₅);

N₁S₁: tiazol (C₅), isotiazol (C₅);

40 N₂: imidazol (1,3-diazol) (C₅), pirazol (1,2-diazol) (C₅), piridiazina (1,2-diazina) (C₆), pirimidina (1,3-diazina) (C₆), (por ejemplo, citosina, timina, uracilo), pirazina (1,4-diazina) (C₆);

N₃: tiazol (C₅), triazina (C₆); y

N₄: tetrazol (C₅).

45 Los ejemplos de heteroarilo los cuales comprenden anillos fusionados incluyen, pero no se limitan a:

9 átomos de carbono (C₉) (con 2 anillos fusionados) derivados de benzofurano (O₁), isobenzofurano (O₁), indol (N₁), isoindol (N₁), indolizina (N₁), indolina (N₁), isoindolina (N₁), purina (N₄) (por ejemplo, adenina, guanina), bencimidazol (N₂), indazol (N₂), benzoxazol (N₁O₁), benzisoxazol (N₁O₁), benzodioxol (O₂), benzofurazano (N₂O₁), benzotriazol (N₃), benzotiofurano (S₁), benzotiazol (N₁S₁), benzotiadiazol (N₂S);

50 10 átomos de carbono (C₁₀) (con 2 anillos fusionados) derivados de cromeno (O₁), isocromeno (O₁), cromano (O₁), isocromano (O₁), benzodioxano (O₂), quinolina (N₁), isoquinolina (N₁), quinolizina (N₁), benzoxazina (N₁O₁), benzodiazina (N₂), piridopiridina (N₂), quinoxalina (N₂), quinazolina (N₂); cinolina (N₂), ftalazina (N₂), naftiridina (N₂), pteridina (N₄);

55 11 átomos de carbono (C₁₁) (con 2 anillos fusionados) derivados de benzodiazepina (N₂);

13 átomos de carbono (C₁₃) (con 3 anillos fusionados) derivados de carbazol (N₁), dibenzofurano (O₁), dibenzotiofeno (S₁), carbolina (N₂), pirimidina (N₂), piridoindol (N₂); y

60 14 átomos de carbono (C₁₄) (con 3 anillos fusionados) derivados de acridina (N₁), xanteno (O₁), tioxanteno (S₁), oxantreno (O₂), fenoxatiina (O₁S₁), fenazina (N₂), fenoxazina (N₁O₁), fenotiazina (N₁S₁), tiantreno (S₂), fenantridina (N₁), fenantrolina (N₂), fenazina (N₂).

Los grupos anteriores, ya sea solos o parte de otro sustituyente por sí mismos opcionalmente pueden estar sustituidos con uno o más grupos que se seleccionan de sí mismos y los sustituyentes adicionales que se incluyen en lo siguiente.

65 Halo: -F, -Cl, -Br y -I.
 Hidroxi: -OH.

Éter: -OR, en el que R es un sustituyente éter, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (también denominado como grupo alcoxi de 1 a 7 átomos de carbono, descrito más adelante), un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono (también denominado como un grupo heterociclioxi de 3 a 20 átomos de carbono) o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono (también denominado como un grupo ariloxi de 5 a 20 átomos de carbono), preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono.

Alcoxi: -OR, en el que R es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alcoxi de 1 a 7 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a -OMe (metoxi), -OEt (etoxi), -O(nPr) (n-propoxi), -O(iPr) (isopropoxi), -O(nBu) (n-butoxi), -O(sBu) (sec-butoxi), -O(iBu) (isobutoxi) y -O(tBu) (*tert*-butoxi).

Acetal: -CH(OR¹)(OR²) en el que R¹ y R² son independientemente sustituyentes acetal, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o, en el caso de un grupo acetal "cíclico", R¹ y R², tomados junto con dos átomos de oxígeno a los cuales están unidos y los átomos de carbono a los cuales están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos en el anillo. Los ejemplos de grupos acetal incluyen, pero no se limitan a -CH(OMe)₂, -CH(OEt)₂ y -CH(OMe)(OEt).

Hemiacetal: -CH(OH)(OR¹), en el que R¹ es un sustituyente hemiacetal, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos hemiacetal incluyen, pero no se limitan a -CH(OH)(OMe) y -CH(OH)(OEt).

Cetal: -CR(OR¹)(OR²), en el que R¹ y R² son como se definen para los acetales y R es un sustituyente cetal diferente de hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cetal incluyen, pero no se limitan a -C(Me)(OMe)₂, -C(Me)(OEt)₂, -C(Me)(OMe)(OEt), -C(Et)(OMe)₂, -C(Et)(OEt)₂ y -C(Et)(OMe)(OEt).

Hemicetal: -CR(OH)OR¹, en el que R¹ es como se define para hemiacetales y R es un sustituyente hemicetal diferente de hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos hemicetal incluyen, pero no se limitan a -C(Me)(OH)(OMe)₂, -C(Et)(OH)(OMe), -C(Me)(OH)(OEt) y -C(Et)(OH)(OEt).

Oxo (ceto, -ona): =O.

Tiona (tiocetona): =S.

Imino (imina): =NR, en el que R es un sustituyente imino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos éster incluyen, pero no se limitan a =NH, =NMe, =NEt y =NPh.

Formilo (carbaldehído, carboxaldehído): -C(=O)H.

Acilo (ceto): -C(=O)R, en el que R es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (también denominado como alquilacilo de 1 a 7 átomos de carbono o alcanilo de 1 a 7 átomos de carbono), un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono (también denominado como heterocicililacilo de 3 a 20 átomos de carbono) o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono (también denominado como arilacilo de 5 a 20 átomos de carbono), preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos acilo incluyen, pero no se limitan a -C(=O)CH₃ (acetilo), -C(=O)CH₂CH₃ (propionilo), -C(=O)C(CH₃)₃ (t-butirilo) y -C(=O)Ph (benzoilo, fenona).

Carboxi (ácido carboxílico): -C(=O)OH.

Tiocarboxi (ácido tiocarboxílico): -C(=S)SH.

Tiolocarboxi (ácido tiolocarboxílico): -C(=O)SH.

Tionocarboxi (ácido tionocarboxílico): -C(=S)OH.

Ácido Imídico: -C(=NH)OH.

Ácido Hidroxámico: -C(=NOH)OH.

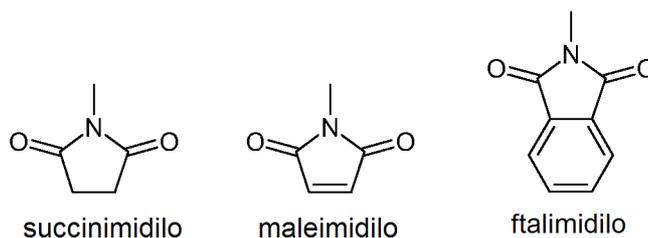
Éster (carboxilato, éster de ácido carboxílico, oxicarbonilo): -C(=O)OR, en el que R es un sustituyente éster, por

ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos éster incluyen, pero no se limitan a $-C(=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$ y $-C(=O)OPh$.

- 5 Aciloxi (éster inverso): $-OC(=O)R$, en el que R es un sustituyente aciloxi, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos aciloxi incluyen, pero no se limitan a $-OC(=O)CH_3$ (acetoxi), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, $-OC(=O)Ph$ y $-OC(=O)CH_2Ph$.
- 10 Oxicarboiloxi: $-OC(=O)OR$, en el que R es un sustituyente éster, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono, o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos éster incluyen, pero no se limitan a $-OC(=O)OCH_3$, $-OC(=O)OCH_2CH_3$, $-OC(=O)OC(CH_3)_3$ y $-OC(=O)OPh$.
- 15 Amino: $-NR^1R^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (también denominado como alquilamino de 1 a 7 átomos de carbono o dialquilamino de 1 a 7 átomos de carbono), un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente H o un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, o, en el caso de un grupo amino "cíclico", R^1 y R^2 , tomados junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 átomos en el anillo. Los grupos amino pueden ser primarios ($-NH_2$), secundarios ($-NHR^1$) o terciarios ($-NHR^1R^2$) y en forma catiónica pueden ser cuaternarios ($-NR^1R^2R^3$). Los ejemplos de grupos amino incluyen, pero no se limitan a $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-NHC(CH_3)_2$, $-N(CH_3)_2$, $-N(CH_2CH_3)_2$ y $-NHPH$. Los ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, pero no se limitan a aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino y tiomorfolino.
- 25 Amido (carbamoilo, carbamilo, aminocarbonilo, carboxamida): $-C(=O)NR^1R^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos amino incluyen, pero no se limitan a $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NHCH_3$, $-C(=O)N(CH_3)_2$, $-C(=O)NHCH_2CH_3$, y $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$, así como grupos amido en los cuales R^1 y R^2 junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos forman una estructura heterocíclica como en, por ejemplo, piperidinocarbonilo, morfolinocarbonilo, tiomorfolinocarbonilo y piperazinocarbonilo.
- 30

Tioamido (tiocarbamilo): $-C(=S)NR^1R^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen, pero no se limitan a $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$ y $-C(=S)NHCH_2CH_3$.

- 35 Acilamido (acilamino): $-NR^1C(=O)R^2$, en el que R^1 es un sustituyente amida, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono y R^2 es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos acilamida incluyen, pero no se limitan a $-NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$ y $-NHC(=O)Ph$. R^1 y R^2 juntos pueden formar una estructura cíclica como en, por ejemplo, succinimidilo, maleimidilo y ftalimidilo:
- 40

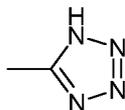


- 45 Aminocarboniloxi: $-OC(=O)NR^1R^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos aminocarboniloxi incluyen, pero no se limitan a: $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$ y $-OC(=O)NEt_2$.

- 50 Ureido: $-N(R^1)CONR^2R^3$ en el que R^2 y R^3 son independientemente sustituyentes amino, como se define para grupos amino, y R^1 es un sustituyente ureido, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos ureido incluyen, pero no se limitan a $-NHCONH_2$, $-NHCONHMe$, $-NHCONHEt$, $-NHCONMe_2$, $-NHCONEt_2$, $-NMeCONH_2$, $-NMeCONHMe$, $-NMeCONHEt$, $-NMeCONMe_2$ y $-NMeCONEt_2$.
- 55

Guanidino: $-NH-C(=NH)NH_2$.

Tetrazolilo: un anillo aromático de cinco miembros que tiene cuatro átomos de nitrógeno y un átomo de carbono,



- 5 Imino: =NR, en el que R es un sustituyente imino, por ejemplo, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente H o un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos imino incluyen, pero no se limitan a =NH, =NMe y =NEt.
- 10 Amidina (amidino): -C(=NR)NR₂, en el que cada R es un sustituyente amidina, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente H o un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos amidina incluyen, pero no se limitan a -C(=NH)NH₂, -C(=NH)NMe₂ y -C(=NMe)NMe₂.
- 15 Nitro: -NO₂.
Nitroso: -NO.
Azido: -N₃.
- 20 Ciano (nitrilo, carbonitrilo): -CN.
Isociano: -NC.
- 25 Cianato: -OCN.
Isocianato: -NCO.
- 30 Tiociano (tiocianato): -SCN.
Isotiociano (isotiocianato): -NCS.
Sulfhidrilo (tiol, mercapto): -SH.
- 35 Tioéter (sulfuro): -SR, en el que R es un sustituyente tioéter, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (también denominado como un grupo alquilitio de 1 a 7 átomos de carbono), un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilitio de 1 a 7 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a -SCH₃ y -SCH₂CH₃.
- 40 Disulfuro: -SS-R, en el que R es un sustituyente disulfuro, por un ejemplo un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (también denominado en la presente como disulfuro de alquilo de 1 a 7 átomos de carbono). Los ejemplos de grupos disulfuro de alquilo de 1 a 7 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a -SSCH₃ y -SSCH₂CH₃.
- 45 Sulfina (sulfinilo, sulfóxido): -S(O)R, en el que R es un sustituyente sulfina, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos sulfina incluyen, pero no se limitan a S(=O)CH₃ y -S(=O)CH₂CH₃.
- 50 Sulfona (sulfonilo): -S(=O)₂R, en el que R es un sustituyente sulfona, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono que incluye, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono fluorado o perfluorado. Los ejemplos de grupos sulfona incluyen, pero no se limitan a -S(=O)₂CH₃ (metansulfinilo, mesilo), -S(=O)₂CF₃ (trifilo), -S(=O)₂CH₂CH₃ (esilo), -S(=O)₂C₄F₉ (nonafililo), -S(=O)₂CH₂CF₃ (tresilo), -S(=O)₂CH₂CH₂NH₂ (taurilo), -S(=O)₂Ph (fenilsulfonilo, besilo), 4-metilfenilsulfonilo (tosilo), 4-clorofenilsulfonilo (closilo), 4-bromofenilsulfonilo (brosilo), 4-nitrofenilo (nosilo), 2-naftalensulfonato (napsilo) y 5-dimetilamino-naftalen-1-sulfonato (dansilo).
- 60 Ácido sulfinico (sulfino): -S(=O)OH, -SO₂H.

Ácido sulfónico (sulfo): $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$.

5 Sulfinato (éster de ácido sulfinico): $-\text{S}(\text{=O})\text{OR}$; en el que R es un sustituyente sulfinato, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos sulfinato incluyen, pero no se limitan a $-\text{S}(\text{=O})\text{OCH}_3$ (metoxisulfinilo; sulfinato de metilo) y $-\text{S}(\text{=O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$ (etoxisulfinilo; sulfinato de etilo).

10 Sulfonato (éster de ácido sulfónico): $-\text{S}(\text{=O})_2\text{OR}$, en el que R es un sustituyente sulfonato por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos sulfonato incluyen, pero no se limitan a $-\text{S}(\text{=O})_2\text{OCH}_3$ (metoxisulfonilo; sulfonato de metilo) y $-\text{S}(\text{=O})_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ (etoxisulfonilo; sulfonato de etilo).

15 Sulfiniloxi: $-\text{OS}(\text{=O})\text{R}$, en el que R es un sustituyente sulfiniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos sulfiniloxi incluyen, pero no se limitan a $\text{OS}(\text{=O})\text{CH}_3$ y $-\text{OS}(\text{=O})\text{CH}_2\text{CH}_3$.

20 Sulfoniloxi: $-\text{OS}(\text{=O})_2\text{R}$, en el que R es un sustituyente sulfoniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos sulfoniloxi incluyen, pero no se limitan a $-\text{OS}(\text{=O})_2\text{CH}_3$ (mesilato) y $-\text{OS}(\text{=O})_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (esilato).

25 Sulfato: $-\text{OS}(\text{=O})_2\text{OR}$; en el que R es un sustituyente sulfato, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos sulfato incluyen, pero no se limitan a $-\text{OS}(\text{=O})_2\text{OCH}_3$ y $-\text{SO}(\text{=O})_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$.

30 Sulfamilo (sulfamoilo; amida de ácido sulfinico; sulfinamida): $-\text{S}(\text{=O})\text{NR}^1\text{R}^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfamilo incluyen, pero no se limitan a $-\text{S}(\text{=O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{=O})\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(\text{=O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{S}(\text{=O})\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(\text{=O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ y $-\text{S}(\text{=O})\text{NHPh}$.

35 Sulfonamido (sulfinamoilo; amida de ácido sulfónico; sulfonamida): $-\text{S}(\text{=O})_2\text{NR}^1\text{R}^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfonamido incluyen, pero no se limitan a $-\text{S}(\text{=O})_2\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{=O})_2\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(\text{=O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{S}(\text{=O})_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(\text{=O})_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ y $-\text{S}(\text{=O})_2\text{NHPh}$.

40 Sulfamino: $-\text{NR}^1\text{S}(\text{=O})_2\text{OH}$, en el que R^1 es un sustituyente amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfamino incluyen, pero no se limitan a $-\text{NHS}(\text{=O})_2\text{OH}$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(\text{=O})_2\text{OH}$.

45 Sulfonamino: $-\text{NR}^1\text{S}(\text{=O})_2\text{R}$, en el que R^1 es un sustituyente amino, como se define para grupos amino y R es un sustituyente sulfonamino, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos sulfonamino incluyen, pero no se limitan a $-\text{NHS}(\text{=O})_2\text{CH}_3$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(\text{=O})_2\text{C}_6\text{H}_5$.

50 Sulfinamino: $-\text{NR}^1\text{S}(\text{=O})\text{R}$, en el que R^1 es un sustituyente amino, como se define para grupos amino y R es un sustituyente sulfinamino, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos sulfinamino incluyen, pero no se limitan a $-\text{NHS}(\text{=O})\text{CH}_3$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(\text{=O})\text{C}_6\text{H}_5$.

55 Fosfino (fosfina): $-\text{PR}_2$, en el que R^1 es un sustituyente fosfino, por ejemplo, -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos fosfino incluyen, pero no se limitan a $-\text{PH}_2$, $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$ y $-\text{P}(\text{Ph})_2$.

Fosfo: $-\text{P}(\text{=O})_2$.

60 Fosfinilo (óxido de fosfina): $-\text{P}(\text{=O})\text{R}_2$, R es un sustituyente fosfinilo, por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos fosfinilo incluyen, pero no se limitan a $-\text{P}(\text{=O})(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{=O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{=O})(\text{t-Bu})_2$ y $-\text{P}(\text{=O})(\text{Ph})_2$.

65 Ácido fosfónico (fosfono): $-\text{P}(\text{=O})(\text{OH})_2$.

Fosfonato (fosfonoéster): $-\text{P}(\text{=O})(\text{OR})_2$, en el que R es un sustituyente fosfonato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo de

1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos fosfonato incluyen, pero no se limitan a $-P(=O)(OCH_3)_2$, $-P(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-P(=O)O-t-Bu)_2$ y $-P(=O)(OPh)_2$.

5 Ácido fosfórico (fosfonooxi): $-OP(=O)(OH)_2$.

10 Fosfato (fosfonooxiéster): $-OP(=O)(OR)_2$, en el que R es un sustituyente fosfato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos fosfato incluyen, pero no se limitan a $-OP(=O)(OCH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(=O)O-t-Bu)_2$ y $-OP(=O)(OPh)_2$.

15 Ácido fosforoso: $-OP(OH)_2$.

20 Fosfito: $-OP(OR)_2$, en el que R es un sustituyente fosfito, por ejemplo, -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos fosfito incluyen, pero no se limitan a $-OP(OCH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(O-t-Bu)_2$ y $-OP(OPh)_2$.

25 Fosforoamidita: $-OP(OR^1)NR^2_2$, en el que R^1 y R^2 son sustituyentes fosforoamidita, por ejemplo, -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos fosforoamidita incluyen, pero no se limitan a $-OP(OCH_2CH_3)N(CH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)N(i-Pr)_2$ y $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$.

30 Fosforoamidato: $-OP(=O)(OR^1)NR^2_2$, en el que R^1 y R^2 son sustituyentes fosforoamidato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono, preferentemente -H, un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos fosforoamidato incluyen, pero no se limitan a $-OP(=O)(OCH_2CH_3)N(CH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)N(i-Pr)_2$ y $-OP(=O)(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$.

Alquileno

35 Alquileno de 3 a 12 átomos de carbono: El término "alquileno de 3 a 12 átomos de carbono", como se utiliza en la presente, se relaciona con una porción bidentada que se obtiene al separar dos átomos de hidrógeno, ya sea ambos del mismo átomos de carbono o uno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes, de un compuesto hidrocarburo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (a menos que se especifique en otro sentido), el cual puede ser alifático o alicíclico y el cual puede estar saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado. De esta manera, el término "alquileno" incluye las subclases alquenileno, alquinileno, cicloalquileno, etc., descritas más adelante.

40 Los ejemplos de grupos alquileno de 3 a 12 átomos de carbono saturados lineales incluyen, pero no se limitan a $-(CH_2)_n-$ en el que n es un número entero de 3 a 12, por ejemplo, $-CH_2CH_2CH_2-$ propilen (propileno), $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ butilen (butileno), $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ pentilen (pentileno) y $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ heptilen (heptileno).

45 Los ejemplos de grupos alquileno de 3 a 12 átomos de carbono saturados ramificados incluyen, pero no se limitan a $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_2CH_3)-$, $-CH_2(CH_2CH_3)CH_2-$ y $-CH_2CH(CH_2CH_3)CH_2-$.

50 Los ejemplos de grupos alquileno de 3 a 12 átomos de carbono insaturados parcialmente lineales (grupos alquenileno de 3 a 12 átomos de carbono y alquinileno) incluyen, pero no se limitan a $-CH=CH-CH_2-$, $-CH_2-CH=CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ y $-CH_2-CC-CH_2-$.

55 Los ejemplos de grupos alquileno de 3 a 12 átomos de carbono insaturados parcialmente ramificados (grupos alquenileno de 3 a 12 átomos de carbono y alquinileno) incluyen, pero no se limitan a $-C(CH_3)=CH-$, $-C(CH_3)=CH-CH_2-$, $-CH=CH-CH(CH_3)-$ y $-CC-CH(CH_3)-$.

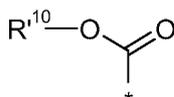
60 Los ejemplos de grupos alquileno de 3 a 12 átomos de carbono saturados alicíclicos (cicloalquilenos de 3 a 12 átomos de carbono) incluyen, pero no se limitan a ciclopentileno (por ejemplo, ciclopent-1,3-ileno) y ciclohexileno (por ejemplo, ciclohex-1,4-ileno).

65 Los ejemplos de grupos alquileno de 3 a 12 átomos de carbono parcialmente insaturados alicíclicos (cicloalquilenos de 3 a 12 átomos de carbono) incluyen, pero no se limitan a ciclopentileno (por ejemplo, 4-ciclopent-1,3-ileno), ciclohexenileno (por ejemplo, 2-ciclohexen-1,4-ileno; 3-ciclohexen-1,2-ileno; 2,5-ciclohexadien-1,4-ileno).

Grupo protector de oxígeno: el término "grupo protector de oxígeno" se refiere a una porción a la cual oculta un grupo hidroxilo y estos son bien conocidos en el ámbito. Una gran cantidad de grupos adecuados se describen en las páginas 23 a 200 de Greene, T.W. y Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, tercera edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999, la cual se incorpora en la presente como referencia. Las clases de interés particular incluyen éteres de sililo (por ejemplo, TMS, TBDMS), éteres de metilo sustituidos (por ejemplo, THP) y ésteres (por ejemplo, acetato).

Grupo protector de nitrógeno carbamato: el término "grupo protector de nitrógeno carbamato" se relaciona con una porción la cual oculta al nitrógeno en el enlace imina y estos son bien conocidos en el ámbito. Estos grupos tienen la siguiente estructura:

10

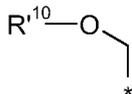


en la que R¹⁰ es R como se define en lo anterior. Se describen una gran cantidad de grupos adecuados en las páginas 503 a 549 de Greene, T.W. y Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, tercera edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999, la cual se incorpora en la presente como referencia.

15

Grupo protector de nitrógeno hemi-aminal: el término "grupo protector de nitrógeno hemi-aminal" pertenece a un grupo que tiene la siguiente estructura:

20



en la que R¹⁰ es R como se define en lo anterior. Se describen una gran cantidad de grupos adecuados en las páginas 633 a 647 de grupos protectores de amida de Greene, T.W. y Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, tercera edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

25

Conjugados

La presente invención proporciona Conjugados que comprenden un dímero de PBD conectado a una unidad de Ligando mediante una unidad de Engarce, en la que la unidad de engarce es -A¹-L¹-.

30

La unidad de Engarce está conectada a un extremo de la unidad de Ligando y en el otro extremo, al compuesto dimérico de PBD. A¹ es una unidad de Extensión y L¹ es un dipéptido. Por lo tanto, el conjugado puede representarse como:



35

en la que LU es -A¹-L¹- y p es de 1 a 20.

Preferencias

40

Pueden aplicarse las siguientes preferencias a todos los aspectos de la invención como se ha descrito anteriormente, o pueden referirse a un sólo aspecto. Las preferencias pueden combinarse entre sí en cualquier combinación.

En una realización, L¹ comprende un dipéptido. Los aminoácidos en el dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el dipéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el enlazador es un enlazador lábil a cathepsina, el dipéptido está en el sitio de acción para escisión mediada por cathepsina. Después, el dipéptido está en un sitio de reconocimiento para cathepsina.

45

En una realización, el grupo -X₁-X₂- en el dipéptido, -NH-X₁-X₂-CO-, se selecciona entre:

50

- Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-,
- Phe-Cit-,
- Leu-Cit-,
- Ile-Cit-,
- Phe-Arg- y

55

- Trp-Cit-;

cuando Cit es citrulina. En dicho dipéptido, -NH- es el grupo amino de X₁ y CO es el grupo carbonilo de X₂.

5 Preferentemente, el grupo -X₁-X₂- en el dipéptido, -NH-X₁-X₂-CO-, se selecciona entre:

- Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- 10 - Ala-Lys-, y
- Val-Cit-.

Más preferentemente, el grupo -X₁-X₂- en el dipéptido, -NH-X₁-X₂-CO-, es -Phe-Lys-, Val-Cit o -Val-Ala-.

15 Otras combinaciones de dipéptido de interés incluyen:

- Gly-Gly-,
- Pro-Pro-, y
- Val-Glu-.

20 Pueden usarse otras combinaciones de dipéptido, incluyendo las que se describen por Dubowchik et al., que se incorpora en el presente documento como referencia.

25 En una realización, la cadena lateral de los aminoácidos se protege químicamente, cuando es adecuado. El grupo protector de la cadena lateral puede ser un grupo como ser un grupo se expone más adelante. Las secuencias de aminoácidos protegidas se pueden escindir mediante enzimas. Por ejemplo, una secuencia dipeptídica que comprende un resto de Lys con la cadena lateral protegida con Boc se puede escindir por catepsina.

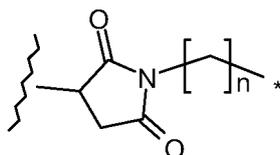
30 Los grupos protectores para la cadena lateral de aminoácidos son bien conocidos en la técnica y se describen en el Novabiochem Catalog. En Protective groups in Organic Synthesis, Greene and Wuts, se exponen estrategias de grupos protector adicionales.

A continuación, se muestran posibles grupos protectores de cadena lateral para aquellos aminoácidos que tienen una funcionalidad de cadena lateral reactiva:

- 35 Arg: Z, Mtr, Tos;
 Asn: Trt, Xan;
 Asp: Bzl, t-Bu;
 Cys: Acm, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;
 40 Glu: Bzl, t-Bu;
 Gln: Trt, Xan;
 His: Boc, Dnp, Tos, Trt;
 Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z;
 Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;
 45 Thr: Bz;
 Trp: Boc;
 Tyr: Bzl, Z, Z-Br.
 -X₁- se conecta directamente a A¹.

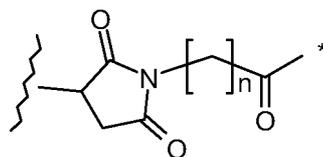
50 El grupo NH-X₁- (el término amino de X₁) se conecta a A¹. A¹ puede comprender la funcionalidad -CO- para formar así un enlace de amida con -X₁-.

En una realización, el grupo A¹ es:



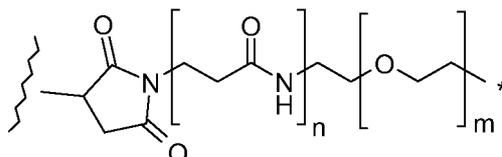
55 en la que el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

60 En una realización, el grupo A¹ es:



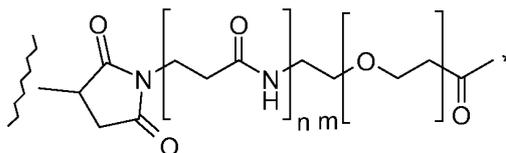
5 en la que el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, el grupo A¹ es:



10 en la que el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando, n es 0 o 1 y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 8, preferentemente de 4 a 8, lo más preferido 4 u 8.

15 En una realización, el grupo A¹ es:

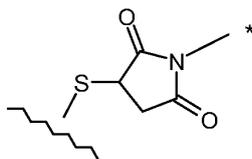


20 en la que el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando, n es 0 o 1 y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 8, preferentemente de 4 a 8, lo más preferido 4 u 8.

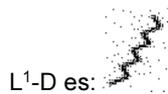
En una realización, la conexión entre la unidad de Ligando y A¹ es a través de un resto tiol de la unidad de Ligando un grupo maleimida de A¹.

25

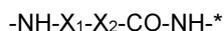
En una realización, la conexión entre la unidad de Ligando y A¹ es:



30 en la que el asterisco indica el punto de unión a la porción restante de A¹, y la línea ondulada indica el punto de unión a la porción restante de la unidad de Ligando. En esta realización, el átomo de S se obtiene normalmente de la unidad de Ligando.



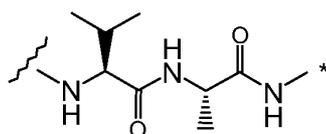
35



en el que -NH-X₁-X₂-CO es el dipéptido, -NH- es parte de la unidad de Fármaco, el asterisco indica el punto de unión al resto de la unidad de Fármaco y la línea ondulada indica el punto de unión a A¹.

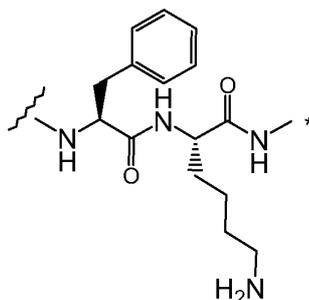
40

En una realización, el dipéptido es valina-alanina y L¹-D es:



en la que el asterisco, -NH- y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

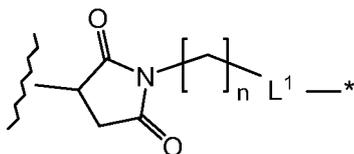
- 5 En una realización, el dipéptido es fenilalanina-lisina y L¹-D es:



en la que el asterisco, -NH- y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

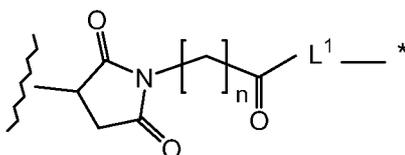
- 10 En una realización, el dipéptido es valina-citrulina.

En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



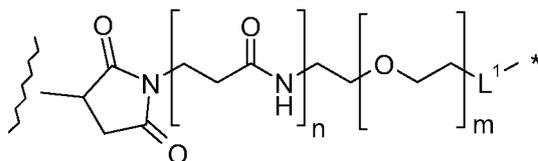
- 15 en la que el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

- 20 En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



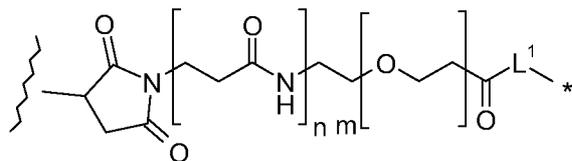
- 25 en la que el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



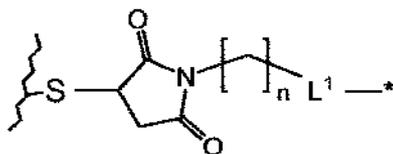
- 30 en la que el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando, n es 0 o 1 y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 8, preferentemente de 4 a 8, lo más preferido 4 u 8.

- 35 En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



5 en la que el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando, n es 0 o 1 y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 7, preferentemente de 3 a 7, lo más preferido 3 o 7.

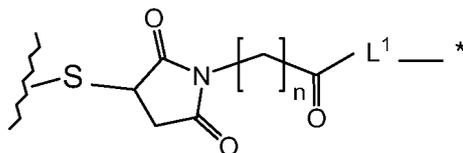
En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



10

en la que el asterisco indica el punto de unión a D, S es un grupo azufre de la unidad de Ligando, la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la unidad de Ligando y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

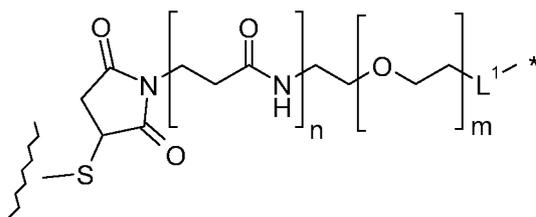
15 En una realización, los grupos L-A¹-L¹ son:



20

en el que el asterisco indica el punto de unión a D, S es un grupo azufre de la unidad de Ligando, la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la unidad de Ligando y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

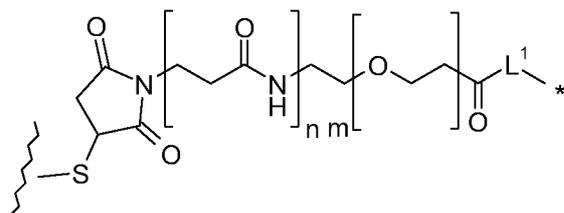
En una realización, los grupos L-A¹-L¹ son:



25

en el que el asterisco indica el punto de unión a D, S es un grupo azufre de la unidad de Ligando, la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la unidad de Ligando, n es 0 o 1 y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 8, preferentemente de 4 a 8, lo más preferido 4 u 8.

30 En una realización, los grupos L-A¹-L¹ son:



en los que el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de Ligando, n es 0 o 1 y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 7, preferentemente de 4 a 8, lo más preferido 4 u 8.

5 *Unidad de Ligando*

La unidad Ligando puede seleccionarse entre anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contenga al menos un sitio de unión a molécula diana, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento o cualquier otra molécula de unión a célula o sustrato que pueda unirse específicamente a una diana.

10 Los ejemplos de unidades de Ligando incluyen los agentes que se describen para su aplicación en el documento WO2007/085930.

15 Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un conjugado fármaco-anticuerpo (ADC).

En una realización el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; anticuerpo quimérico; anticuerpo humanizado; anticuerpo totalmente humano; o un anticuerpo de una sola cadena. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de uno de estos anticuerpos que tienen actividad biológica. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

20 El anticuerpo puede ser un diacuerpo, un anticuerpo de dominio (DAB) o un anticuerpo de una sola cadena.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

25 Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen los anticuerpos descritos en el documento WO2005/082023. Se prefieren particularmente los anticuerpos para antígenos asociados a tumor. Los ejemplos de aquellos antígenos conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitación, los antígenos asociados a tumor expuestos en el documento WO2005/082023. Véase, por ejemplo, páginas 41-55.

30 En algunas realizaciones, los conjugados se diseñan para que se dirijan a células tumorales mediante sus antígenos de superficie celular. Los antígenos pueden ser antígenos de superficie celular que sobreexpresados o expresados o expresados en momentos anormales o tipos de células. Preferentemente, el antígeno diana se expresa únicamente en células proliferativas (preferentemente células tumorales); sin embargo, esto raramente se observa en la práctica. Como resultado, los antígenos diana se seleccionan normalmente basándose en la expresión diferencial entre tejido proliferativo y sano.

35 Se han creado anticuerpos para que se dirijan a antígenos relacionados con tumores específicos, incluyendo:

40 Cripto, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, Glicoproteína NMB, CanAg, Her2 (ErbB2/Neu), CD56 (NCAM), CD70, CD79, CD138, PSCA, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), BCMA, E-selectina, EphB2, Melanotransferina, Muc16 y TMEFF2.

45 La unidad de Ligando está conectada a la unidad de Engarce. En una realización, la unidad de Ligando está conectada a A, cuando están presentes, de la unidad de Engarce.

En una realización, la conexión entre la unidad de Ligando y la unidad de Engarce es a través de un enlace tioéter.

En una realización, la conexión entre la unidad de Ligando y la unidad de Engarce es a través de un enlace disulfuro.

50 En una realización, la conexión entre la unidad de Ligando y la unidad de Engarce es a través de un enlace amida.

En una realización, la conexión entre la unidad de Ligando y la unidad de Engarce es a través de un enlace de éster.

55 En una realización, la conexión entre la unidad de Ligando y el se forma entre un grupo tiol de un resto de cisteína de la unidad de Ligando y un grupo maleimida de la unidad de Engarce.

60 Los restos de cisteína de la unidad de Ligando pueden estar disponibles para reacción con el grupo funcional de la unidad de Engarce para formar una conexión. En otras realizaciones, por ejemplo, en las que la unidad de Ligando es un anticuerpo, los grupos tiol del anticuerpo pueden participar en enlaces disulfuro intercatenarios. Estos enlaces intercatenarios pueden convertirse en grupos tiol libres mediante, por ejemplo, tratamiento del anticuerpo con DTT antes de reacción con el grupo funcional de la unidad de Engarce.

65 En algunas realizaciones, el resto de cisteína es uno introducido en la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Las posiciones para la inserción de cisteína por sustitución en cadenas de anticuerpo pesadas o ligeras incluyen las que se describen en la Solicitud de Estados Unidos Publicada n.º 2007-0092940 y la Publicación de Patente Internacional WO2008070593, que se incorporan en el presente documento.

Procedimientos de tratamiento

5 Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en un procedimiento de tratamiento. También se proporciona un procedimiento de tratamiento que comprende administrar un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para mostrar beneficio en un paciente. El beneficio puede ser por lo menos una disminución de por lo menos un síntoma. La cantidad real administrada, así como la tasa o velocidad y el curso de tiempo de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se va a tratar. La prescripción o tratamiento, por ejemplo, las decisiones respecto a la dosificación se encuentran bajo la responsabilidad de los profesionales de medicina generales y otros doctores en medicina.

15 Un compuesto se puede administrar solo o en combinación con otros tratamientos, ya sea de manera simultánea o secuencial, dependiendo de la condición que va a ser tratada. Los ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero no se limitan a quimioterapia (la administración de los agentes activos, que incluye, por ejemplo, medicamentos; cirugía y radioterapia.

20 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención y para uso de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del ingrediente activo, es decir, un compuesto de fórmula I, un excipiente, portador, amortiguador, estabilizante u otros materiales bien conocidos los expertos en el ámbito, farmacéuticamente aceptables. Los materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración la cual puede ser oral o por inyección, por ejemplo, por vía cutánea, subcutánea o intravenosa.

25 Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en comprimidos, cápsulas, polvos o formas líquidas. Un comprimido puede comprender un portador sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otras soluciones de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un portador sólido tal como una gelatina.

35 Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o para inyección en el sitio de enfermedad, el ingrediente activo puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable la cual esté libre de pirógeno y presente un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en el ámbito relevante serán capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como material para inyección con cloruro de sodio, inyección Ringer, inyección Ringer con lactato. Se pueden incluir, según se requiera, conservadores, estabilizantes, amortiguadores, antioxidantes y/u otros aditivos.

40 Los compuestos y conjugados se pueden usar para tratar enfermedades proliferativas y enfermedades autoinmunitarias. La expresión "enfermedad proliferativa" atañe a una proliferación celular indeseada o no controlada de células excesivas o anormales que no se desea, tales como un crecimiento neoplásico o hiperplásico, *in vitro* o *in vivo*.

45 Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, entre otras, proliferación celular benigna, premaligna y maligna, incluidas, entre otras, neoplasias y tumores (p. ej., histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer intestinal, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma ovárico, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer hepático, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (p. ej., de tejidos conectivos) y aterosclerosis. Otros cánceres de interés incluyen, pero sin limitación, neoplasias malignas hematológicas tales como leucemias y linfomas, tales como linfoma no Hodgkin y subtipos como DLBCL, zona marginal, zona del manto y folicular, linfoma de Hodgkin, LMA y otros cánceres de origen en linfocitos B o T.

55 Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen los siguientes: Artritis reumatoide, enfermedades autoinmunitarias desmielinizantes (por ejemplo, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), artritis psoriásica, oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Graves, glomerulonefritis, trastorno autoinmunitario hepatológico, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn), anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus de tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lúpica, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria de sexo masculino y femenino, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad mixta del tejido conectivo, poliarteritis nodosa, vasculitis

necrotizante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípidos, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmunitaria, pulmón del cuidador de aves, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, reacción a la transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eccema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmítis, eritema elevado y persistente, psoriasis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuchs, nefropatía de IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo de trasplante, miocardiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulemia de Waldenström, síndrome de Evan e insuficiencia gonadal autoinmunitaria.

En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es un trastorno de los linfocitos B (p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes de tipo 1), linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad del injerto contra el huésped, o de linfocitos Th2 (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis múltiple o enfermedad del injerto contra el huésped crónica). En general, los trastornos que implican células dendríticas incluyen trastornos de linfocitos Th1 o de linfocitos Th2. En algunas realizaciones, el trastorno inmunitario es un trastorno inmunitario mediado por los linfocitos T.

En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 mg/kg por dosis.

35 Inclusión de otras formas

A menos que se especifique en otro sentido, se incluye en lo anterior las formas bien conocidas iónicas, sales, solvatos y formas protegidos de estos sustituyentes. Por ejemplo, una referencia a ácido carboxílico (-COOH) también incluye la forma aniónica (carboxilato) (-COO⁻), una sal o solvato de la misma, así como formas protegidas convencionales. De manera similar, una referencia a un grupo amino incluye la forma protonada (-N⁺HR¹R²), una sal o solvato del grupo amino, por ejemplo, una sal clorhidrato, así como formas protegidas convencionales de un grupo amino. Similarmente, una referencia a un grupo hidroxilo también incluye la forma aniónica (-O⁻) o una sal o solvato de la misma, así como formas protegidas convencionales.

45 Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar una sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen en Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19 (1977).

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico o tiene un grupo funcional el cual puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a iones de metal alcalino tal como Na⁺ y K⁺, cationes alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes tales como Al³⁺.

Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a ion amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Los ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina así como aminoácidos tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

Si el compuesto es catiónico o tiene un grupo funcional el cual puede ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a aquellos derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

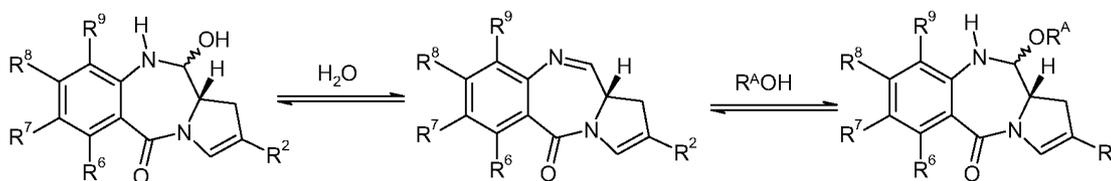
Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a aquellos derivados de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etandisulfónico, etansulfónico, fumárico, gluceptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalencarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metansulfónico, mucico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluensulfónico y valérico. Los ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero no se limitan a aquellos de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico y carboximetilcelulosa.

Solvatos

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se utiliza en la presente en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto activo, sal del compuesto activo) y solvente. Si el disolvente es agua, el solvato se puede denominar convenientemente como hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

Carbinolaminas

La invención incluye compuestos en los que un disolvente agrega a través de un enlace imina de la porción PBD, lo cual se ilustra en lo siguiente en el que el disolvente es agua o un alcohol ($R^A OH$, en el que R^A es un alquilo de 1 a 4 átomos de carbono):



Estas formas se pueden denominar las formas carbinolamina y carbinolamina éter de PBD. El balance de este equilibrio depende de las condiciones en las cuales se encuentren los compuestos, así como la naturaleza de la porción misma.

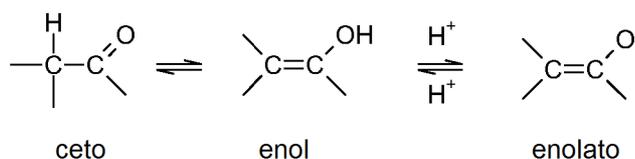
Estos compuestos particulares se pueden aislar en forma sólida, por ejemplo, por liofilización.

Isómeros

Pueden existir ciertos compuestos en una o más formas geométricas particulares, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas que incluyen pero que no se limitan a las formas cis y trans; las formas E y Z; las formas c, t y r, las formas endo y exo; las formas R, S y meso; las formas D y L; las formas d y l; las formas (+) y (-); las formas ceto, enol y enolato; las formas sin y anti; las formas clínica y anticlínica; las formas α y β y; las formas axial y ecuatorial; las formas de bote, silla, torcida, sobre y semisilla o silla alabiada; y combinaciones de las mismas; a continuación denominadas colectivamente como "isómeros" (o "formas isoméricas").

Nótese que, excepto como se describe en lo siguiente para las formas tautoméricas, se excluyen específicamente del término "isómeros" como se utilizan en la presente, están los isómeros estructurales (o constitutivos) (es decir, isómeros los cuales difieren en las conexiones entre los átomos en vez de simplemente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, $-OCH_3$, no debe considerarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-CH_2OH$. Similarmente, una referencia a orto-clorofenilo no debe considerarse como una referencia a su isómero estructural, metaclorofenilo. No obstante, una referencia a una clase de estructuras bien puede incluir formas estructuralmente isoméricas que se encuentren dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono incluye n-propilo e isopropilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y *tert*-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

La exclusión anterior no pertenece a las formas tautoméricas, por ejemplo, las formas ceto, enol y enolato como en, por ejemplo, los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado más adelante), imina/enamina, amida/iminoalcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiolo, N-nitroso/hiroxiazolo y nitro/acinitro.



5 Nótese que se incluyen específicamente en el término "isómero" los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica que incluye ^1H , ^2H (D) y ^3H , (T); C puede estar en cualquier forma isotópica que incluye ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica que incluye ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

10 A menos que se especifique en otro sentido, una referencia a un compuesto particular incluye la totalidad de las formas isoméricas que incluye mezclas racémicas (completas o parciales) y otras mezclas de los mismos. Los procedimientos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de las formas isoméricas se conocen en el ámbito o se obtienen fácilmente al adaptar los procedimientos descritos en la presente, o procedimientos conocidos, de una manera conocida.

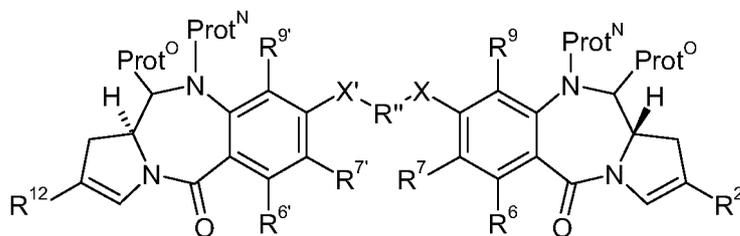
15 Rutas sintéticas generales

La síntesis de compuestos PBD se describe extensamente en las siguientes referencias, cuya descripción se mejora en la presente como referencia:

- 20 a) WO 00/12508 (páginas 14 a 30);
 b) WO 2005/023814 (páginas 3 a 10);
 c) WO 2004/043963 (páginas 28 a 29); y
 d) WO 2005/085251 (páginas 30 a 39).

25 Ruta de Síntesis

Los compuestos de la presente invención en la que R^{10} y R^{11} forman un enlace doble nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los cuales están unidos, se pueden sintetizar a partir de un compuesto de fórmula 2:

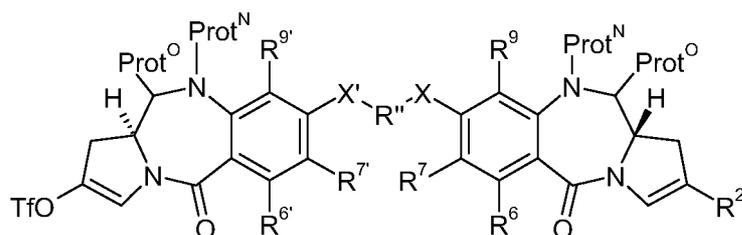


Fórmula 2

30 en la que R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , R^6 , R^7 , R^9 , R^{12} , X, X' y R'' son como se definen para compuestos de fórmula I, Prot^{N} es un grupo protector de nitrógeno para síntesis y Prot^{O} es un grupo de oxígeno protegido para síntesis o un grupo oxo, al desproteger el enlace imina por procedimientos estándar o convencionales.

35 El compuesto producido puede estar en su forma carbinolamina o carbinolaminaéter, dependiendo de los solventes usados. Por ejemplo, si Prot^{N} es Alloc y Prot^{O} es un grupo protector de oxígeno para síntesis, entonces la desprotección se lleva a cabo utilizando paladio para eliminar el grupo protector N10, seguido por eliminación del grupo protector de oxígeno para la síntesis. Si Prot^{N} es Troc y Prot^{O} es un grupo protector de oxígeno para síntesis, entonces la desprotección se lleva a cabo utilizando un par Cd/Pb para proporcionar el compuesto de fórmula (I). Si Prot^{N} es SEM o un grupo análogo y Prot^{O} es un grupo oxo, entonces el grupo oxo se puede separar por reducción lo que genera un intermediario carbinolamina protegido el cual después se puede tratar para separar el grupo protector SEM, seguido por la eliminación de agua. La reducción del compuesto de fórmula 2 se puede llevar a cabo, por ejemplo, por tetraborohidruro de litio mientras un medio adecuado para separar el grupo protector SEM es tratamiento con gel de sílice.

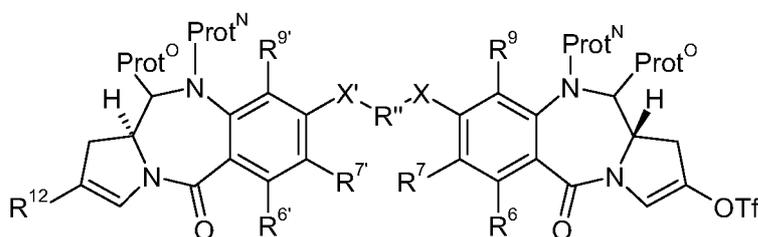
45 Los compuestos de fórmula 2 se pueden sintetizar a partir de un compuesto de fórmula 3a:



Fórmula 3a

5 en la que R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , R^6' , R^7' , R^9' , X , X' y R'' son como se definen para los compuestos de fórmula 2, por acoplamiento de un derivado organometálico que comprende R^{12} , tal como un derivado de organoboro. El derivado de organoboro puede ser un boronato o ácido borónico.

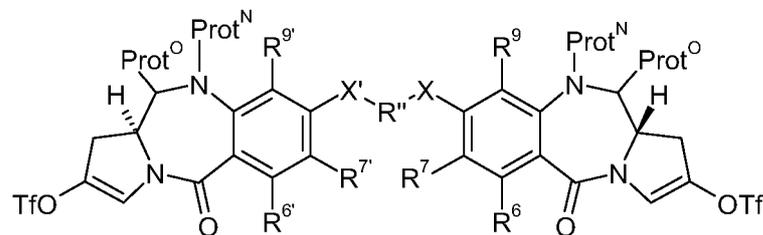
Los compuestos de fórmula 2 se pueden sintetizar a partir de un compuesto de fórmula 3b:



Fórmula 3b

10 en la que R^{12} , R^6 , R^7 , R^9 , R^6' , R^7' , R^9' , X , X' y R'' son como se definen para los compuestos de fórmula 2, por acoplamiento de un derivado organometálico que comprende R^2 , tal como un derivado de organoboro. El derivado de organoboro puede ser un boronato o ácido borónico.

15 Los compuestos de fórmulas 3a y 3b se pueden sintetizar a partir de un compuesto de fórmula 4:



Fórmula 4

20 en la que R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , R^6' , R^7' , R^9' , X , X' y R'' son como se definen para los compuestos de fórmula 2, por acoplamiento alrededor de un equivalente único (por ejemplo, 0,9 o 1 a 1,1 o 1,2) de un derivado organometálico tal como un derivado de organoboro, que comprende R^2 o R^{12} .

25 Los acoplamientos descritos en lo anterior habitualmente se llevan a cabo en presencia de un catalizador de paladio, por ejemplo, $Pd(PPh_3)_4$, $Pd(OCOCH_3)_2$, $PdCl_2$, $Pd_2(dba)_3$. El acoplamiento se puede llevar a cabo bajo condiciones estándar o también se puede llevar a cabo bajo condiciones de microondas.

30 Las dos etapas de acoplamiento habitualmente se llevan a cabo secuencialmente. Se pueden llevar a cabo con o sin purificación entre las dos etapas. Si no se lleva a cabo purificación, entonces se pueden llevar a cabo dos etapas en el mismo recipiente de reacción. La purificación habitualmente se requiere después de la segunda etapa de acoplamiento. La purificación del compuesto a partir de productos secundarios no deseados se puede llevar a cabo por cromatografía en columna o separación por intercambio iónico.

35 La síntesis de compuestos de fórmula 4 en los que $Prot^O$ es un grupo oxo y Pro^N es SEM se describen con detalle en WO 00/12508, la cual se incorpora en la presente como referencia. En particular, se hace referencia al esquema 7 en la página 24, en el que el compuesto anterior se denomina como el intermediario P. Este procedimiento de síntesis también se describe en WO 2004/043963.

La síntesis de compuestos de fórmula 4 en los que $Prot^O$ es un grupo de oxígeno protegido para síntesis se describen en WO 2005/085251, síntesis la cual se incorpora en la presente como referencia.

40 Los compuestos de fórmula I en los que R^{10} y $R^{10'}$ son H y R^{11} y $R^{11'}$ son SO_2M , se pueden sintetizar a partir de compuestos de fórmula I en los que R^{10} y R^{11} forman un enlace doble nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno

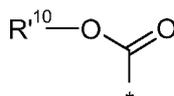
y de carbono a los cuales están unidos, por la adición de la sal bisulfita apropiada o sal sulfinato, seguido por una etapa de purificación apropiada. Se describen procedimientos adicionales en GB 2 053 894, la cual se incorpora en la presente como referencia.

5 Grupos protectores de nitrógeno para síntesis

Los grupos protectores de nitrógeno para síntesis son bien conocidos en el ámbito. En la presente invención, los grupos protectores de interés particular son grupos protectores de nitrógeno carbamato y grupos protectores de nitrógeno hemi-aminal.

10

Los grupos protectores de nitrógeno carbamato tienen la siguiente estructura:



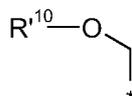
15 en la que R¹⁰ es R como se define en lo anterior. Una gran cantidad de grupos adecuados se describen en las páginas 503 a 549 de Greene, T.W. y Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999, la cual se incorpora en la presente como referencia.

20 Los grupos protectores preferidos particularmente incluyen Troc, Teoc, Fmoc, BOC, Doc, Hoc, TcBOC, 1-Adoc y 2-Adoc.

Otros grupos posibles son nitrobeniloxicarbonilo (por ejemplo, 4-nitrobeniloxicarbonilo) y 2-(fenilsulfonil)etoxicarbonilo.

25 Los grupos protectores los cuales se pueden separar con catalizadores de paladio no se prefieren, por ejemplo, Alloc.

Los grupos protectores de nitrógeno hemi-aminal tienen la siguiente estructura:



30

en la que R¹⁰ es R como se define en lo anterior. Se describen una gran cantidad de grupos adecuados en las páginas 633 a 647 como grupos protectores de amida de Greene, T.W. y Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999, la cual se incorpora en la presente como referencia. Los grupos que se describen en la presente se pueden aplicar a compuestos de la presente invención. Estos compuestos incluyen, pero no se limitan a SEM, MOM, MTM, MEM, BOM sustituido con nitro o metoxi, BOM, C₁₃CCH₂OCH₂-.

35

Grupos de oxígeno protegido para síntesis

40 Los grupos de oxígeno protegidos para síntesis son bien conocidos en el ámbito. Una gran cantidad de grupos protectores de oxígeno adecuados se describen en las páginas 23 a 2000 de Greene, T.W. y Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Las clases de interés particular incluyen sililéteres, metiléteres, alquiléteres, benciléteres, ésteres, acetatos, benzoatos, carbonatos y sulfonatos.

45

Los grupos protectores de oxígeno preferidos incluyen acetatos, TBS y THP.

Síntesis de Conjugados de Fármaco

50 Pueden prepararse Conjugados como se ha descrito previamente.

Los engarces que tienen un grupo maleimidilo (A) y un grupo peptídico (L¹) pueden prepararse como se describe en el documento WO2009-0117531. Otros engarces pueden prepararse de acuerdo con las referencias citadas en el presente documento o como se conoce por el experto en la materia.

55

Pueden prepararse compuestos de Engarce-Fármaco de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. El engarce de sustituyentes X basados en amina (de la unidad Fármaco del dímero de PDB) para dar grupos activos de las unidades de Engarce puede realizarse con procedimientos que se describen de forma general en las Patentes de

Estados Unidos n.º 6.214.345 y 7,498,298; y en el documento WO2009-0117531, o como se conozca de otra forma por el experto en la materia.

5 Pueden conjugarse anticuerpos con compuestos de Engarce-Anticuerpo como se describe en Doronina *et al.*, Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784). Brevemente, se reducen anticuerpos (4-5 mg/ml) en borato sódico 50 mM que contiene PBS a pH 7,4 con clorhidrato de tris(carboxietil)fosfina (TCEP) a 37 °C. El progreso de la reacción, que reduce los disulfuros intercatenarios, se supervisa por reacción con 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) y se deja continuar hasta que se consigue el nivel deseado de tioles/mAb. Después, el anticuerpo reducido se enfría a 0 °C y se alquila con 1,5 equivalentes de fármaco de maleimida-engarce por tiol de anticuerpo.

10 Después de 1 hora, la reacción se detiene mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetil cisteína.

15 El fármaco-engarce inactivado se retira por filtración de gel sobre una columna PD-10. Después, el ADC se filtra estéril a través de un filtro de jeringa 0,22 µm. Puede determinarse la concentración de proteína por análisis espectrales a 280 nm y 329 nm, respectivamente, con corrección para la contribución de la absorbancia de fármaco a 280 nm. Puede usarse cromatografía de exclusión de tamaño para determinar la magnitud de la agregación de anticuerpo y puede usarse HPLC de FI para determinar los niveles de NAC-fármaco inactivado-engarce restante.

20 Preferencias adicionales

Las siguientes preferencias pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención como se describe en lo anterior o se pueden relacionar con un aspecto único. Las preferencias se pueden combinar juntas en cualquier combinación.

25 En algunas modalidades, R⁶, R⁷, R⁹, R¹¹ e Y' son preferentemente iguales que R⁶, R⁷, R⁹, R¹⁰, R¹¹ e Y, respectivamente.

Engarce Dimérico

30 Y e Y' son preferentemente O.

R" preferentemente es un grupo alquileo de 3 a 7 átomos de carbono sin sustituyentes. De manera más preferente, R" es alquileo de 3, 5 o 7 átomos de carbono. De la manera más preferida, R" es alquileo de 3 o 5 átomos de carbono.

35 R⁶ a R⁹
R⁹ preferentemente es H.

R⁶ preferentemente se selecciona de H, OH, OR, SH, NH₂, nitro y halo y de manera más preferente es H o halo y de manera mucho más preferente es H.

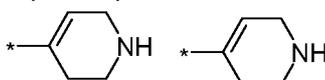
40 R⁷ preferentemente se selecciona de H, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR' y halo, y de manera más preferente se selecciona independientemente de H, OH y OR, en el que R preferentemente se selecciona de grupos alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, heterociclilo de 3 a 10 átomos de carbono y arilo de 5 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos. R de manera más preferente puede ser un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono el cual puede o no estar sustituido. Un sustituyente de interés es un grupo arilo de 5 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, fenilo). Los sustituyentes particularmente preferidos en las posiciones 7 son OMe y OCH₂Ph. Otros sustituyentes de interés particular son dimetilamino (es decir, -NMe₂); -(OC₂H₄)_qOMe, en el que q es de 0 a 2; heterociclilos de 6 átomos de carbono que contienen nitrógeno, incluyendo morfolino, piperidinilo y N-metil-piperazinilo.

50 Estas preferencias se aplican a R⁹, R⁶ y R⁷, respectivamente.

R²

55 A en R² puede ser un grupo fenilo o un grupo heteroarilo de 5 a 7 átomos de carbono por ejemplo, furanilo, tiofenilo y piridilo. En algunas modalidades, A preferentemente es fenilo.

X es un grupo seleccionado entre la lista que comprende: OH, SH, CO₂H, COH, N=C=O, NHHN₂, CONHHN₂,



60 y NHR^N, donde R^N se selecciona entre el grupo que comprende H y alquilo C₁₋₄. X puede ser preferentemente: OH, SH, CO₂H, -N=C=O o NHR^N, y puede ser más preferentemente: OH, SH, CO₂H, -N=C=O o NH₂. Los grupos particularmente preferidos incluyen: OH, SH y NH₂, siendo NH₂ el grupo más preferido.

Q²-X puede estar en cualquiera de los átomos de anillo disponibles del grupo arilo de 5 a 7 átomos de carbono, pero

preferentemente está en el átomo del anillo que no está adyacente al enlace al resto del compuesto, es decir, preferentemente β o γ respecto al enlace del resto del compuesto. Por lo tanto, cuando el grupo arilo de 5 a 7 átomos de carbono (A) es fenilo, el sustituyente (Q^2-X) preferentemente está en las posiciones meta o para, y de manera más preferente está en la posición para.

5 En algunas modalidades, Q^1 es un enlace sencillo. En esas modalidades, Q^2 se selecciona de un enlace sencillo y $-Z-(CH_2)_n-$, en el que Z se selecciona de un enlace sencillo, O, S y NH, y es de 1 a 3. En algunas de estas modalidades, Q^2 es un enlace sencillo. En otras modalidades, Q^2 es $-Z-(CH_2)_n-$. En estas modalidades, Z puede ser O o S y n puede ser 1 o n puede ser 2. En otras de estas modalidades, Z puede ser un enlace sencillo y n puede ser 1.

10 En otras modalidades, Q^1 es $-CH=CH$.

15 En algunas modalidades, R2 puede ser $-A-CH_2-X$ y $-A-X$. En estas modalidades, X puede ser OH, SH, CO_2H , COH y NH_2 . En modalidades particularmente preferidas, X puede ser NH_2 .

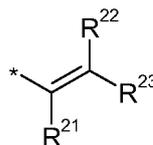
R^{12}

R^{12} se selecciona entre:

20 (a) alquilo alifático saturado C_{1-5} ;

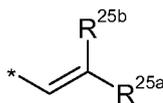
(b) cicloalquilo saturado C_{3-6} ;

25 (c)



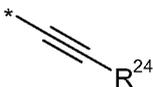
30 en la que cada uno de R^{21} , R^{22} y R^{23} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-3} saturado, alqueno C_{2-3} , alquinilo C_{2-3} y ciclopropilo, en los que el número total de átomos de carbono en el grupo R^{12} no es superior a 5;

(d)



35 en la que uno de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona entre: fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo metilo, metoxi; piridilo; y tiofenilo; y

40 (e)

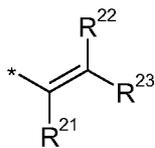


45 en la que R^{24} se selecciona entre: H; alquilo C_{1-3} saturado; alqueno C_{2-3} ; alquinilo C_{2-3} ; ciclopropilo; fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo metilo, metoxi; piridilo; y tiofenilo.

Cuando R^{12} es alquilo alifático saturado C_{1-5} , éste puede ser metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo. En algunas realizaciones, éste puede ser metilo, etilo o propilo (n-pentilo o isopropilo). En algunas de estas realizaciones, éste puede ser metilo. En otras realizaciones, éste puede ser butilo o pentilo, que pueden ser lineales o ramificados.

50 Cuando R^{12} es cicloalquilo C_{3-6} saturado, éste puede ser ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. En algunas realizaciones, éste puede ser ciclopropilo.

Cuando R^{12} es



5 cada uno de R²¹, R²² y R²³ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo, en el que el número total de átomos de carbono en el grupo R¹² no es superior a 5. En algunas realizaciones, el número total átomos de carbono en el grupo R¹² no es superior a 4 o no es superior a 3.

En algunas realizaciones, uno de R²¹, R²² y R²³ es H, seleccionándose los otros dos grupos entre H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo.

10 En otras realizaciones, dos de R²¹, R²² y R²³ son H, seleccionándose el otro grupo entre H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo.

En algunas realizaciones, los grupos que no son H se seleccionan entre metilo y etilo. En algunas de estas realizaciones, los grupos que no son H son metilo.

15 En algunas realizaciones, R²¹ es H.

En algunas realizaciones, R²² es H.

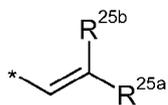
20 En algunas realizaciones, R²³ es H.

En algunas realizaciones, R²¹ y R²² son H.

25 En algunas realizaciones, R²¹ y R²³ son H.

En algunas realizaciones, R²² y R²³ son H.

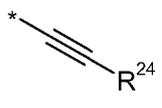
Cuando R¹² es



30 uno de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona entre: fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo, metilo, metoxi; piridilo; y tiofenilo. En algunas realizaciones, el grupo que no es H es fenilo opcionalmente sustituido. Si el sustituyente opcional de fenilo es halo, éste es preferentemente flúor. En alguna realización, el grupo fenilo está sin sustituir.

35

Cuando R¹² es



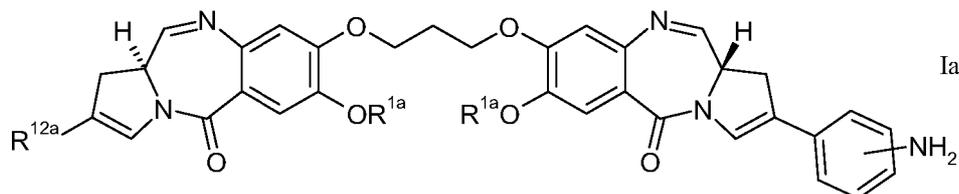
40 R²⁴ se selecciona entre: H; alquilo C₁₋₃ saturado; alqueno C₂₋₃; alquino C₂₋₃; ciclopropilo; fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo metilo, metoxi; piridilo; y tiofenilo. Si el sustituyente opcional de fenilo es halo, éste es preferentemente flúor. En alguna realización, el grupo fenilo está sin sustituir.

45 En algunas realizaciones, R²⁴ se selecciona entre H, metilo, etilo, etenilo y etinilo. En algunas de estas realizaciones, R²⁴ se selecciona entre H y metilo.

M y z

50 Se prefiere que M y M¹ sean cationes monovalentes farmacéuticamente aceptables, y son más preferentemente Na⁺. z es preferentemente 3.

Son compuestos particularmente preferidos de la presente invención los de la fórmula Ia:

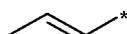


5 en la que R^{12a} se selecciona entre:

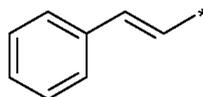
(a)



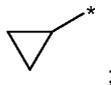
10 (b)



(c)



15 (d)



(e)



20

y el grupo amino está en las posiciones meta o para del grupo fenilo.

25 Tercer aspecto

Las preferencias expresadas en lo anterior para el primer aspecto se pueden aplicar a los compuestos de este aspecto, cuando sea apropiado.

Las preferencias para compuestos de fórmula I se aplican según sea adecuado a D en el sexto aspecto de la invención.

30 **Ejemplos**

Procedimientos Experimentales Generales

35 Las rotaciones ópticas se miden en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se proporcionan en g/100 ml. Los puntos de fusión se miden utilizando un aparato de determinación de punto de fusión digital (Electrothermal). Los espectros IR se registran en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT IR. Los espectros de ¹H y ¹³C por RMN se adquieren a 300 K utilizando un espectrómetro Bruker Avance RMN a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se reportan en relación a TMS (δ = 0,0 ppm) y las señales se designan como s (singlete), d (doblete), t (triplete), dt (doble triplete), dd (doble de dobletes), ddd (doble doblete de dobletes) o m (multiplete), con constantes de acoplamiento proporcionadas en hertzios (Hz). Los datos de espectroscopia de masas (EM) se recolectan utilizando un instrumento Waters Micromass ZQ acoplado a un equipo Waters 2695 HPLC con Waters 2996 PDA. Los parámetros Waters Micromass ZQ utilizados son: capilaridad (kV), 3,38; cono (V), 35; extractor (V), 3,0; temperatura fuente (°C), 100; temperatura de desolvatación (°C), 200; caudal de cono (l/h), 50; caudal de desolvatación (l/h), 250. Los datos de espectroscopia de masas de alta resolución (EMAR) se registran en Waters Micromass QTOF Global en el modo W positivo utilizando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas con metal para introducir las muestras en el instrumento. La cromatografía en capa delgada (CCD) se realiza en placas de aluminio de gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄) y cromatografía instantánea utilizando gel de sílice

(Merck 60, malla 230-400 ASTM). Excepto para los reactivos HOBt (NovaBiochem) y de soporte sólido (Argonaut), todas las sustancias químicas y solventes se adquieren de Sigma-Aldrich y se utilizan como se suministran, sin purificación adicional. Se preparan solventes anhidros por destilación bajo una atmósfera de nitrógeno seco en presencia de un agente de secado apropiado y se almacenan sobre tamices moleculares de 4Å o alambre de sodio.

5 El éter de petróleo se refiere a una fracción que ebulle a 40-60 °C.

El compuesto 1b se sintetiza como se describe en el documento WO 00/012508 (compuesto 210), el cual se incorpora en la presente como referencia.

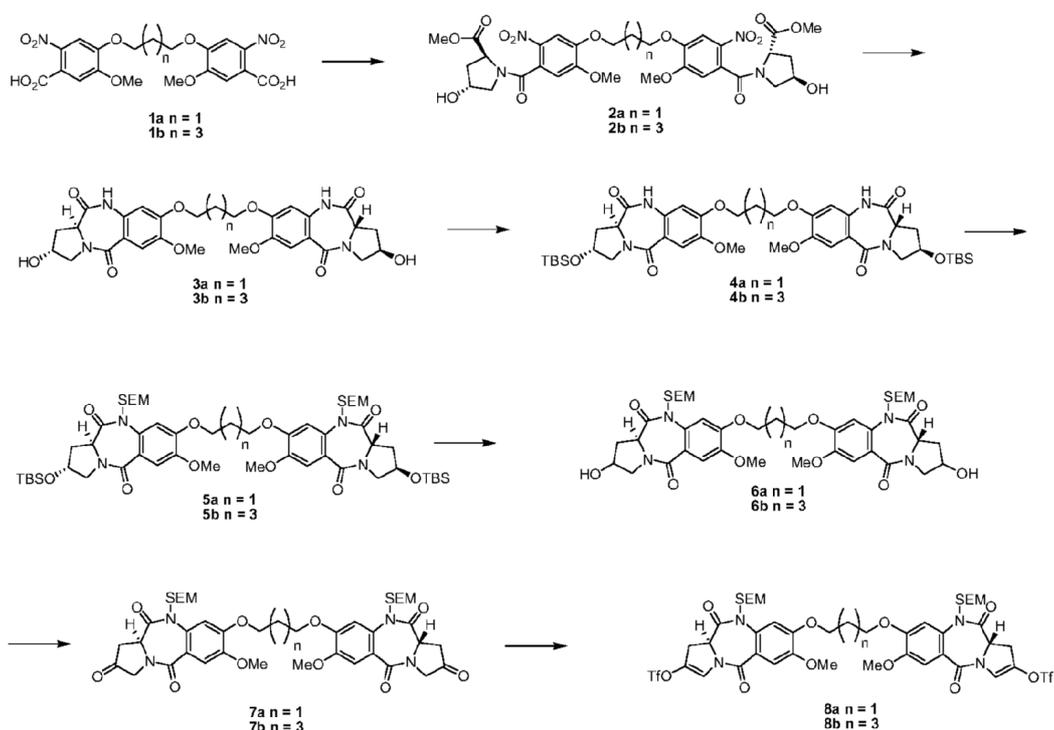
10 Condiciones Generales de CL/EM: La CLAP (Waters Alliance 2695) se corre utilizando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico 0,1 %) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composición inicial B 5 % durante 1,0 min, después de B 5 % hasta B 95 % en los siguientes 3 min. La composición se mantiene durante 0,5 min en B 95 % y después se regresa a B 5 % en 0,3 minutos. El tiempo de corrimiento de gradiente total es igual a 5 min. El caudal es de 3,0 ml/min, 400 µl se dividen vía un volumen muerto cero de una pieza en t, la cual pasa al interior del espectrómetro de masas. Intervalos de detección de longitud de onda: 220 a 400 nm. Tipo de función: arreglo de diodo (535 exploraciones). Columna: Phenomenex^{MR} Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm.

20 Las condiciones de CL/EM específicas para compuestos protegidos por un grupo Troc y un TBDM: separación cromatográfica de compuestos protegidos con Troc y TBDMS se realiza en un sistema Waters Alliance 2695 HPLC utilizando columna en fase inversa Onyx Monolithic (partículas de 3 µm, 50 x 4,6 mm) de Phenomenex Corp. La fase A móvil consiste de 5 % de acetonitrilo - 95 % de agua que contiene ácido fórmico 0,1 % y la fase móvil B consiste de 95 % de acetonitrilo - 5 % de agua que contiene ácido fórmico 0,1 %. Después de 1 min a B 5 %, la proporción de B se incrementa a B 95 % durante los siguientes 2,5 min y se mantiene a B 95 % durante 1 min adicional, antes de regresar a A 95 % en 10 s y reequilibrio durante 50 s adicionales, lo que proporciona un tiempo de corrida total de 5,0 min. El caudal se mantiene a 3,0 ml/min.

30 Condiciones de CL/EM para el Ejemplo 4: La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico al 0,1 %) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico al 0,1 %). Gradiente: composición inicial B al 5 % durante 2,0 min aumentando a B al 50 % en 3 min. La composición se mantuvo durante 1 min a B al 50 %, antes de aumentar a B al 95 % en 1 minuto. Después, la composición de gradiente descendió a B al 5 % en 2,5 minutos y se mantuvo a este porcentaje durante 0,5 minutos. El tiempo de realización de gradiente total corresponde a 10 min. Caudal 1,5 ml/min, se separaron 400 µl mediante una pieza con forma de T de volumen muerto cero que entra en el espectrómetro de masas. Intervalo de longitud de onda de detección: de 220 a 400 nm. Tipo de función: matriz de diodos (535 exploraciones). Columna: Phenomenex[®] Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm

35

Síntesis de intermediarios clave



- 5 (a) 1,1'-[[[(propano-1,3-diil)dioxi]bis[(5-metoxi-2-nitro-1,4-fenilen)carbonil]]bis[4-hidroxipirrolidino-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo] (2a)

Procedimiento A: Se agrega una cantidad catalítica de DMF (2 gotas) a una solución agitada del nitroácido 1a (1,0 g, 2,15 mmol) y cloruro de oxalilo (0,95 ml, 1,36 g, 10,7 mmol) en 20 ml de THF seco. Se permite que la mezcla de reacción se agite durante 16 horas a temperatura ambiente y el disolvente se separa por evaporación al vacío. El residuo resultante se vuelve a disolver en 20 ml de THF seco y la solución de cloruro de ácido se agrega a gotas a una mezcla agitada de clorhidrato de 4-hidroxipirrolidino-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (859 mg, 4,73 mmol) y TEA (6,6 ml, 4,79 g, 47,3 mmol) en 10 de THF a -30°C (el hielo seco/etilenglicol) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se permite que la mezcla de reacción se caliente hasta la temperatura ambiente y se agite durante 3 horas adicionales después de lo cual la CCD (95:5 v/v CHCl₃/MeOH) y CL/EM (2,45 min (EN+) *m/z* (intensidad relativa) 721 ([M + H]⁺, 20)) muestra la formación del producto. Se elimina por evaporación giratoria el exceso de THF y el residuo resultante se disuelve en 50 ml de DCM. La fase orgánica se lava con 15 ml de HCl 1N, 2 veces, 15 ml de NaHCO₃ saturado, 2 veces, 20 ml de H₂O, 30 ml de salmuera y se seca con MgSO₄. La filtración y evaporación del disolvente proporciona el producto crudo como un aceite de color oscuro. La purificación por cromatografía instantánea (gradiente de elusión: CHCl₃ 100 % a 96:4 v/v de CHCl₃/MeOH) aísla la amida pura 2a como un vidrio de color naranja (840 mg, 54 %).

Procedimiento B: Se agrega cloruro de oxalilo (9,75 ml, 14,2 g, 111 mmol) a una suspensión agitada del nitroácido 1a (17,3 g, 37,1 mmol) y 2 ml de DMF en 200 ml de DCM anhidra. Después de efervescencia inicial la suspensión de reacción se vuelve una solución y la mezcla se permite que se agite a temperatura ambiente durante 16 horas. Se confirma la conversión al cloruro de ácido por tratamiento de una muestra de la mezcla de reacción con MeOH y el bis-metiléster resultante se observa por CL/EM. La mayor parte del disolvente se separa por evaporación al vacío, la solución concentrada resultante se vuelve a disolver en una cantidad mínima de DCM seco y se tritura con dietiléter. El precipitado amarillo resultante se recolecta por filtración, se lava con dietiléter frío y se seca durante 1 hora en un horno al vacío, a 40°C. Se agrega en porciones cloruro de ácido sólido durante un período de 25 minutos a una suspensión agitada de clorhidrato de 4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato de (2S,4R)-metilo (15,2 g, 84,0 mmol) y TEA (25,7 ml, 18,7 g, 185 mmol) en 150 ml de DMC a -40°C (hielo seco/CH₃CN). Inmediatamente, la reacción se completa a considerar por CL/EM (2,47 min (EN+) *m/z* (intensidad relativa) 721 ([M + H]⁺, 100)), la mezcla se diluye en 150 ml de DCM y se lava con 300 ml de HCl 1N, 300 ml de NaHCO₃ saturado, 300 ml de salmuera, se filtra (a través de un separador de fase) y el disolvente se evapora al vacío para proporcionar el producto crudo 2a como un sólido naranja (21,8 g, 82 %).

Datos Analíticos: $[\alpha]^{22}_D = -46,1^\circ$ ($c = 0,47$, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (rotámeros) δ 7,63 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,79-4,72 (m, 2H), 4,49-4,28 (m, 6H), 3,96 (s, 6H), 3,79 (s, 6H), 3,46-3,38 (m, 2H), 3,02 (d, 2H, $J = 11,1$ Hz), 2,48-2,30 (m, 4H), 2,29-2,04 (m, 4H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (rotámeros) δ 172,4, 166,7, 154,6, 148,4, 137,2, 127,0, 109,7, 108,2, 69,7, 65,1, 57,4, 57,0, 56,7, 52,4, 37,8, 29,0; IR (ATR, CHCl_3) 3410 (a), 3010, 2953, 1741, 1622, 1577, 1519, 1455, 1429, 1334, 1274, 1211, 1177, 1072, 1050, 1008, 871 cm^{-1} ; EM (EN^+) m/z (intensidad relativa) 721 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 47), 388 (80); HRMS $[\text{M} + \text{H}]^+$ teórico $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{16}$ m/z 721,2199, encontrado (EN^+) m/z 721,2227.

(a) 1,1'-[[*(pentan-1,5-diil)dioxi*]bis[(5-metoxi-2-nitro-1,4-fenil)carbonil]]bis[4-hidroxipirrolidin-2-carboxilato] de (2*S*,4*R*)-metilo] (**2b**)

La preparación a partir de **1b**, de acuerdo con el **Procedimiento B** proporciona el producto puro como una espuma naranja (75,5 g, 82 %).

Datos Analíticos: (EN^+) m/z (intensidad relativa) 749 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100).

(b) 1,1'-[[*(propan-1,3-diil)dioxi*]bis(11*aS*,2*R*)-2-(hidroxi)-7-metoxi-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (**3a**)

Procedimiento A: Una suspensión de 10 % de Pd/C (7,5 g, 10 % p/p) en 40 ml de DMF se agrega a una solución del nitroéster **2a** (75 g, 104 mmol) en 360 ml de DMF. La suspensión se hidrogena en un aparato de hidrogenación Parr durante 8 horas. El avance de la reacción se monitorea por CL/EM (2,12 min (EN^+) m/z (intensidad relativa) 597 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100), (EN^-) m/z (intensidad relativa) 595 ($[\text{M} + \text{H}]^+$ 100) después de que se ha detenido la captación de hidrógeno. Se separa el Pd/C sólido por filtración y el filtrado se concentra por evaporación giratoria bajo vacío (inferior a 10 mbar) a 40°C para proporcionar un aceite oscuro que contiene trazas de DMF y carbón vegetal residual. El residuo se digiere en 500 ml de EtOH a 40°C en un baño de agua (baño de evaporador giratorio) y la suspensión resultante se filtra a través de Celite y se lava con 500 ml de etanol para proporcionar un filtrado claro. Se agregan a la solución hidrato de hidrazina (10 ml, 321 mmol) y la mezcla de reacción se calienta a reflujo. Después de 20 minutos se observa la formación de un precipitado blanco y se permite que el reflujo continúe durante 30 minutos adicionales. Se permite que la mezcla se enfríe hasta la temperatura ambiente y el precipitado se recupera por filtración, se lava con dietiléter (2*1 volumen de precipitado) y se seca en un desecador al vacío para proporcionar **3a** (50 g, 81 %).

Procedimiento B: Una solución del nitroéster **2a** (6,80 g, 9,44 mmol) en 300 ml de MeOH se agrega níquel Raney^{MR} (4 extremos de espátula grande de una suspensión ~50 % en H_2O) y gránulos para evitar burbujeo en un matraz de fondo redondo de 3 cuellos. La mezcla se calienta a reflujo y después se trata a gotas con una solución de hidrato de hidrazina (5,88 ml, 6,05 g, 188 mmol) en 50 ml de MeOH, hasta el punto en el que se observa efervescencia vigorosa. Cuando la adición ha finalizado (~ 30 minutos) se agrega con precaución níquel Raney^{MR} adicional hasta que cesa la efervescencia y se descarga el color amarillo inicial de la mezcla de reacción. La mezcla se calienta a reflujo durante 30 minutos adicionales, punto en el cual la reacción se considera completa por CCD (90:10 v/v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) y CL/EM (2,12 min (EN^+) m/z (intensidad relativa) 597 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100)). Se permite que la mezcla de reacción se enfríe a aproximadamente 40°C y después el exceso de níquel se separa por filtración a través de un embudo de sinterización sin succión al vacío. El filtrado se reduce en volumen por evaporación al vacío punto en el cual se forma un precipitado incoloro el cual se recolecta por filtración y se seca en un desecador al vacío para proporcionar **3a** (5,40 g, 96 %).

Datos Analíticos: $[\alpha]^{27} = +404^\circ$ ($c = 0,10$, DMF); RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,2 (s, 2H, NH), 7,26 (s, 2H), 6,73 (s, 2H), 5,11 (d, 2H, $J = 3,98$ Hz, OH), 4,32-4,27 (m, 2H), 4,19-4,07 (m, 6H), 3,78 (s, 6H), 3,62 (dd, 2H, $J = 12,1$, 3,60 Hz), 3,43 (dd, 2H, $J = 12,0$, 4,72 Hz), 2,67-2,57 (m, 2H), 2,26 (p, 2H, $J = 5,90$ Hz), 1,99-1,89 (m, 2H); RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 169,1,164,0, 149,9, 144,5, 129,8, 117,1,111,3, 104,5, 54,8, 54,4, 53,1,33,5, 27,5; IR (ATR, puro) 3438, 1680, 1654, 1610, 1605, 1516, 1490, 1434, 1379, 1263, 1234, 1216, 1177, 1156, 1115, 1089, 1038, 1018, 952, 870 cm^{-1} ; EM (EN^+) m/z (intensidad relativa) 619 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 10), 597 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 52), 445 (12), 326 (11); HREM $[\text{M} + \text{H}]^+$ teórico $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{10}$ m/z 597,2191, encontrado (EN^+) m/z 597,2205.

(b) 1,1'-[[*(pentan-1,5-diil)dioxi*]bis(11*aS*,2*R*)-2-(hidroxi)-7-metoxi-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5, 11-diona] (**3b**)

La preparación a partir de **2b** de acuerdo con el **Procedimiento A** proporciona el producto como un sólido blanco (22,1 g, 86 %).

Datos Analíticos: EM (EN^-) m/z (intensidad relativa) 623,3 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100);

(c) 1,1'-[[*(propan-1,3-diil)dioxi*]bis(11*aS*,2*R*)-2-(*terc*-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (**4a**)

Se agregan TBSCI (317 mg, 2,1 mmol) e imidazol (342 mg, 5,03 mmol) a una solución turbia de la tetralactama **3a** (250 mg, 0,42 mmol) en 6 ml de DMF anhidra. Se permite que la mezcla se agite bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 horas, después de lo cual el tiempo de reacción se considera completo según CL/EM (3,90 min (EN^+) m/z (intensidad relativa) 825 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100)). La mezcla de reacción se vierte en hielo (~ 25 ml) y se permite que se caliente

hasta la temperatura ambiente con agitación. El precipitado blanco resultante se recolecta por filtración al vacío, se lava con H₂O, dietiléter y se seca en el desecador al vacío para proporcionar **4a** puro (252 mg, 73 %).

Datos Analíticos: $[\alpha]^{23}_D = +234^\circ$ (c = 0,41, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,65 (s, 2H, NH), 7,44 (s, 2H), 6,54 (s, 2H), 4,50 (p, 2H, J = 5,38 Hz), 4,21-4,10 (m, 6H), 3,87 (s, 6H), 3,73-3,63 (m, 4H), 2,85-2,79 (m, 2H), 2,36-2,29 (m, 2H), 2,07-1,99 (m, 2H), 0,86 (s, 18H), 0,08 (s, 12H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170,4, 165,7, 151,4, 146,6, 129,7, 118,9, 112,8, 105,3, 69,2, 65,4, 56,3, 55,7, 54,2, 35,2, 28,7, 25,7, 18,0, -4,82 y -4,86; IR (ATR, CHCl₃) 3235, 2955, 2926, 2855, 1698, 1695, 1603, 1518, 1491, 1446, 1380, 1356, 1251, 1220, 1120, 1099, 1033 cm⁻¹; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 825 ([M + H]⁺, 62), 721 (14), 440 (38); HREM [M + H]⁺ teórico C₄₁H₆₀N₄O₁₀Si₂ *m/z* 825,3921, encontrado (EN⁺) *m/z* 825,3948.

(c) 1,1'-[[*pentan-1,5-diol*]dioxi]bis(11*aS*,2*R*)-2-(*terc-butildimetilsililoxi*)-7-*metoxi*-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-*pirrolo*[2,1-*c*][1,4]-*benzodiazepin*-5,11-*diona*] (**4b**)

La preparación a partir de **3b** de acuerdo con el procedimiento anterior proporciona el producto como un sólido blanco (27,3 g, 93 %).

Datos Analíticos: EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 853,8 ([M + H]⁺ 100), (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 851,6 ([M - H]⁻, 100).

(d) 1,1'-[[*propan-1,3-diol*]dioxi]bis(11*aS*,2*R*)-2-(*terc-butildimetilsililoxi*)-7-*metoxi*-10-((2-(*trimetilsilil*)*etoxi*)*metil*)-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-*pirrolo*[2,1-*c*][1,4]-*benzodiazepin*-5,11-*diona*] (**5a**)

Una solución de n-BuLi (4,17 ml de una solución 1,6 M en hexano, 6,67 mmol) en 10 ml de THF anhidro se agrega a gotas a una suspensión agitada de la tetralactama **4a** (2,20 g, 2,67 mmol) en 30 ml de THF anhidro a -30°C (hielo seco/etilenglicol) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se permite que la mezcla de reacción se agite a esta temperatura durante 1 hora (ahora un color naranja rojizo) punto en el cual se agrega a gotas una solución de SEMCl (1,18 ml, 1,11 g, 6,67 mmol) en 10 ml de THF anhidro. Se permite que la mezcla de reacción se caliente lentamente hasta la temperatura ambiente y se agita durante 16 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se considera completa según CCD (EtOAc) y CL/EM (4,77 min (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1085 ([M + H]⁺ 100)). Se separa el THF por evaporación al vacío y el residuo resultante se disuelve en 60 ml de EtOAc, se lava con 20 ml de H₂O, 20 ml de salmuera, se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora al vacío para proporcionar el producto crudo. La purificación por cromatografía instantánea (80:20 v/v de hexano/EtOAc) proporciona la tetralactama **5a** protegida con N10-SEM pura como un aceite (2,37 g, 82 %).

Datos Analíticos: $[\alpha]^{23}_D = +163^\circ$ (c = 0,41, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 (s, 2H), 7,22 (s, 2H), 5,47 (d, 2H, J = 9,98 Hz), 4,68 (d, 2H, J = 9,99 Hz), 4,57 (p, 2H, J = 5,77 Hz), 4,29-4,19 (m, 6H), 3,89 (s, 6H), 3,79-3,51 (m, 8H), 2,87-2,81 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, J = 5,81 Hz), 2,03-1,90 (m, 2H), 1,02-0,81 (m, 22H), 0,09 (s, 12H), 0,01 (s, 18H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170,0, 165,7, 151,2, 147,5, 133,8, 121,8, 111,6, 106,9, 78,1,69,6, 67,1,65,5, 56,6, 56,3, 53,7, 35,6, 30,0, 25,8, 18,4, 18,1, -1,24, -4,73; IR (ATR, CHCl₃) 2951,1685, 1640, 1606, 1517, 1462, 1433, 1360, 1247, 1127, 1065 cm⁻¹; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1113 ([M + Na]⁺, 48), 1085 ([M + H]⁺, 100), 1009 (5), 813 (6); HREM [M + H]⁺ teórica C₅₃H₈₈N₄O₁₂Si₄ *m/z* 1085,5548, encontrado (EN⁺) *m/z* 1085,5542.

(d) 1,1'-[[*pentan-1,5-diol*]dioxi]bis(11*aS*,2*R*)-2-(*terc-butildimetilsililoxi*)-7-*metoxi*-10-((2-(*trimetilsilil*)*etoxi*)*metil*)-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-*pirrolo*[2,1-*c*][1,4]-*benzodiazepin*-5,11-*diona*] (**5b**)

La preparación a partir de **4b** de acuerdo con el procedimiento novedoso proporciona el producto como una espuma naranja claro (46,9 g, 100 %), utilizada sin purificación adicional.

Datos Analíticos: EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1114 ([M + H]⁺, 90), (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1158 ([M + 2Na]⁻ 100).

(e) 1,1'-[[*propan-1,3-diol*]dioxi]bis(11*aS*,2*R*)-2-*hidroxi*-7-*metoxi*-10-((2-(*trimetilsilil*)*etoxi*)*metil*)-1,2,3,10,11,11*a*-hexahidro-5*H*-*pirrolo*[2,1-*c*][1,4]-*benzodiazepin*-5,11-*diona*] (**6a**)

Una solución de TBAF (5,24 ml de una solución 1,0 M en THF, 5,24 mmol) se agrega a una solución agitada de bis-silil éter **5a** (2,58 g, 2,38 mmol) en 40 ml de THF a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3,5 horas, el análisis de la mezcla de reacción por CCD (95:5 v/v CHCl₃/MeOH) mostró que la reacción había finalizado. La mezcla de reacción se vierte en una solución de 100 ml de NH₄Cl saturado y se extrae con 30 ml de EtOAc, 3 veces. Las fases orgánicas combinadas se lavan con 60 ml de salmuera, se secan con MgSO₄, se filtran y evaporan al vacío para proporcionar el producto crudo. La purificación por cromatografía instantánea (gradiente de elusión: 100 % de CHCl₃ a 96:4 v/v de CHCl₃/MeOH) proporciona la tetralactama **6a** pura como una espuma blanca (1,78 g, 87 %).

Datos Analíticos: $[\alpha]^{23}_D = +202^\circ$ (c = 0,34, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,28 (s, 2H), 7,20 (s, 2H), 5,44 (d, 2H, J = 10,0 Hz), 4,72 (d, 2H, J = 10,0 Hz), 4,61-4,58 (m, 2H), 4,25 (t, 4H, J = 5,83 Hz), 4,20-4,16 (m, 2H), 3,91-3,85 (m, 8H), 3,77-3,54 (m, 6H), 3,01 (s amplio, 2H, OH), 2,96-2,90 (m, 2H), 2,38 (p, 2H, J = 5,77 Hz), 2,11-2,05 (m, 2H), 1,00-0,91 (m, 4H), 0,00 (s, 18H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 169,5, 165,9, 151,3, 147,4, 133,7, 121,5, 111,6, 106,9,

79,4, 69,3, 67,2, 65,2, 56,5, 56,2, 54,1,35,2, 29,1,18,4, -1,23; IR (ATR, CHCl₃) 2956, 1684, 1625, 1604, 1518, 1464, 1434, 1361,1238, 1058, 1021 cm⁻¹; EM (EN+) *m/z* (intensidad relativa) 885 ([M + 29]⁺, 70), 857 ([M + H]⁺, 100), 711 (8), 448 (17); HREM [M + H]⁺ teórico C₄₁H₆₀N₄O₁₂Si₂ *m/z* 857,3819, encontrado (EN⁺) *m/z* 857,3826.

- 5 (e) 1,1'-[[[pentan-1,5-diol]dioxi]bis(11aS,2R)-2-hidroxi-7-metoxi-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-pirrolol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5, 11-diona] (6b)

La preparación a partir de 5b de acuerdo con el procedimiento anterior proporciona el producto como una espuma blanca (15,02 g).

- 10 **Datos Analíticos:** EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 886 ([M + H]⁺, 10), 739,6 (100), (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 884 ([M - H]⁻, 40).

- 15 (f) 1,1'-[[[propan-1,3-diol]dioxi]bis(11aS)-11-sulfo-7-metoxi-2-oxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-pirrolol[2,1-c]-[1,4]benzodiazepin-5, 11-diona]] (7a)

- 20 **Procedimiento A:** Una solución de hipoclorito de sodio 0,37 M (142,5 ml, 52,71 mmol, 2,4 equivalentes) se agrega a gotas a una mezcla agitada vigorosamente del diol 6a (18,8 g, 21,96 mmol, 1 equivalente), TEMPO (0,069 g, 0,44 mmol, 0,02 equivalentes) y una solución de bromuro de potasio 0,5 M (8,9 ml, 4,4 mmol, 0,2 equivalentes) en 115 ml de DCM a 0°C. La temperatura se mantiene entre 0°C y 5°C al ajustar la velocidad de adición. La emulsión amarilla resultante se agita de 0°C a 5°C durante 1 hora. La CCD (EtOAc) y CL/EM [3,53 min (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 875 ([M + Na]⁺, 50), (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 852 ([M - H]⁻, 100)] indica que la reacción ha finalizado.

- 25 La mezcla de reacción se filtra, la fase orgánica se separa y la capa acuosa se retrolava con DCM (2 veces). Las porciones orgánicas combinadas se lavan con salmuera (1 vez), se secan con MgSO₄ y se evaporan para proporcionar una espuma amarilla. La purificación por cromatografía en columna instantánea (gradiente de elusión 35/65 v/v de n-hexano/EtOAc, 30/70 a 25/75 v/v de n-hexano/EtOAc) proporciona la bis-cetona 7a como una espuma blanca (14,1 g, 75 %).

- 30 Se utiliza una solución de hipoclorito de sodio, grado reactivo, disponible con cloro 10-13 %. Esto se supone que es 10 % (10 g de NaClO en 100 g) y se calcula que es 1,34 M en NaClO. Se prepara una solución concentrada a partir de esto al diluirla a 0,37M con agua. Esto proporciona una solución de aproximadamente pH 14. Se ajusta el pH a 9,3 a 9,4 mediante la adición de NaHCO₃ sólido. Una alícuota de este concentrado se utiliza después de manera que proporciona 2,4 moles equivalentes para la reacción.

- 35 Ante la adición de la solución blanqueadora se observa un incremento inicial en la temperatura. Se controla la velocidad de adición para mantener la temperatura entre 0°C y 5°C. La mezcla de reacción se forma como una emulsión de color amarillo limón espesa.

- 40 La oxidación es una adaptación del procedimiento descrito por Thomas Fey et al., *J. Org. Chem.*, 2001,66, 8154-8159.

- 45 **Procedimiento B:** Se agrega en porciones TCCA sólido (10,6 g, 45,6 mmol) a una solución agitada de alcohol 6a (18,05 g, 21,1 mmol) y TEMPO (123 mg, 0,78 mmol) en 700 ml de DCM anhidro a 0°C (hielo/acetona). La mezcla de reacción se agita a 0°C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 15 minutos tiempo después del cual la CCD (EtOAc) y CL/EM [3,57 min (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 875 ([M + Na]⁺, 50)] muestra que la reacción ha finalizado. La mezcla de reacción se filtra a través de Celite y el filtrado se lava con 400 ml de NaHCO₃ acuoso saturado, 400 ml de salmuera, se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora al vacío para proporcionar el producto crudo. La purificación por cromatografía instantánea en columna (80:20 v/v EtOAc/hexano) proporciona la bis-cetona 7a como una espuma (11,7 g, 65 %).

- 50 **Procedimiento C:** Una solución de DMSO anhidro (0,72 ml, 0,84 g, 10,5 mmol) en 18 ml de DCM seco se agrega a gotas durante un período de 25 min a una solución agitada de cloruro de oxalilo (2,63 ml de una solución 2,0 M en DCM, 5,26 mmol) bajo una atmósfera de nitrógeno a -60°C (N₂/CHCl₃ líquido). Después de agitar a -55°C durante 20 minutos una suspensión del sustrato 6a (1,5 g, 1,75 mmol) en 36 ml de DCM seco se agrega a gotas durante un período de 30 min a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 50 minutos adicionales a -55°C, se agrega a gotas una solución de TEA (3,42 ml, 2,49 g; 24,6 mmol) en 18 ml de DCM seco durante un periodo de 20 min a la mezcla de reacción. Se permite que la mezcla de reacción agitada se caliente hasta la temperatura ambiente (~1,5 h) y después se diluye con 50 ml de DCM. La solución orgánica se lava con 25 ml de HCl 1N, 2 veces, 30 ml de H₂O, 30 ml de salmuera y se seca con MgSO₄. La filtración y evaporación del disolvente al vacío proporciona el producto crudo el cual se purifica por cromatografía en columna instantánea (80:20 v/v de EtOAc/hexano) para proporcionar la bis-cetona 7a como una espuma (835 mg, 56 %).
- 60

Datos Analíticos: $[\alpha]_D^{20} = +291^\circ$ ($c = 0,26$, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,32 (s, 2H), 7,25 (s, 2H), 5,50 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,75 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,60 (dd, 2H, $J = 9,85,3,07$ Hz), 4,31-4,18 (m, 6H), 3,89-3,84 (m, 8H), 3,78-3,62 (m, 4H), 3,55 (dd, 2H, $J = 19,2, 2,85$ Hz), 2,76 (dd, 2H, $J = 19,2, 9,90$ Hz), 2,42 (p, 2H, $J = 5,77$ Hz), 0,98-0,91 (m, 4H), 0,00 (s, 18H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 206,8, 168,8, 165,9, 151,8, 148,0, 133,9, 120,9, 111,6, 107,2, 78,2, 67,3, 65,6, 56,3, 54,9, 52,4, 37,4, 29,0, 18,4, -1,24; IR (ATR, CHCl_3) 2957, 1763, 1685, 1644, 1606, 1516, 1457, 1434, 1360, 1247, 1209, 1098, 1066, 1023 cm^{-1} ; EM (EN^+) m/z (intensidad relativa) 881 ($[\text{M} + 29]^+$ 38), 853 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100), 707 (8), 542 (12); HREM $[\text{M} + \text{H}]^+$ teórico $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Si}_2$ m/z 853,3506, encontrado (EN^+) m/z 853,3502.

(f) 1,1'-[[[pentan-1,5-diil]dioxi]bis[(11aS)-11-sulfo-7-metoxi-2-oxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-pirrol[2,1-c]-[1,4]benzodiazepin-5,11-diona)] (7b)

La preparación a partir de 6b de acuerdo con el Procedimiento C proporciona el producto como una espuma blanca (10,5 g, 76 %).

Datos Analíticos: EM (EN^+) m/z (intensidad relativa) 882 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 30), 735 (100), (EN^-) m/z (intensidad relativa) 925 ($[\text{M} + 45]^-$, 100), 880 ($[\text{M} - \text{H}]^-$, 70).

(g) 1,1'-[[[propan-1,3-diil]dioxi]bis(11aS)-7-metoxi-2-[[trifluorometil]sulfonil]oxi]-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1,10,11,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona (8a)

Se inyecta 2,6-lutidina anhidra (5,15 ml, 4,74 g, 44,2 mmol) en una porción a una solución agitada vigorosamente de bis-cetona 7a (6,08 g, 7,1 mmol) en 180 ml de DCM seco a -45°C (baño de enfriamiento con hielo seco/acetonitrilo) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se inyecta rápidamente a gotas anhídrido triflico anhidro, tomado de una ampolleta recién abierta (7,2 ml, 12,08 g, 42,8 mmol), mientras se mantiene la temperatura a -40°C o inferior. Se permite que la mezcla de reacción se agite a -45°C durante 1 hora, punto en el cual la CCD (50/50 v/v de n-hexano/EtOAc) muestra el consumo completo del material inicial. La mezcla de reacción fría se diluye de inmediato con 200 ml de DCM y, con agitación vigorosa, se lava con 100 ml de agua 1 vez, con 200 ml de una solución de ácido cítrico 5 %, 1 vez, con 200 ml de NaHCO_3 saturado, 100 ml de salmuera y se seca con MgSO_4 . La filtración y evaporación del disolvente al vacío proporciona el producto crudo el cual se purifica por cromatografía instantánea en columna (gradiente de elusión:90,10 v/v de n-hexano/EtOAc a 70:30 v/v de n-hexano/EtOAc) para proporcionar bis-enoltriflato 8a como una espuma amarilla (5,5 g, 70 %).

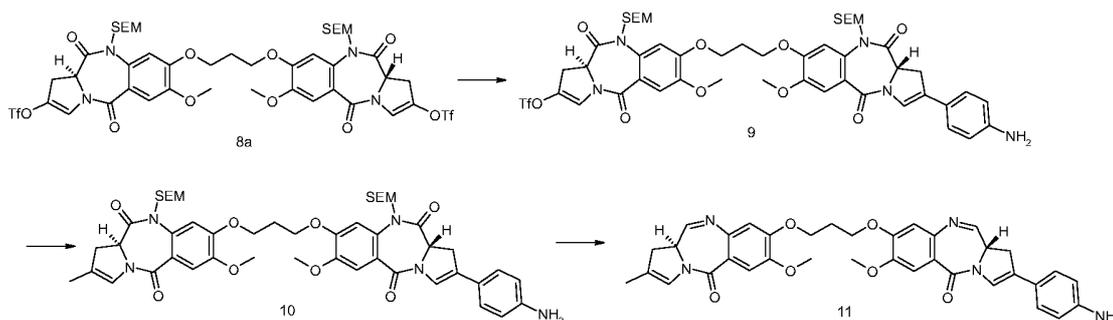
Datos Analíticos: $[\alpha]_D^{24} = +271^\circ$ ($c = 0,18$, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (s, 2H), 7,26 (s, 2H), 7,14 (t, 2H, $J = 1,97$ Hz), 5,51 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,76 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,62 (dd, 2H, $J = 11,0, 3,69$ Hz), 4,32-4,23 (m, 4H), 3,94-3,90 (m, 8H), 3,81-3,64 (m, 4H), 3,16 (ddd, 2H, $J = 16,3, 11,0, 2,36$ Hz), 2,43 (p, 2H, $J = 5,85$ Hz), 1,23-0,92 (m, 4H), 0,02 (s, 18H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 167,1, 162,7, 151,9, 148,0, 138,4, 133,6, 120,2, 118,8, 111,9, 107,4, 78,6, 67,5, 65,6, 56,7, 56,3, 30,8, 29,0, 18,4, -1,25; IR (ATR, CHCl_3) 2958, 1690, 1646, 1605, 1517, 1456, 1428, 1360, 1327, 1207, 1136, 1096, 1060, 1022, 938, 913 cm^{-1} ; EM (EN^+) m/z (intensidad relativa) 1144 ($[\text{M} + 28]^+$, 100), 1117 ($[\text{M} + \text{H}]^+$ 48), 1041 (40), 578 (8); HREM $[\text{M} + \text{H}]^+$ teórico $\text{C}_{43}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{18}\text{Si}_2\text{S}_2\text{F}_6$ m/z 1117,2491, encontrado (EN^+) m/z 1117,2465.

(g) 1,1'-[[[pentan-1,5-diil]dioxi]bis(11aS)-7-metoxi-2-[[trifluorometil]sulfonil]oxi]-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1,10,11,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (8b)

La preparación a partir de 7b de acuerdo con el procedimiento anterior proporciona el bis-enol triflato como una espuma amarilla claro (6,14 g, 82 %).

Datos Analíticos: (EN^+) m/z (intensidad relativa) 1146 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 85).

50 Ejemplo 1



(a) (S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-2-(trifluorometilsulfonil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)propoxi)-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5,11(10H,11aH)-diona (9)

- 5 Se agrega Pd(PPh₃)₄ sólido (20,18 mg, 17,46 μmol) a una solución agitada del triflato 8a (975 mg, 0,87 mmol), 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano-2-il)anilina (172 mg, 0,79 mmol) y Na₂CO₃ (138 mg, 1,3 mmol) en 13 ml de tolueno, 6,5 ml de EtOH y 6,5 ml de H₂O. Se permite que la solución oscura se agite bajo una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas tiempo después del cual el análisis por CCD (EtOAc) y CL/EM muestra la formación del producto monoacoplado deseado y así como la presencia de material inicial que no ha reaccionado. Se separa el disolvente por evaporación giratoria bajo presión reducida y el residuo resultante se divide entre 100 ml de H₂O y 100 ml de EtOAc, después de separación posterior de las capas, la fase acuosa se extrae nuevamente con 25 ml de EtOAc, 2 veces. Las fases orgánicas combinadas se lavan con 50 ml de H₂O, 60 ml de salmuera, se secan con MgSO₄, se filtran y evaporan al vacío para proporcionar el producto de Suzuki crudo. El producto de Suzuki crudo se somete a cromatografía instantánea (EtOAc 40 %/hexano 60 % → EtOAc 70 %/hexano 30 %). La eliminación del exceso de eluyente por evaporación giratoria bajo presión reducida proporciona 399 mg del producto 9 deseado con un rendimiento de 43 %.

RMN ¹H: (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,40 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,27 (s amplio, 3H), 7,24 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 7,15 (t, 1H, J = 2,0 Hz), 6,66 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 5,52 (d, 2H, J = 10,0 Hz), 4,77 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 4,76 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 4,62 (dd, 1H, J = 3,7, 11,0 Hz), 4,58 (dd, 1H, J = 3,4, 10,6 Hz), 4,29 (t, 4H, J = 5,6 Hz), 4,00-3,85 (m, 8H), 3,80 - 3,60 (m, 4H), 3,16 (ddd, 1H, J = 2,4, 11,0, 16,3 Hz), 3,11 (ddd, 1H, J = 2,2, 10,5, 16,1 Hz), 2,43 (p, 2H, J = 5,9 Hz), 1,1-0,9 (m, 4H), 0,2 (s, 18H). RMN ¹³C: (CDCl₃, 100 MHz) δ 169,8, 168,3, 164,0, 162,7, 153,3, 152,6, 149,28, 149,0, 147,6, 139,6, 134,8, 134,5, 127,9 (metino), 127,5, 125,1, 123,21, 121,5, 120,5 (metino), 120,1 (metino), 116,4 (metino), 113,2 (metino), 108,7 (metino), 79,8 (metileno), 79,6 (metileno), 68,7 (metileno), 68,5 (metileno), 67,0 (metileno), 66,8 (metileno), 58,8 (metino), 58,0 (metino), 57,6 (metoxi), 32,8 (metileno), 32,0 (metileno), 30,3 (metileno), 19,7 (metileno), 0,25 (metilo).

(b) (S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-2-metil-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)propoxi)-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5,11(10H,11aH)-diona (10)

Una suspensión del triflato de 4-anilino [véase Patente 33], (210 mg, 0,198 mmol), ácido metilborónico (50 mg, 0,835 mmol, 4,2 equiv.), óxido de plata I (139 mg, 0,600 mmol, 3 equiv.), fosfato potásico tribásico (252 mg, 1,2 equiv, p/p), trifenilarsina (36,7 mg, 0,12 mmol, 0,6 equiv.) y bis(benzonitrilo)dicloro-paladio II (11,5 mg, 0,030 mmol, 0,15 equiv.) se calentó a 75 °C en dioxano seco (8 ml), en un tubo cerrado herméticamente, en una atmósfera inerte durante 1,5 h. La mezcla de reacción se filtró a través de algodón hidrófilo, el lecho de filtro se enjuagó con acetato de etilo y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con EtOAc al 80 %:Hexano al 20 %. La retirada del exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida produjo el producto en forma de una espuma de color blanquecino (100 mg, 0,11 mmol, rendimiento del 54 %).

40 Tr de CL-EM 3,87 min, 926 (M + H)

(c) (S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-8-iloxi)propoxi)-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-5(11aH)-ona (11)

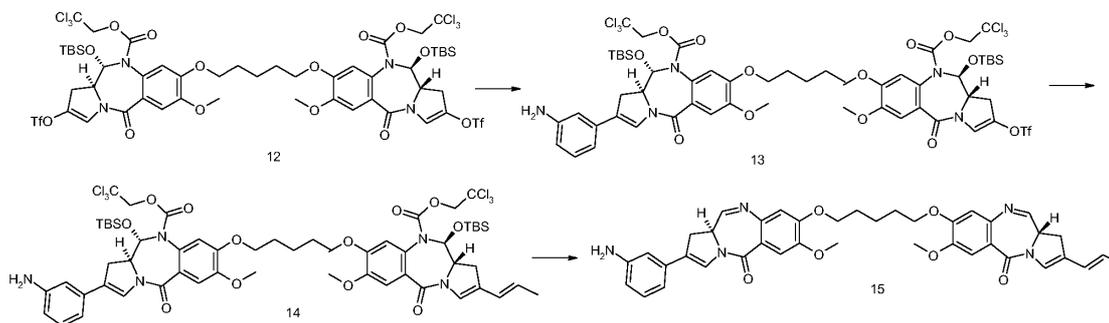
45 Se añadió LiBH₄ recién preparado (44 mg, 2,0 mmol, 20 equiv.) a una solución agitada de la SEM-dilactama (90 mg, 0,1 mmol) en THF (8 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 0,5 h, momento en el que el análisis por CL-EM reveló que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se repartió entre agua (50 ml) y cloroformo (100 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (50 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío.

50 El residuo resultante se trató con DCM (5 ml), EtOH (14 ml), H₂O (7 ml) y gel de sílice (10 g). La mezcla viscosa se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 5 días. La mezcla se filtró lentamente a través de un embudo de sinterización y el residuo se sílice se lavó con CHCl₃ al 90 %: MeOH al 10 % (~250 ml) hasta que la actividad UV desapareció por completo del eluyente. La fase orgánica se lavó con H₂O (50 ml) y salmuera 60 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el material en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de CHCl₃ al 100 %: MeOH al 0 % a CHCl₃ al 96 %: MeOH al 4 %) para proporcionar el dímero de PBD (5 mg, rendimiento del 8 %).

55 Tr de CL-EM 2,30 min, 634 (M + H)

60 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,14 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,71-6,64 (m, 1H), 4,34-4,03 (m, 6H), 3,86 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,55-3,37 (m, 1H), 3,36-3,19 (m, 1H), 3,17-3,00 (m, 1H), 2,96-2,80 (m, 1H), 1,75 (s, 3H).

Ejemplo 2



5 (a) (11*S*,11*aS*)-2,2,2-tricloroetil 2-(3-aminofenil)-11-(*terc*-butildimetilsililoxi)-8-(5-((11*S*,11*aS*)-11-(*terc*-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-10-((2,2,2-tricloroetoxi)carbonil)-2-(trifluorometilsulfoniloxi)-5,10,11,11*a*-tetrahidro-1*H*-pirrolo [2,1-*c*][1,4] benzodiazepindiazepin-8-iloxi)pentiloxi)-7-metoxi-5-oxo-11,11*a*-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepina-10(5*H*)-carboxilato **13**

10 Se añadió ácido 3-aminobencenoborónico sólido (60,3 mg) a una solución del *bis* triflato **12** protegido con Troc (Compuesto **44**, documento WO2006/111759) (600 mg, 0,41 mmol), carbonato sódico (65 mg, 0,61 mmol) y *tetraquis* trifenilfosfina paladio (0,012 mmol) en tolueno (10,8 ml), etanol (5,4 ml) y agua (5,4 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de magnesio. El exceso de disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida y el residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; elusión de gradiente EtOAc/hexano 20/80→30/70→40/60→60/40) para retirar el *bis*-triflato sin reaccionar. La retirada del exceso de eluyente de las fracciones seleccionadas proporcionó el compuesto deseado con un rendimiento del 41 % (230 mg, 0,163 mmol)

20 Tr de CL-EM 4,28 min, 1411 (M + H); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) □ □ 7,44 (s a, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,25 (s, 1H), 7,20 (s, 1H), 7,16 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,84 – 6,73 (m, 3H), 6,70 (s a, 1H), 6,62 (dd, *J* = 7,9, 1,7 Hz, 1H), 6,66 – 6,58 (m, 2H), 5,25 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,24 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,24 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,22 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 4,17 – 4,07 (m, 2H), 4,08 – 3,89 (m, 10H), 3,43 – 3,28 (m, 2H), 2,85 (d, *J* = 1,65 Hz, 2H), 2,07 – 1,90 (m, 4H), 1,78 – 1,63 (m, 2H), 0,94 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,30 (s, 6H), 0,27 (s, 6H).

25 (b) (11*S*,11*aS*)-2,2,2-tricloroetil 2-(3-aminofenil)-11-(*terc*-butildimetilsililoxi)-8-(5-((11*S*,11*aS*)-11-(*terc*-butildimetilsililoxi)-2-propenil-7-metoxi-5-oxo-10-((2,2,2-tricloroetoxi)carbonil)-5,10,11,11*a*-tetrahidro-1*H*-pirrolo [2,1-*c*][1,4] benzodiazepindiazepin-8-iloxi)pentiloxi)-7-metoxi-5-oxo-11,11*a*-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepina-10(5*H*)-carboxilato **14**

30 Se añadió ácido 1-propenil borónico sólido (7,1 mg, 0,084 mmol) a una solución del triflato **13** protegido con Troc (73 mg, 0,052 mmol), carbonato sódico (18 mg, 0,17 mmol) y *tetraquis* trifenilfosfina paladio (3 mg) en tolueno (1 ml), etanol (0,5 ml) y agua (0,5 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. El exceso de disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida y el residuo resultante se eluyó a través de un lecho de gel de sílice con acetato de etilo. La retirada del exceso de eluyente de las fracciones seleccionadas proporcionó el producto acoplado **14** (40 mg, 0,031 mmol, 59 %). Tr de CL-EM 4,38 min, (1301, 1305, 1307, 1308, 1310 masas múltiples debidas a los isótopos de cloro)

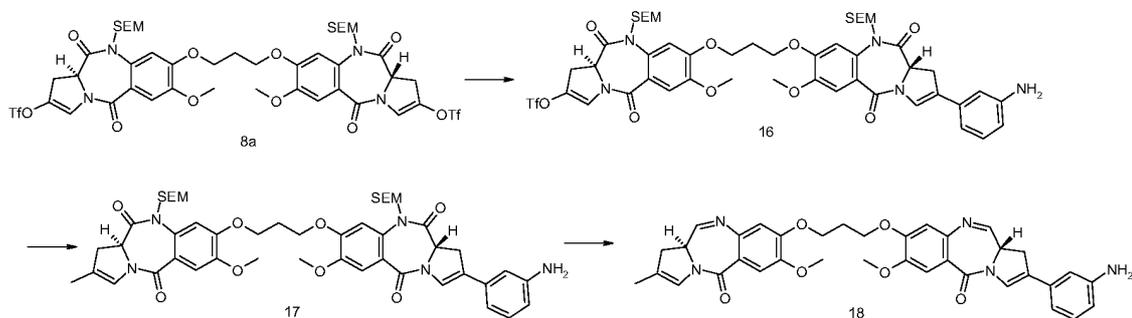
40 (c) (*S*)-2-(3-aminofenil)-8-(5-((*S*)-2-propenil-7-metoxi-5-oxo-5,11*a*-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)pentiloxi)-7-metoxi-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-5(11*aH*)-ona **15**

45 El par cadmio/plomo (100 mg, Q Dong *et al.* Tetrahedron Letters vol 36, publicación 32, 5681-5682, 1995) se añadió a una solución del producto de Suzuki **14** (40 mg, 0,029 mmol) en THF (1 ml) y acetato amónico (1 N, 1 ml) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 hora. La reacción se filtró a través de algodón hidrófilo para retirar las partículas y romper la emulsión. La mezcla de reacción se repartió entre cloroformo y agua, las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con cloroformo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio. La evaporación rotatoria a presión reducida produjo el producto en bruto que se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice, MeOH al 1 → 5 %/CHCl₃). La retirada del exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto de imina **15** deseado (9 mg, 0,013 mmol, 43 %)

50 Tr de CL-EM 2,80 min, 689 (M + H)
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,88 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,82 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,45 (s a, 1H), 7,15 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 6,92 (s a, 1H), 6,84-6,76 (m, 3H), 6,72 (s a, 1H), 6,60 (dd, *J* = 7,9, 1,9 Hz, 1H), 6,26 (d, *J* = 15,3 Hz, 1H), 5,67-5,51 (m, 1H), 4,46-4,35 (m, 1H), 4,34-4,24 (m, 1H), 4,20-4,00 (m, 4H), 3,94 (s, 3H), 3,93 (s 3H),

3,62-3,44 (m, 1H), 3,43-3,23 (m, 2H), 3,19-3,02 (m, 1H), 2,06-1,89(m, 4H), 1,84 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 1,76-1,62 (m, 2H).

Ejemplo 3



5

(a) *(S)*-2-(3-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((*S*)-7-metoxi-2-(trifluorometilsulfonil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)propoxi)-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepina-5,11(10H,11aH)-diona **16**

10

Se añadió Pd(PPh₃)₄ sólido (20 mg, 17,8 μmol) a una solución agitada del triflato 8a (2,5 g, 2,24 mmol), ácido 3-aminobencenoborónico (291 mg, 2,12 mmol) y Na₂CO₃ (356 mg, 3,35 mmol) en tolueno (20 ml), EtOH (10 ml) y H₂O (10 ml). La solución se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno durante 3 horas a temperatura ambiente, tiempo después del cual los análisis por TLC (EtOAc) y CL/EM revelaron la formación de producto mono-acoplado deseado y así como la presencia de material de partida sin reaccionar. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida y el residuo resultante se repartió entre H₂O (100 ml) y EtOAc (100 ml), después de la separación final de las fases, la fase acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (2 x 25 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (50 ml) y salmuera (60 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto de Suzuki en bruto. El producto de Suzuki en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 30 %/Hexano al 70 % → EtOAc al 80 %, Hexano al 20 %). La retirada del exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto deseado (1 g) con un rendimiento del 42 %.

15

20

(b) *(S)*-2-(3-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((*S*)-7-metoxi-2-metil-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)propoxi)-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepina-5,11(10H,11aH)-diona **17**

25

Una suspensión del triflato de 3-anilino, (50 mg, 47,2 μmol), ácido metilborónico (8,47 mg, 141 μmol, 3 equiv.), óxido de plata (I) (21,8 mg, 94,3 μmol, 2 equiv.), fosfato potásico tribásico (60 mg, 1,2 equiv., p/p), trifenilarsina (5,78 mg, 18,9 μmol, 0,4 equiv.) y *bis*(benzonitrilo)dicloro-paladio II (1,81 mg, 4,7 μmol, 0,1 equiv.) se calentó a 67 °C en dioxano seco (2 ml), en un tubo cerrado herméticamente, en una atmósfera inerte durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró a través de algodón hidrófilo, el lecho de filtro se enjuagó con acetato de etilo y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice con EtOAc al 80 %:Hexano al 20 %. La retirada del exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida produjo el producto en forma de una espuma de color blanquecino (18 mg, 19,4 μmol, rendimiento del 41 %). Posteriormente, la reacción se repitió a una escala más grande para proporcionar 250 mg del producto de 2-metilo.

30

35

CL-EM 3,88 min, 925,86 (M + H)

(c) *(S)*-2-(3-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((*S*)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepina-8-iloxi)propoxi)-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepina-5(11aH)-ona **18**

40

Se añadió LiBH₄ recién preparado (20,6 mg, 0,95 mmol, 3,5 equiv.) a una solución agitada de la SEM-dilactama (250 mg, 0,27 mmol) en THF (4 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1,0 h, momento en el que el análisis por CL-EM reveló que la reacción se había completado. El exceso de LiBH₄ se inactivó con acetona (aprox. 1 ml) a 0 °C (baño de hielo). La mezcla de reacción se repartió entre agua (50 ml) y metanol al 10 % en cloroformo (100 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (50 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío.

45

El residuo resultante se trató con metanol al 10 % en cloroformo (aprox. 50 ml) y gel de sílice (20 g). La mezcla viscosa se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 5 días. La mezcla se filtró lentamente a través de un embudo de sinterización y el residuo se sílice se lavó con CHCl₃ al 90 %: MeOH al 10 % (~250 ml) hasta que la actividad UV desapareció por completo del eluyente. La fase orgánica se lavó con H₂O (50 ml) y salmuera 60 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el material en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de CHCl₃ al 100 %: MeOH al 0 % a CHCl₃ al 96 %: MeOH al 4 %) para proporcionar el dímero de PBD 18.

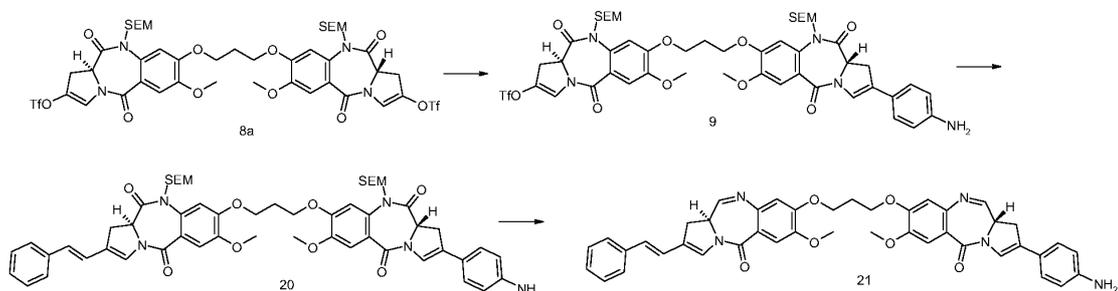
50

55

Ejemplo 4

Parte (i)

5



10 (a) Síntesis alternativa de (S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-2-(trifluorometilsulfonyl)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)propoxi)-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5,11(10H,11aH)-diona (9)

15 Se añadió *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio (0) (208 mg) al triflato (8a) (5 g), ácido 4-anilborónico (0,93 g) y carbonato sódico (0,62 g) en una mezcla de tolueno (60 ml), etanol (30 ml) y agua (10 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 3 días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de magnesio. Después de la filtración, el exceso de disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto de acoplamiento en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente: de hexano al 100 % a acetato de etilo al 100 %). Las fracciones puras se combinaron y la retirada del exceso de eluyente proporcionó el producto puro en forma de un sólido (2,2 g, rendimiento del 93 %, CL/EM 8,05 min, *m/z* EN⁺ 1060).

20 (b) (S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-2-(fenil-vinil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)propoxi)-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5,11(10H,11aH)-diona (20)

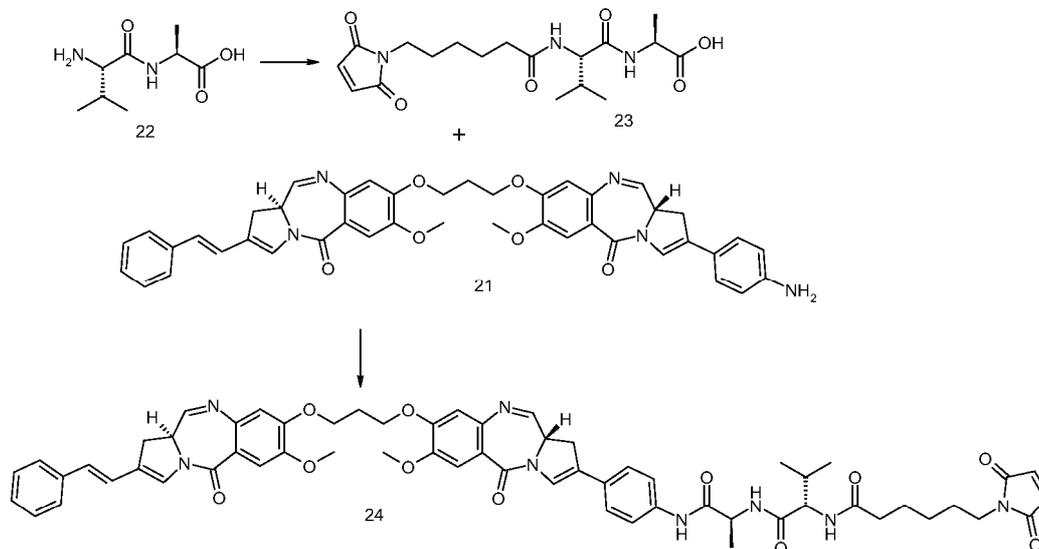
25 Una mezcla del triflato 9 (0,5 g), ácido *trans*-2-fenilvinilborónico (0,091 g), trietilamina (0,38 g) y *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio (0) (30 mg) en etanol (3 ml), tolueno (6 ml) y agua (1 ml) se irradió con microondas durante 8 minutos a 80 °C en un vial para microondas cerrado herméticamente. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con agua y se secó sobre sulfato de magnesio. El exceso de disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto en bruto que se usó sin purificación adicional en la siguiente reacción. Tiempo de retención 8,13 min, EN⁺ 1014,13.

30 (c) (S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-2-(fenil-vinil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepina-8-iloxi)propoxi)-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5(11aH)-ona (21)

35 Una solución de superhidruro en THF (1 M, 1,2 ml) se añadió mediante una jeringa a una solución del producto de Suzuki en bruto (0,477 g) en THF (10 ml) a -78 °C (baño de acetona/hielo seco). La mezcla de reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 20 minutos, tiempo después del cual, la reacción se interrumpió con agua. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. La retirada del exceso de disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó la SEM-carbinolamina en bruto que se disolvió en diclorometano (3 ml), etanol (6 ml) y agua (1 ml), y se agitó con gel de sílice durante 2 días. La mezcla de reacción se filtró, el exceso de disolvente se evaporó por evaporación rotatoria a presión reducida y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (metanol al 3 % en cloroformo). Las fracciones puras se combinaron y el exceso de eluyente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el compuesto 21 (0,75 mg, rendimiento del 22 % en 3 etapas). Tiempo de retención 5,53 min, EN⁺ 721,99.

45

Parte (ii)

5 (a) ácido (S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)propanoico (**23**)

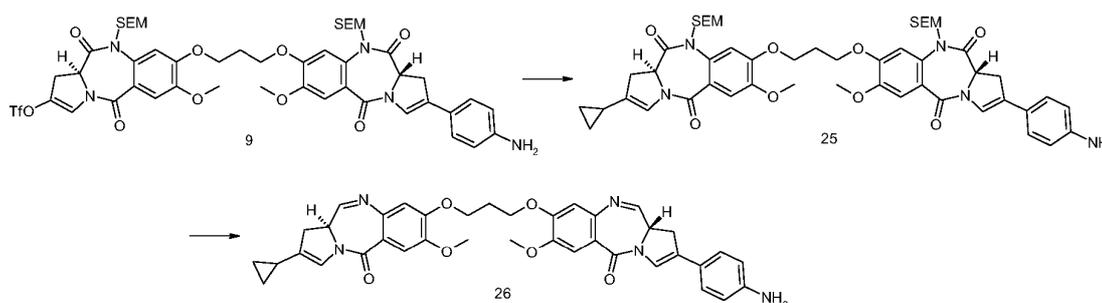
Una suspensión del dipéptido (**22**) (0,1 g, 0,54 mmol, 1 equiv.) y éster succinimida del ácido 6-maleimidohexanoico (0,165 g, 0,54 mmol, 1 equiv.) en DMF anhidra (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, momento en el que el análisis CLEM indicó una conversión del 50 % en un producto nuevo. La mezcla de reacción se diluyó con DMF anhidra (5 ml) y la reacción se dejó continuar durante 24 horas más. El disolvente se evaporó a presión reducida para dar un residuo incoloro. Se añadió éter dietílico (60 ml) y la mezcla se sonicó durante 5 min, el éter se decantó y el procedimiento se repitió (x 2). La porción etérea final se filtró para aislar el producto (**23**) en forma de un polvo de color blanco que se secó al vacío (0,105 g, 52 %). Datos analíticos: TR 2,28 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 382 ([M + H]⁺; 90), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 380 ([M - H]⁻; 100).

15 (b) 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-stiril)-5,11a-dihidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (**24**)

20 El dímero de PBD asimétrico (**21**) (0,019 g, 26 μmol, 1 equiv.) se añadió a una solución del engarce (**23**) (0,0121 g, 31,6 μmol, 1,2 equiv.) y EEDQ (0,0098 g, 39,6 μmol, 1,5 equiv.) en una mezcla de DCM anhidro/MeOH (3 ml/0,5 ml) en una atmósfera de argón. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, momento en el que el análisis CLEM indicó una conversión del 50 % en un producto nuevo. La mezcla de reacción se diluyó con DCM anhidro (2 ml) y la reacción se dejó continuar durante 18 horas más.

25 El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [de 100 % al DCM a DCM al 94 %/MeOH al 6 % en incrementos del 1 %] para dar el producto en forma de un sólido de color amarillo (5,2 mg, 18 %). Datos analíticos: TR 3,10 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1085 ([M + H]⁺; 90).

30 Ejemplo 5



(a) (S)-2-(4-aminofenil)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-5,11(10H,11aH)-diona (**25**)

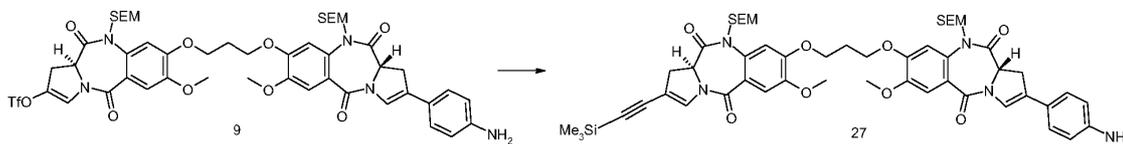
5 Una suspensión de óxido de plata (I) (0,441 g), fosfato potásico tribásico (1,187 g), trifenilarsina (0,116 g), ácido ciclopropilborónico (0,206 g) y el material de partida **9** (0,5 g) en dioxano (15 ml), en una atmósfera de argón, se calentó a 71 °C. Una cantidad catalítica de bis(cloruro benzonitrilo)paladio (II) (0,036 g) se añadió y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2 horas y 10 min a 71 °C. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y el lecho de filtro se lavó con acetato de etilo (400 ml). La solución orgánica se extrajo con agua (2 x 600 ml) y salmuera (600 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La retirada del disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto en bruto que se purificó por cromatografía gravitatoria sobre gel de sílice (únicamente acetato de etilo como eluyente). La retirada del exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto **25** en forma de un sólido de color amarillo (145 mg, rendimiento del 32 %). TR CLEM 3,92 min, ES⁺ 952,06.

15 (b) (S)-2-(4-aminofenil)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5(11aH)-ona (**26**)

20 Una solución de super hidruro (0,361 ml, 1M en THF) se añadió gota a gota durante 5 minutos a una solución de la SEM dilictama **25** (0,137 g) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml), en una atmósfera de argón a -78 °C. El análisis de CLEM después de 35 minutos, reveló que la reacción se había completado y el exceso de superhidruro se retiró con agua (4 ml) seguido de salmuera (4 ml). La solución acuosa se extrajo con una mezcla de diclorometano/metanol (9:1, 2 x 16 ml) y la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida y el producto en bruto se recogió en una mezcla de etanol, diclorometano y agua (8:3:1, 15 ml) y se trató con gel de sílice.

25 La suspensión espesa se dejó en agitación durante 4 días. La mezcla se filtró mediante sinterizado, lavando con diclorometano/metanol (9:1, 140 ml) hasta que el producto terminó de eluirse. La fase orgánica se lavó con salmuera (2 x 250 ml) y después se secó sobre sulfato de magnesio. La evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto en bruto que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente de metanol del 100 % al 5 %/diclorometano). La retirada del exceso de eluyente proporcionó el producto **26** (23 mg, rendimiento del 25 %). Tr de CLEM 2,42. ES⁺ 659,92

Ejemplo 6



35

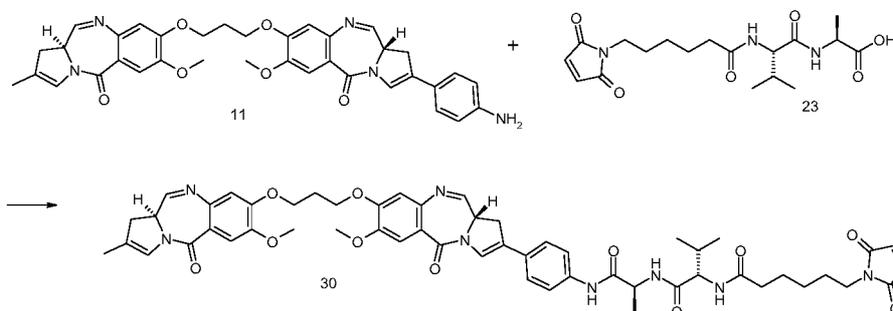
(S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-2-((trimetilsilil)etnil)-5,10,11,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5,11(10H,11aH)-diona (**27**)

40

45 Una mezcla de **9** (0,150 g, 0,14 mmol), CuI (0,003 g, 0,014 mmol, 0,1 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (0,0162 g, 0,014 mmol, 0,1 equiv.) y PPh₃ (0,007 g, 0,028 mmol, 0,2 equiv.) se disolvió en piperidina (9 ml) en presencia de tamices moleculares, en una atmósfera de argón. Se añadió etiniltrimetilsilano (0,06 ml, 0,42 mmol, 3 equiv.) a la mezcla a 70 °C y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante una noche. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida y el sólido de color pardo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, EtOAc al 90 %, hexano al 10 %). El Compuesto **27** se obtuvo en forma de un sólido de color naranja (0,043 g, 30 %); Fr 0,69 [EtOAc]; CL-EM (5 min) 4,28 min, ES⁺ 1008,28.

Ejemplo 7

(a)



5

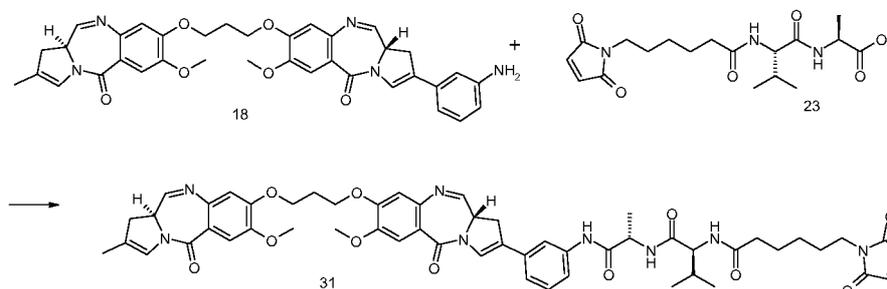
6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (**30**)

10

A una mezcla del ácido carboxílico **23** (8 mg, 21 μmol) en metanol al 5 %/diclorometano se le añadió EEDQ (6,1 mg, 24,6 μmol) y la mezcla se agitó durante 15 minutos en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. La mezcla resultante se añadió a **11** (12 mg, 18,9 μmol) y se agitó durante 3 horas en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se aspiró directamente sobre una placa Chomatotron radial de 1 mm y se eluyó con un gradiente de metanol del 1 al 4 % en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se concentraron a presión reducida para dar 9,4 mg (50 %) de **30** en forma de un sólido de color amarillo: EM (EN⁻) m/z 997,18 (M+H)⁺.

15

(b)



20

6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(((S)-1-(((S)-1-((3-((S)-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (**31**)

25

El Compuesto **31** se sintetizó a partir del compuesto **18** usando el mismo procedimiento en la etapa (a) con un rendimiento del 25 %.

Ejemplo 8: Determinación de la citotoxicidad in vitro del fármaco libre

30

Las células, como se detalla más adelante, se recogieron y sembraron en placas de 96 pocillos de laterales de color negro a una densidad de 10.000 células/pocillo en 150 μl de medio. Se añadieron diluciones en serie del artículo de ensayo (50 μl) y la incubación se llevó a cabo durante 92 horas a 37 °C. Tras la adición del compuesto de ensayo, los cultivos se incubaron hasta 96 horas a 37 °C. Se añadió resazurina (0,25 mM, 50 μl , Sigma, St. Louis, MO) en medio y la incubación prosiguió durante 4 horas. Las placas se leyeron en un lector de microplacas Fusion HT (Packard, Meriden, CT) usando una longitud de onda de excitación de 525 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Los datos de los ensayos se redujeron usando GraphPad Prism versión 4 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Las concentraciones Cl_{50} comparadas con las células control sin tratar se determinaron usando ajustes de una curva de 4 parámetros.

40

Los valores de Cl_{50} (nM) para el compuesto **15** son:

	L428	786-O	HEL	HL-60	MCF-7
Cl_{50} (nm)	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,03

El mismo procedimiento también se usó para determinar la actividad de los compuestos 11 y 18:

Cl ₅₀ (nM)	Caki-1	786-O	TF1a	MCF-7
11	0,06	0,1	0,07	0,2
18	0,6	1	0,7	2

5

Ensayo celular alternativo

Las células se sembraron en placas en 150 µl de medio de crecimiento por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo transparente con laterales negros (Costar, Corning) y se dejaron reposar durante 1 hora en la campana biológica antes de introducir en el incubador a 37 °C con CO₂ al 5 %. Al día siguiente se prepararon concentraciones 4X de reservas de fármaco y después se titularon como diluciones en serie por 10 que producen curvas de dosis de 8 puntos y se añadieron a 50 µl por pocillo por duplicado. Después, las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. La citotoxicidad fue una medida mediante incubación con 100 µl de solución Cell Titer Glo (Promega) durante 1 hora y después se midió la luminiscencia en un lector de placas Fusion HT (Perkin Elmer). Los datos se procesaron con Excel (Microsoft) y GraphPad (Prism) para producir curvas de respuesta a la dosis y se generaron valores de Cl₅₀ y se recogieron los datos.

10

15

Cl ₅₀ (nM)	786-O	Caki-1	MCF-7	BxPC-3	HL-60	HEL
11	0,85	0,4	7	3	0,1	0,06

Ejemplo 9: Preparación de conjugados de dímeros de PDB

20

Se prepararon conjugados anticuerpo-fármaco como se ha descrito previamente (véase Doronina et al., *Nature Biotechnology*, 21,778-784 (2003)) o como se describe más adelante.

25

30

35

40

Anticuerpos hlgG1 sometidos a ingeniería con cisteínas introducidas: Los anticuerpos CD70 que contienen un residuo de cisteína en la posición 239 de la cadena pesada (h1 F6d) se redujeron completamente mediante la adición de 10 equivalentes de TCEP y EDTA 1 mM y ajustando el pH a 7,4 con tampón Tris 1M (pH 9,0). Tras una incubación de 1 hora a 37 °C, la reacción se enfrió hasta 22 ° y se añadieron 30 equivalentes de ácido dehidroascórbico para reoxidar selectivamente los disulfuros nativos al tiempo que se deja la cisteína 239 en estado reducido. El pH se ajustó hasta 6,5 con tampón Tris 1M (pH 3,7) y se dejó proceder la reacción durante 1 hora a 22 °C. El pH de la solución se elevó después de nuevo hasta 7,4 mediante la adición de tampón Tris 1M (pH 9,0). 3,5 equivalentes del conector de fármaco PBD en DMSO se introdujeron en un contenedor adecuado para la dilución con propilenglicol antes de la adición a la reacción. Para mantener la solubilidad del conector de fármaco PBD, el propio anticuerpo se diluyó primero con propilenglicol hasta una concentración final del 33 % (p. ej., si la solución de anticuerpos estaba en un volumen de reacción 60 ml, se añadieron 30 ml de propilenglicol). Este mismo volumen de propilenglicol (30 ml en este ejemplo) se añadió después al conector de fármaco PBD como diluyente. Después de mezclar, la solución del conector de fármaco PBD en propilenglicol se añadió a la solución de anticuerpos para efectuar la conjugación; la concentración final de propilenglicol es 50 %. La reacción se dejó proceder durante 30 minutos y después se inactivó mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetilcisteína. La ADC se purificó después mediante ultrafiltración a través de una membrana de 30 kD. (Obsérvese que la concentración de propilenglicol usado en la reacción se puede reducir para cualquier PBD concreto, dado que su único propósito es mantener la solubilidad del conector del fármaco en el medio acuoso.)

Ejemplo 10: Determinación de la citotoxicidad *in vitro* del conjugado

45

50

55

Las células, como se detalla más adelante, se recogieron y sembraron en placas de 96 pocillos de laterales de color negro a una densidad de 10.000 células/pocillo en 150 µl de medio. Se añadieron diluciones en serie del artículo de ensayo (50 µl) y la incubación se llevó a cabo durante 92 horas a 37 °C. Tras la adición del compuesto de ensayo, los cultivos se incubaron hasta 96 horas a 37 °C. Se añadió resazurina (0,25 mM, 50 µl, St. Louis, MO) en medio y la incubación continuó durante 4 horas. Las placas se leyeron en un lector de microplacas Fusion HT (Packard, Meriden, CT) usando una longitud de onda de excitación de 525 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Los datos de los ensayos se redujeron usando GraphPad Prism versión 4 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Las concentraciones Cl₅₀ comparadas con las células control sin tratar se determinaron usando ajustes de una curva de 4 parámetros. El anticuerpo usado fue el anticuerpo CD70 (1F6 humanizado; véase la solicitud publicada n.º 2009-148942) en el que se han introducido residuos de cisteína en la posición de aminoácidos 239 de la cadena pesada (de acuerdo con el sistema de numeración en la UE) (indicado como h1 F6d).

Los valores de Cl₅₀ para las ADC del compuesto 31 son:

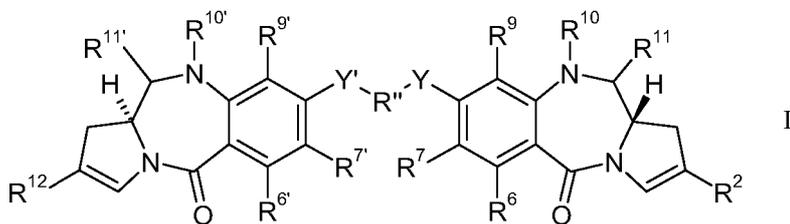
ADC	Caki-1	786-O	HL60	HEL	TF1a
h1F6d-31 (2dr/Ab)	7	36	5371	Minh. máx. = 50 %	Inh. máx. = 40 %
Nota: Inhibición máxima (Inh. máx.) = % de inhibición a la concentración máxima de 100 % sin tratar.					

Ejemplo 11: Determinación de la citotoxicidad in vivo de conjugados seleccionados

- 5 El estudio siguiente se realizó de acuerdo con el Comité de Atención y Uso de Animales en un centro completamente acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care. Los anticuerpos usados fueron un anticuerpo en el que se habían introducido residuos de cisteína en la posición 239 (S239C) en las cadenas pesadas y se conjugaron con el compuesto 31 y un control que no es de unión conjugado con el mismo compuesto 31.
- 10 Los estudios de tratamiento se realizan en un modelo de xenoinjerto antigénico*. Las células tumorales se implantaron subcutáneamente en ratones scid. Los ratones se aleatorizaron a grupos de estudio (n= 6). El ADC-compuesto 31 o ADC control se administraron ip de acuerdo con un calendario c4dx4 (como se muestra con los triángulos del eje x). El volumen del tumor como función del tiempo se determinó usando la fórmula $(L \times W^2)/2$. Se sacrificó a los animales
- 15 cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 1.000 mm³.
- En referencia a la Figura 1, la ADV del compuesto 31 se administró a 0,1 (□), 0,3 (⊗) y 1 (■) mg/kg. Un control que no es de unión, conjugado con el compuesto 31 se administró a las mismas dosis (0,1 (△), 0,3 (⊗) y 1 (▲) mg/kg). Las tres dosis del conjugado Ac-compuesto 31 tenían mejor actividad que el conjugado control que no es de unión. Los
- 20 tumores sin tratar se muestran con un *.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con la fórmula I:

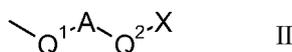


5

en la que:

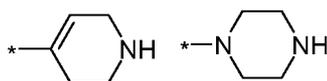
R² es de la fórmula II:

10



en la que A es un grupo arilo C₅₋₇, X se selecciona entre el grupo que consiste en: OH, SH, CO₂H, COH, N=C=O, NHHH₂, CONHHH₂,

15



y NHR^N, en donde R^N se selecciona entre el grupo que comprende H y alquilo C₁₋₄ alquilo y:

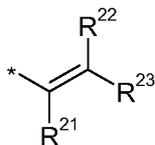
20

- (i) Q¹ es un enlace sencillo y Q² se selecciona entre un enlace sencillo y -Z-(CH₂)_n-, donde Z se selecciona entre un enlace sencillo, O, S y NH y es de 1 a 3; o
- (ii) Q¹ es -CH=CH- y Q² es un enlace sencillo;

R¹² se selecciona entre:

25

- (iia) alquilo C₁₋₅ alifático saturado;
- (iib) cicloalquilo C₃₋₆ saturado;
- (iic)

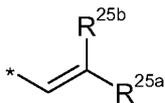


30

en la que cada uno de R²¹, R²² y R²³ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo, donde el número total de átomos de carbono en el grupo R¹² no es mayor de 5;

35

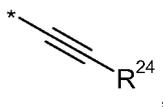
(iic)



en donde uno de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona entre: fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo; y

40

(iie)



en donde R^{24} se selecciona entre H, alquilo C_{1-3} saturado, alqueno C_{2-3} , alquino C_{2-3} ; ciclopropilo; fenilo, fenilo que está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo;

5 R^6 y R^9 se seleccionan independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR' , nitro, Me_3Sn y halo; R^7 se selecciona entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, $NHRR'$, nitro, Me_3Sn y halo; donde R y R' se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido, heterociclilo C_{3-20} y grupos arilo C_{5-20} ;

10 ya sea:

(a) R^{10} es H, y R^{11} es OH, OR^A , donde R^A es alquilo C_{1-4} ;

(b) R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y de carbono a los que están unidos; o

(c) R^{10} es H y R^{11} es SO_zM , donde z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;

R'' es un grupo alqueno C_{3-12} , cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos;

Y e Y' se seleccionan entre O, S o NH;

R^6 , R^7 , R^9 se seleccionan entre los mismos grupos que R^6 , R^7 y R^9 respectivamente, y R^{10} y R^{11} son iguales que R^{10} y R^{11} , en donde, si R^{11} y $R^{11'}$ son SO_zM , M también puede representar un catión divalente farmacéuticamente aceptable.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^7 se selecciona entre un grupo alquilo C_{1-4} .

3. Un compuesto de acuerdo ya sea con la reivindicación 1 o con la reivindicación 2, en el que Y es O y R'' es alqueno C_{3-7} .

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R^9 es H, y R^6 se selecciona entre H y halo Y.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que A es fenilo.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que X se selecciona entre OH, SH y NH_2 .

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que Q^1 es un enlace sencillo y Q^2 es un enlace sencillo.

8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que Q^2 es $-Z-(CH_2)_n-$, Z es O o S y n es 1 o 2.

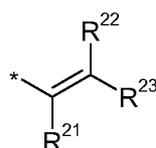
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que Q^1 es $-CH=CH-$.

10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R^{12} se selecciona entre

(a) metilo, etilo o propilo;

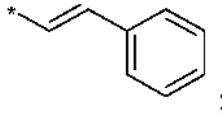
(b) ciclopropilo;

(c) un grupo de fórmula:



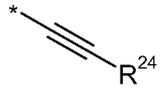
en donde el número total de átomos de carbono en el grupo R^{12} no es mayor de 4.

(d)



y
(e) un grupo de fórmula

5



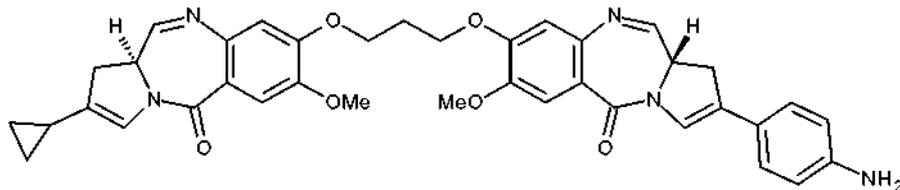
en la que R²⁴ se selecciona entre H y metilo.

10 11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que R¹⁰ y R¹¹ forman un doble enlace nitrógeno-carbono.

12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que R^{6'}, R^{7'}, R^{9'}, R^{10'}, R^{11'} e Y' son iguales que R⁶, R⁷, R⁹, R¹⁰, R¹¹ e Y, respectivamente.

15

13. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura:

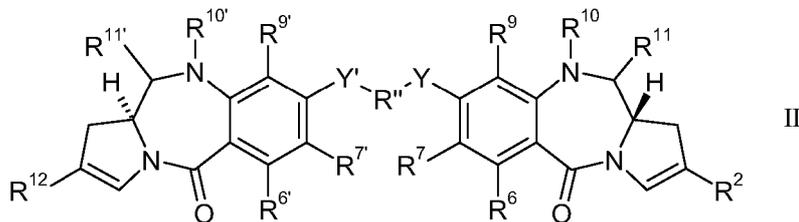


20 14. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad proliferativa.

15. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

25

16. Un compuesto de fórmula II:



II

30 en la que:

R², R⁶, R⁷, R⁹, R^{6'}, R^{7'}, R^{9'}, R¹², Y, Y' y R'' son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; ya sea:

35

- (a) R¹⁰ es Troc, y R¹¹ es OTBS; o
- (b) R¹⁰ es SEM y R¹¹ es un grupo oxo;

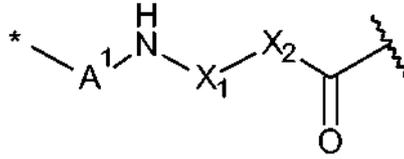
y R^{10'} y R^{11'} son igual que R¹⁰ y R¹¹.

40 17. Un conjugado que tiene la fórmula III:

L-(LU-D)p (I)

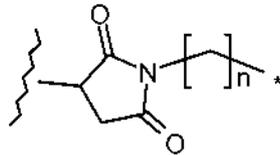
en la que L es una unidad de ligando que es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo,
LU es una unidad de engarce

5



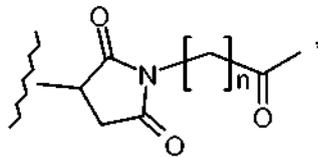
donde m es de 0 a 3;
-C(=O)-X₂-X₁-NH- es un dipéptido;
A¹ se selecciona entre:

10



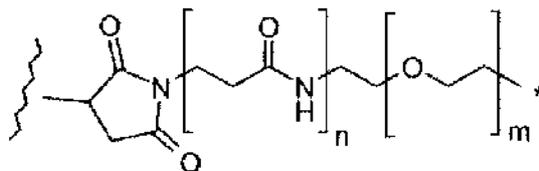
en la que el asterisco indica el punto de unión a NH, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de
ligando y n es de 0 a 6;

15



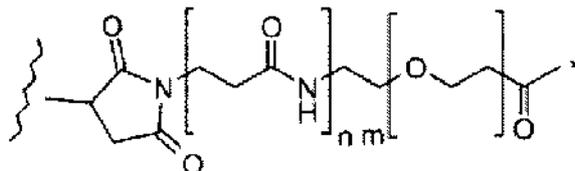
en la que el asterisco indica el punto de unión a NH, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de
ligando y n es de 0 a 6;

20



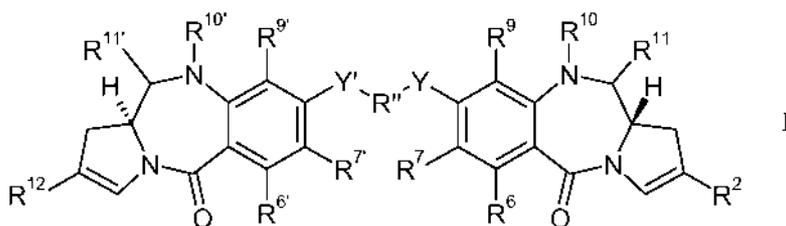
en la que el asterisco indica el punto de unión a NH, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de
ligando, n es 0 o 1, y es de 0 a 30; o

25



en la que el asterisco indica el punto de unión a NH, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de
ligando, n es 0 o 1, y m es de 0 a 30,
p es de 1 a 20; y
D es una unidad de fármaco de fórmula I:

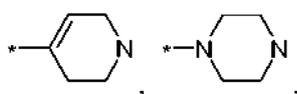
30



en la que R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R^{6'}, R^{7'}, R^{9'}, R^{10'}, R^{11'}, R¹², Y, Y' y R'' se definen de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-29, excepto que X se selecciona entre el grupo que consiste en:

5

O, S, C(=O), C=, NH(C=O), NHNH, CONHNH,



10

y NRⁿ, en donde R^N se selecciona entre el grupo que comprende H y alquilo C₁₋₄, y en donde LU se conecta a D a través del sustituyente X de R².

18. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 17, en el que m es 0.

15

19. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que el dipéptido se selecciona entre:

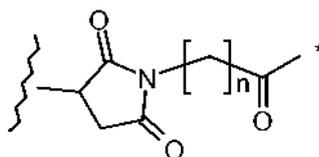
20

- Phe-Lys-;
- Val-Ala-;
- Val-Lys-;
- Ala-Lys-; y
- Val-Cit.

25

20. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 19 en el que el dipéptido se selecciona entre -Phe-Lys-; -Val-Cit- y -Val-Ala-.

21. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 en el que A¹ es



30

en el que el asterisco indica el punto de unión a NH, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es de 0 a 6.

22. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 21 en el que n es 5.

35

23. El uso de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad proliferativa o una enfermedad autoinmune.

24. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22 para uso en un tratamiento de una enfermedad proliferativa o una enfermedad autoinmune.

40

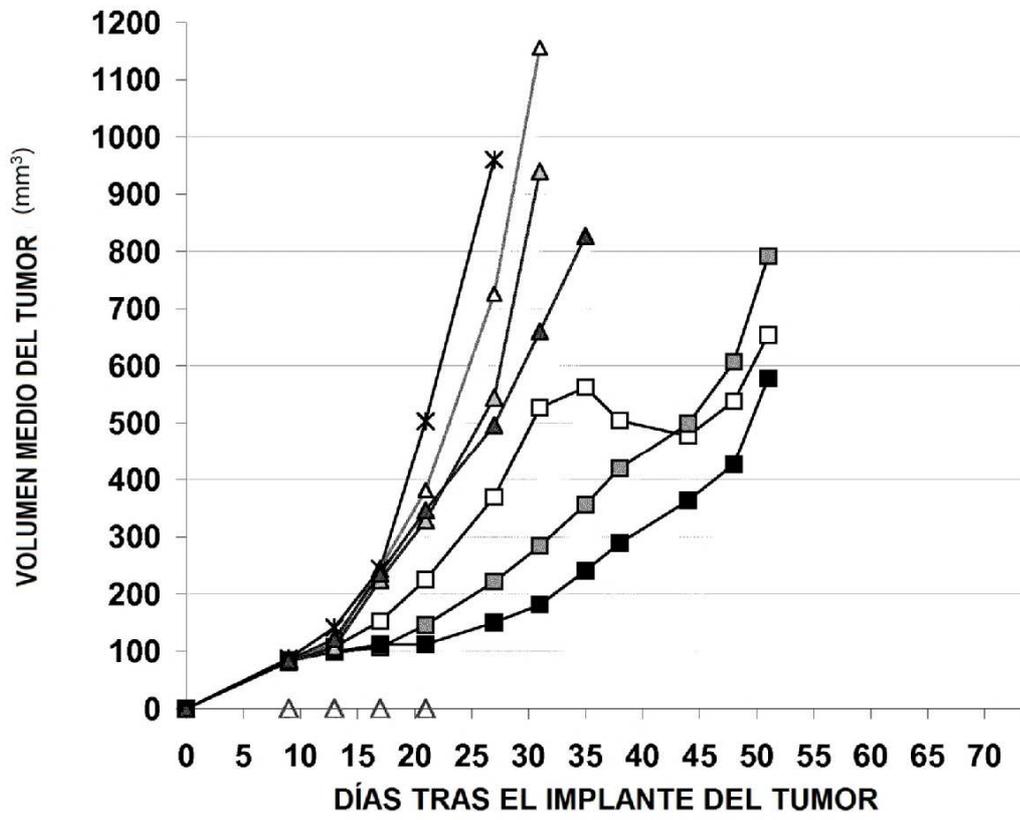


Figura 1