

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 520**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/5513 (2006.01)

C07D 243/14 (2006.01)

C07D 207/20 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2011 PCT/IB2011/053310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12014147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2011 E 11749535 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2598507**

54 Título: **Derivados anticancerosos, preparación de los mismos y uso terapéutico de los mismos**

30 Prioridad:

26.07.2010 FR 1056103

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

23.10.2017

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**COMMERÇON, ALAIN;
GAUZY-LAZO, LAURENCE y
HUBERT, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 638 520 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

Derivados anticancerosos, preparación de los mismos y uso terapéutico de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a conjugados de dímeros de pirrolo[1,4]benzodiazepina (PBD), a composiciones que los contienen y a su uso terapéutico, especialmente como agentes anticancerosos. La invención también se refiere al procedimiento para preparar los conjugados y a su uso como agentes anticancerosos y también a los propios dímeros.

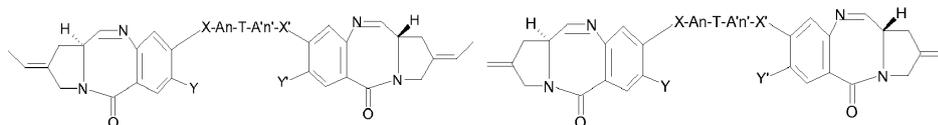
Campo técnico

- 10 Los dímeros de pirrolo[1,4]benzodiazepina son agentes anticancerosos que actúan al unirse covalentemente a ADN celular. Estos derivados se han descrito en las solicitudes de patente **WO 00/12508** y **WO 2005/085260** y también en las siguientes publicaciones: *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, 40, 641-654; *Tetrahedron Letters* **1988**, 29(40), 5105-5108.

- 15 La química de los conjugados se conoce desde hace muchos años y se ha aplicado a varias familias de agentes citotóxicos, a modo de ejemplo maitansinoides (documento **WO 04103272**), taxanos (documento **WO 06061258**), leptomicinas (documento **WO 07144709**), CC-1065 y análogos del mismo (documento **WO 2007102069**); con respecto a los conjugados, véanse además Monneret C. y cols., *Bulletin du Cancer* **2000**, 87(11), 829-38; Ricart A.D. y cols., *Nature Clinical Practice Oncology* **2007**, 4, 245-255; Singh R. y Rickson H.K., *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, **2009**, 525, 445-467.

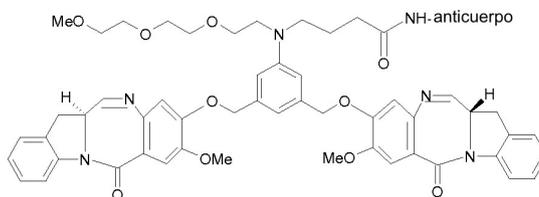
Técnica anterior

- 20 Los conjugados de dímeros de pirrolo[1,4]benzodiazepina se han descrito en las solicitudes de patente WO 07085930 y WO 2009/016516. Los dímeros usados tienen las fórmulas:



- 25 en las que T puede representar un grupo arilo o heteroarilo sustituido con -G-D-(Z)_p-SZ_a o -G-D-(Z)_p-C(=O)Z_bR_b. G representa un enlace sencillo o doble o alternativamente -O-, -S- o -NR-. D representa un enlace sencillo o uno de los siguientes grupos: -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-OF-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F- para los que E y F se eligen de -(OCH₂CH₂)_ialquil(OCH₂CH₂)_j-,
 30 alquil(OCH₂CH₂)_j-alquilo-, -(OCH₂CH₂)_i-, -(OCH₂CH₂)_icicloalquil(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iheterociclil(OCH₂CH₂)_j-,
 (OCH₂CH₂)_iaril(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iheteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -alquil(OCH₂CH₂)_ialquil(OCH₂CH₂)_j-, -alquil(OCH₂CH₂)_i-,
 -alquil(OCH₂CH₂)_icicloalquil(OCH₂CH₂)_j-, -alquil(OCH₂CH₂)_iheterociclil(OCH₂CH₂)_j-, -alquil(OCH₂CH₂)_iaril(OCH₂CH₂)_j-,
 35 -alquil(OCH₂CH₂)_iheteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -cicloalquil-alquil-, -alquilcicloalquil-, -heterociclil-alquil-, -alquil-heterociclil-, -alquil-aril-, -aril-alquil-, -alquil-heteroaril-, -heteroaril-alquil-. i y j representan números enteros que varían de 0 a 2.000. Z representa un grupo alquilo y p es un número entero igual a 0 o 1. En estos compuestos, la R del grupo NR no comprende una cadena de PEG.

Immunogen describió en noviembre de 2009 en the EORTC Congress (Extracto B-126) el siguiente conjugado:



- 40 que se distingue por la naturaleza del enlazador y del compuesto citotóxico. Este compuesto se describió de nuevo en the Sixth Annual PEGS Congress en Boston que tuvo lugar del 17 al 21 de mayo de 2010, y también los siguientes precursores:

- grupo arilo: un grupo aromático monocíclico o bicíclico que no contiene heteroátomos. Particularmente, es un grupo fenilo o naftilo;
- 5 • grupo heteroarilo: un grupo aromático monocíclico o bicíclico que comprende al menos un heteroátomo (O, S, N) acoplado en el anillo y conectado a los átomos de carbono que forman el anillo. Más particularmente, es un grupo piridilo, pirrolilo, tienilo, furilo, pirimidinilo o triazolilo;
- grupo heterocicloalquilo: un grupo cicloalquilo que comprende al menos un heteroátomo (O, S, N) acoplado en el anillo y conectado a los átomos de carbono que forman el anillo. Más particularmente, es un grupo piperacino, N-metilpiperacino, morfolino, piperidino o pirrolidino;
- grupo alcoxi: un grupo -O-alquilo, en el que el grupo alquilo es como se define anteriormente;
- 10 • grupo alcanoiloxi: un grupo -O-CO-alquilo, en el que el grupo alquilo es como se define anteriormente;
- grupo alquilenos: un grupo divalente saturado de fórmula empírica $-C_mH_{2m-}$, obtenido al retirar dos átomos de hidrógeno de un alcano. Ejemplos que se pueden mencionar incluyen grupos metileno ($-CH_2-$), etileno ($-CH_2CH_2-$), propileno ($-CH_2CH_2CH_2-$), butileno ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$), isobutileno () y hexileno ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$). El grupo alquilenos puede ser más particularmente de fórmula $-(CH_2)_m-$, representado m un número entero;
- 15 • en los intervalos de valores, están incluidos los límites (p. ej. un intervalo del tipo "i que varía de 1 a 6" incluye los límites 1 y 6. Por otra parte, el intervalo también describe todos los puntos del intervalo; así, "i que varía de 1 a 6" describe los valores 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Abreviaturas usadas

- EtOAc: acetato de etilo; ALK: grupo alquilenos; ALK (C_x-C_y): grupo alquilenos (C_x-C_y); TLC: cromatografía en capa fina; MSC: cloruro de metanosulfonilo; DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno; DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida; DCM: diclorometano; DEAD: azodicarboxilato de dietilo; DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimida; DIPEA: N,N'-diisopropiletilamina; DMA: dimetilacetamida; DMAP: 4-dimetilaminopiridina; DME: dimetoxietano; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; $\epsilon_{WL, nm}$: coeficiente de extinción molar a la longitud de onda WL; EEDQ: 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; EDCI: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; Fmoc: fluorenilmetoxicarbonilo; Hal: átomo de halógeno; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinoetanosulfónico; WL: longitud de onda; Me: metilo; NHS: N-hidroxisuccinimida; NMP: N-metilpirrolidinona; RP: presión reducida; Rf: factor de retención; SEC: cromatografía de exclusión estérica; TA: temperatura ambiente; TBDMS: *tert*-butildimetilsililo; TEA: trietilamina; TFA: ácido trifluoroacético; TIPS: triisopropilsililo; THF: tetrahidrofurano; t_R : tiempo de retención.

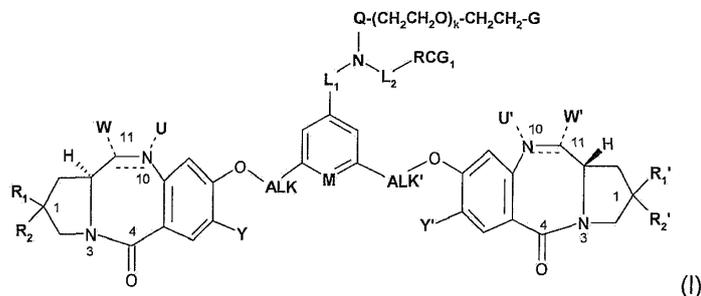
Figuras

- Figura 1: modificación del agente de unión mediante SPDP;
- Figura 2: modificación del agente de unión mediante un iminotiolano;
- Figura 3: espectro de masas de alta resolución deconvolucionado del conjugado del Ej. 8 después de la desglucosilación;
- Figura 4: espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado no desglucosilado del Ej. 9;
- Figura 5: espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado no desglucosilado del Ej. 10;
- Figura 6: espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado no desglucosilado del Ej. 11.

Estas figuras muestra para cada conjugado la distribución de las especies que tienen de 0 a 8 dímeros de tomamicina (D_0 : son dímeros; D_x : x dímeros).

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a compuestos de fórmula (I):



5 en la que:

- representa un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que

si representa un enlace sencillo, entonces:

- ⊗ **U** y/o **U'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H;

10 ⊗ **W** y/o **W'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí: OH, -OR, -OCOR, -COOR, -OCOOR, -OCONRR', un carbamato cíclico tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -NRCONRR', -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -SH, -SR, -SOR, -SOOR, -SO₃-, -NRSOOR', -NRR', una amina cíclica tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -NROR', -NRCOR', -N₃, -CN, Hal, un grupo trialkilfosfonio o triarilfosfonio;

si representa un doble enlace, entonces:

15 ⊗ **U** y **U'** están ausentes;

- ⊗ **W** y/o **W'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H;

- **R₁**, **R₂**, **R₁'**, **R₂'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí: H, Hal o un grupo alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR con q = 0, 1 o 2;

20 o alternativamente

R₁ y **R₂** y/o **R₁'** y **R₂'** forman juntos, respectivamente, un doble enlace =CH₂ o =CH-CH₃;

- **Y** e **Y'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H o -OR;

- **M** representa N;

- **ALK** y **ALK'** son idénticos e indican un grupo CH₂;

25 • **R** y **R'** representan, independientemente entre sí, H o un grupo alquilo (C₁-C₆) o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;

- **L₁** representa:

- el grupo -D-ALK(C₁-C₆)- ligado al anillo de piridilo a través de D, en el que D representa -O-;

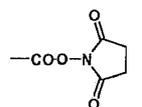
- **L₂** representa:

30 ○ un grupo -ALK(C₁-C₆)-;

- **Q** representa un enlace sencillo o el grupo C(=O);
- **k** representa un número entero que varía de 1 a 5;
- **G** representa un grupo -OMe o un grupo morfolino;
- **RCG1** representa el grupo -SZ_a o -C(=O)-Z_bR_b;

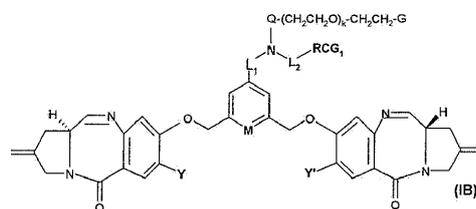
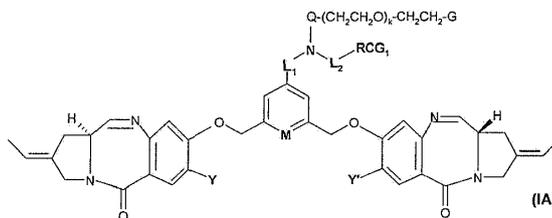
5

- **Z_a** representa SR_a;
- **R_a** representa H o un grupo alquilo (C₁-C₆);



- COZ_bR_b representa -COOH, -COO-alquilo(C₁-C₆), o

Más particularmente, son compuestos de fórmula (IA) o (IB):



10

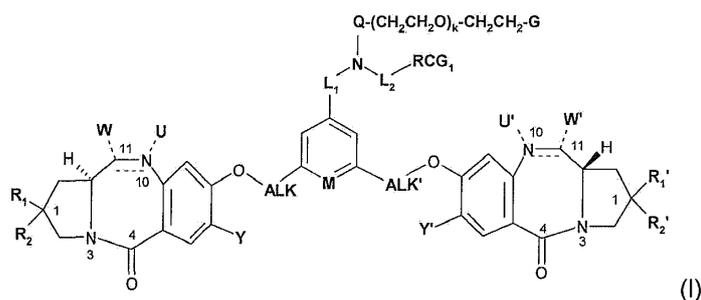
La invención también se refiere al procedimiento para preparar un conjugado, que consiste en: (i) poner en contacto y dejar reaccionar una solución acuosa, opcionalmente tamponada, del agente de unión, opcionalmente modificado con un agente modificador, y una solución de un compuesto de fórmula (I), (ii) y a continuación separar opcionalmente el conjugado formado en la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) y/o el agente de unión sin reaccionar y/o los agregados que se puedan haber formado. El grupo químico RCG1 del compuesto de fórmula (I) debe ser reactivo hacia los grupos químicos RCG2 presentes en el agente de unión, especialmente hacia los grupos amino presentes sobre los anticuerpos, habiendo sido introducidos dichos grupos químicos RCG2, cuando sea apropiado, por el agente modificador a fin de ligar el compuesto de fórmula (I) al agente de unión mediante la formación de un enlace covalente.

15

20

Descripción de la invención

Los investigadores describen compuestos de fórmula (I):



en la que:

- --- representa un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que

si --- representa un enlace sencillo, entonces:

- 5 ⊗ **U** y/o **U'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H;

- 10 ⊗ **W** y/o **W'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí: OH, -OR, -OCOR, -COOR, -OCOOR, -OCONRR', un carbamato cíclico tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -NRCONRR', -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -SH, -SR, -SOR, -SOOR, -SO₃-, -NRSOOR', -NRR', una amina cíclica tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -NROR', -NRCOR', -N₃, -CN, Hal, un grupo trialquilfosfonio o triarilfosfonio;

si --- representa un doble enlace, entonces:

- ⊗ **U** y **U'** están ausentes;

- ⊗ **W** y/o **W'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H;

- 15 • **R₁**, **R₂**, **R₁'**, **R₂'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí: H, Hal o un grupo alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR con q = 0, 1 o 2;

o alternativamente

R₁ y **R₂** y/o **R₁'** y **R₂'** forman juntos, respectivamente, un doble enlace =CH₂ o =CH-CH₃;

- **Y** e **Y'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H o -OR;

- 20 • **M** representa CH o N;

- **ALK** y **ALK'** indican un grupo alquileo (C₁-C₆);

- **R** y **R'** representan, independientemente entre sí, H o un grupo alquilo (C₁-C₆) o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;

- **L₁** representa:

- 25 ○ un enlace sencillo;

o

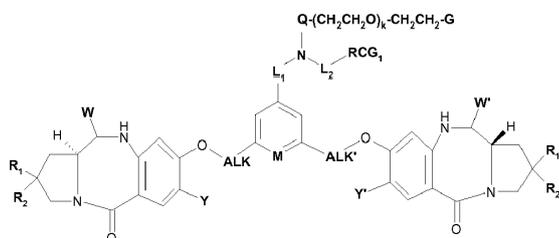
- el grupo -(OCH₂CH₂)_i-, ligado al anillo de fenilo o piridilo a través del átomo de oxígeno, representando i un número entero que varía de 2 a 40, preferiblemente de 2 a 10, preferiblemente igual a 3;

- 30 o

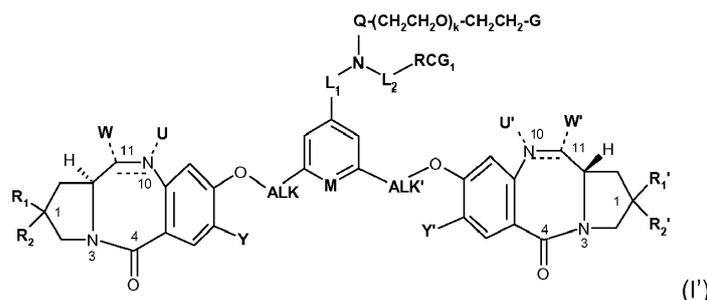
- el grupo -D-ALK(C₁-C₆)- ligado al anillo de fenilo o piridilo a través de D, en el que D representa -O-, -NH- o -N-alquil(C₁-C₄)-;
- **L₂** representa:
 - un grupo -ALK(C₁-C₆)-;
 - 5 ○
 - el grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-, representando **j** un número entero que varía de 1 a 40, preferiblemente de 1 a 10, preferiblemente igual al 2 o 3;
 -
 - 10 ○ un grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂NR''-ALK(C₁-C₆)-, ligado al átomo de nitrógeno a través de la unidad -(CH₂CH₂O)-, representado **j** un número entero que varía de 1 a 40, preferiblemente de 1 a 10, preferiblemente igual a 2 o 3, y representado **R''** H o un grupo alquilo (C₁-C₄);
- **Q** representa un enlace sencillo o el grupo C(=O);
- **k** representa un número entero que varía de 0 a 40, preferiblemente de 1 a 40, mejor de 1 a 10;
- 15 • **G** representa un grupo -OR o -NRR', siendo R y R' como se definen previamente o siendo tales que forman, con el átomo de nitrógeno al que están ligados, un grupo heterocicloalquilo (C₄-C₁₀) que puede comprender en el anillo otro heteroátomo elegido de N, O y S y que opcionalmente puede estar sustituido con al menos un sustituyente elegido de un grupo alquilo (C₁-C₄), un átomo de halógeno y un grupo hidroxilo;
- **RCG1** representa el grupo -SZ_a o -C(=O)-Z_bR_b;
- **Z_a** representa Ac, **R_a** o SR_a;
- 20 • **R_a** representa H, o un grupo alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C₄-C₁₀) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, NO₂, un grupo arilo o heteroarilo;
- **Z_b** representa un enlace sencillo, -O- o -NH- y representado **R_b** H o un grupo alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C₄-C₁₀) o alternativamente **Z_b** representa un enlace sencillo y **R_b** representa Hal;
- 25

con la condición de que si **L₁** representa un enlace sencillo, entonces RCG1 represente -SZ_a.

Los compuestos de fórmula (I) pueden existir así en la forma:



30 La divulgación también se refiere a compuestos de fórmula (I'):

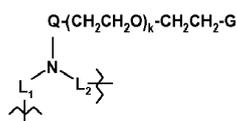


en la que:

- --- representa un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que --- representa un enlace sencillo, entonces:
- 5 ⊗ --- representa un enlace sencillo;
- ⊗ **U** y/o **U'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H;
- ⊗ **W** y/o **W'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí: OH, -OR, -OCOR, -COOR, -OCOR, -OCONRR', un carbamato cíclico tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -NRCONRR', -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -SH, -SR, -SOR, -SOOR, -SO₃-, -NR₂SOOR', -NRR', una amina cíclica tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -NROR', -NRCOR', -N₃, -CN, Hal, un grupo trialquilfosfonio o triarilfosfonio;
- 10 • **R₁**, **R₂**, **R₁'**, **R₂'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí: H, Hal o un grupo alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR con q = 0, 1 o 2;
- 15 o alternativamente
- R₁** y **R₂** y/o **R₁'** y **R₂'** forman juntos, respectivamente, un doble enlace =CH₂ o =CH-CH₃;
- **Y** e **Y'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H o -OR;
- **M** representa CH o N;
- **ALK** y **ALK'** indican un grupo alquileo (C₁-C₆);
- 20 • **R** y **R'** representan, independientemente entre sí, H o un grupo alquilo (C₁-C₆) o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;
- **L₁** representa:
 - un enlace sencillo;
 -
 - 25 ○ el grupo -(OCH₂CH₂)_i-, ligado al anillo de fenilo o piridilo a través del átomo de oxígeno, representando i un número entero que varía de 2 a 40, preferiblemente de 2 a 10;
 -
 - el grupo -D-ALK(C₁-C₆)- ligado al anillo de fenilo o piridilo a través del anillo D, en el que D representa -O-, -NH- o -N-alquil(C₁-C₄)-;
- 30 • **L₂** representa:

- o un grupo -ALK(C₁-C₆)-;
 - o
 - o el grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-, representado j un número entero que varía de 1 a 40, preferiblemente de 1 a 10;
- 5
- o
 - o un grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂NR"-ALK(C₁-C₆)-, ligado al átomo de nitrógeno a través de la unidad -(CH₂CH₂O)-, representado j un número entero que varía de 1 a 40, preferiblemente de 1 a 10, y representado R" H o un grupo alquilo (C₁-C₄);
- Q representa un enlace sencillo o el grupo C(=O);
- 10
- k representa un número entero que varía de 0 a 40, preferiblemente de 1 a 40, mejor de 1 a 10;
 - G representa un grupo -OR o -NRR', siendo R y R' como se definen previamente o siendo tales que forman, con el átomo de nitrógeno al que están ligados, un grupo heterocicloalquilo (C₄-C₁₀) que puede comprender en el anillo otro heteroátomo elegido de N, O y S y que opcionalmente puede estar sustituido con al menos un sustituyente elegido de un grupo alquilo (C₁-C₄), un átomo de halógeno y un grupo hidroxilo;
- 15
- RCG1 representa el grupo -SZ_a o -C(=O)-Z_bR_b;
 - Z_a representa Ac, R_a o SR_a;
 - R_a representa H, o un grupo alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C₄-C₁₀) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, NO₂, un grupo arilo o heteroarilo;
- 20
- Z_b representa un enlace sencillo, -O- o -NH- y representando R_b H o un grupo alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C₄-C₁₀) o alternativamente Z_b representa un enlace sencillo y R_b representa Hal;

con la condición de que si L₁ representa un enlace sencillo, entonces RCG1 represente -SZ_a.



25 El término L indica el enlazador definido por

Más particularmente, si L₁ representa un enlace sencillo, L₂ representa -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂- o -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂NR"-ALK(C₁-C₆)- y/o k≠2.

30 Más particularmente, cuando M representa N, -D-ALK(C₁-C₆)- representa mejor -O-ALK(C₁-C₆)-. Más particularmente, los dos grupos ALK y ALK' ligados al núcleo de fenilo o piridilo definen ambos un grupo metileno.

Más particularmente, D representa -O-, -NH- o -NMe-.

35 La divulgación se refiere a las fórmulas (I) y (I') anteriores, en las que cada grupo alquileo (así, por ejemplo, los dos grupos ALK y ALK') ligado al núcleo de fenilo o piridilo puede ser idéntico o diferente; según otro ejemplo, el grupo ALK de -D-ALK(C₁-C₆)- puede ser idéntico a o diferente del grupo ALK ligado al núcleo de fenilo o piridilo. ALK se puede elegir, por ejemplo, de uno de los siguientes: -CH₂-, -CH₂CH₂-, CH₂CMe₂-, -CH₂CH₂CH₂-.

40 Y e Y' representan más particularmente un grupo alcoxi (C₁-C₄), especialmente el grupo metoxi.

R y R' pueden representar más particularmente, independientemente entre sí, H o un grupo alquilo (C₁-C₆).

45 Según una realización particular, U=U' y/o W=W' y/o R₁=R₁' y/o R₂=R₂' y/o Y=Y' y/o ambos grupos ALK y ALK' ligados al núcleo de fenilo o piridilo son idénticos (dímero simétrico, que es más fácil de preparar).

Más particularmente, **W** y **W'** son idénticos o diferentes y representan OH, OMe, OEt, NHCONH₂, SMe.

R'' puede representar H o un grupo alquilo (C₁-C₄), especialmente Me.

M representa más particularmente un átomo de nitrógeno (N).

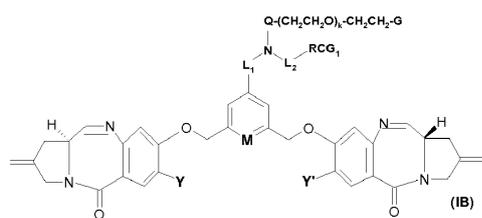
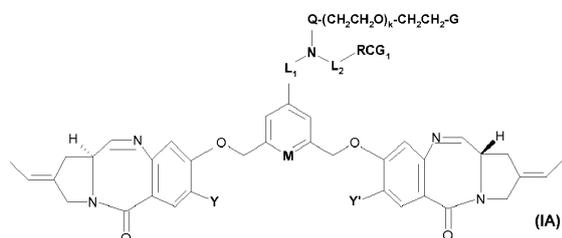
Más particularmente, **R₁** y **R₂** y/o **R₁'** y **R₂'** forman juntos, respectivamente, un doble enlace =CH₂ o =CH-CH₃, más específicamente =CH-CH₃.

G puede representar un grupo -OR, más particularmente un grupo -OH o -O-alquilo(C₁-C₆), especialmente -OMe. **G** también puede representar un grupo -NRR' en el que R y R' representan, independientemente entre sí, H o un grupo alquilo (C₁-C₆). Más particularmente, **G** puede representar así un grupo -NH₂, -NH-alquilo(C₁-C₆) o -N-alquilo(C₁-C₆)₂, especialmente -N(CH₃)₂. **G** también puede representar un grupo -NRR' en el que R y R' forman, junto con el átomo de nitrógeno al que están ligados, un grupo heterocicloalquilo (C₄-C₁₀) que puede comprender en el anillo otro heteroátomo elegido de N, O y S y que opcionalmente puede estar sustituido con al menos un sustituyente elegido de un grupo alquilo (C₁-C₄), un átomo de halógeno y un grupo hidroxilo. El grupo heterocicloalquilo se puede elegir especialmente de piperacino, N-metilpiperacino, morfolino, piperidino y pirrolidino.

k representa un número entero que varía de 0 a 40. **k** puede tomar el valor 0 (sin cadena de PEG que termina con G ligado al átomo de nitrógeno). Entre los compuestos de la invención, se puede hacer una distinción para los que comprenden una cadena de PEG que termina con G ligado al átomo de nitrógeno y **k** varía de 1 a 40, mejor de 1 a 10, mejor de 1 a 5. También se puede hacer una distinción para los que comprenden al menos una cadena de PEG, es decir aquellos para los que **k** varía de 1 a 40, preferiblemente de 1 a 10, mejor de 1 a 5, y/o **L₁**= -(OCH₂CH₂)_j- y/o **L₂**= -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂- o alternativamente -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂NR''-ALK(C₁-C₆)-

Los compuestos de las fórmulas (I) y (I'), incluyendo los dados como ejemplos, pueden existir en la forma de bases o de sales por adición con ácidos farmacéuticamente aceptables, y también en la forma de hidratos o solvatos de estas bases o de estas sales.

Más particularmente, se hace una distinción para los de fórmula **(IA)** o **(IB)**:



Por otra parte, se distinguen los siguientes:

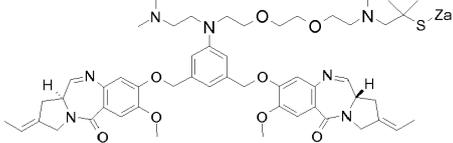
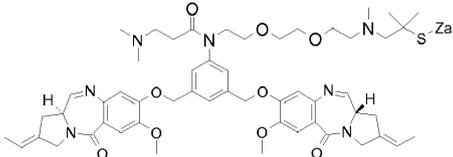
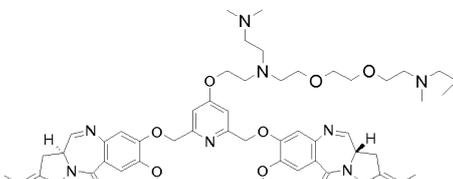
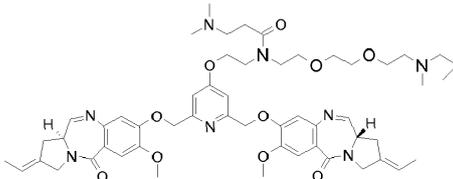
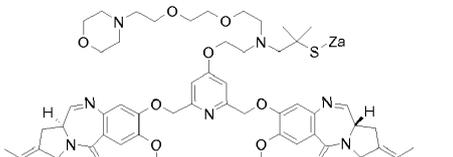
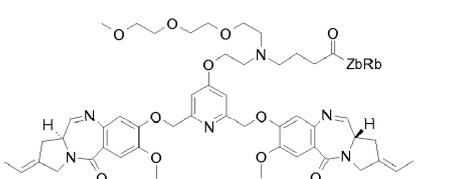
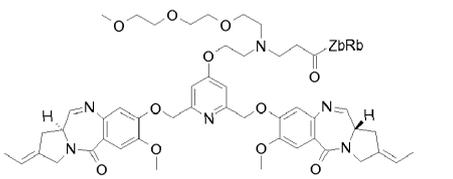
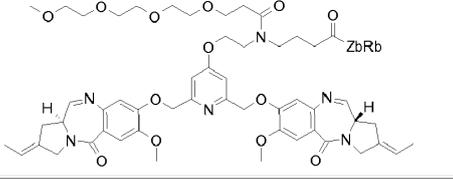
- un primer subgrupo de compuestos para los que **L₁**= -D-ALK(C₁-C₆)- y **L₂**= -ALK(C₁-C₆)-;
- un segundo subgrupo de compuestos para los que **L₁**= -(OCH₂CH₂)_j- y **L₂**= -ALK(C₁-C₆)-;
- un tercer subgrupo de compuestos para los que **L₁**= enlace sencillo y **L₂**= -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂NR''-ALK(C₁-C₆)-;
- un cuarto subgrupo de compuestos para los que **L₁**= -D-ALK(C₁-C₆)-, y **L₂**= -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂NR''-ALK(C₁-C₆)-;
- un quinto subgrupo de compuestos para los que **L₁**= -D-ALK(C₁-C₆)- y **L₂**= -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-.

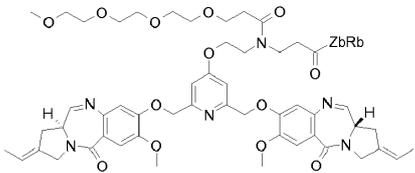
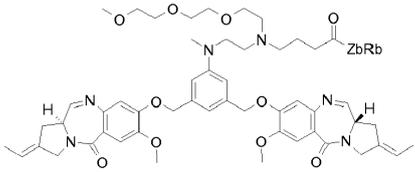
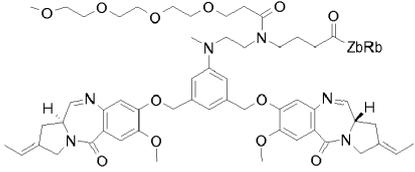
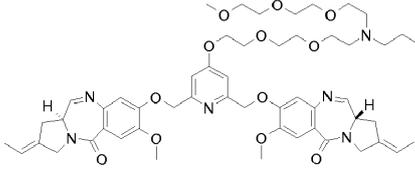
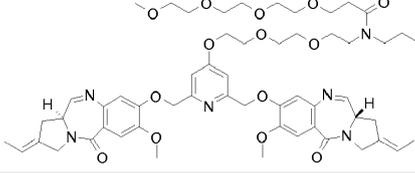
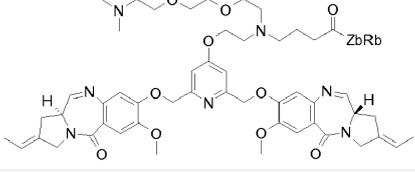
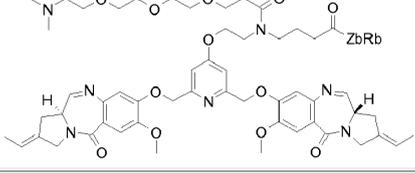
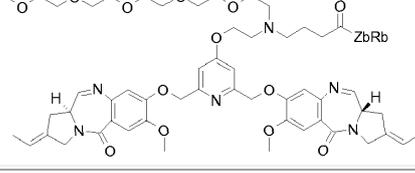
También se pueden distinguir los siguientes grupos de compuestos:

- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 = -(OCH_2CH_2)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -SZ_a$;
- 5 ▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 =$ enlace sencillo, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -SZ_a$;
- 10 ▪ $L_1 =$ enlace sencillo, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 =$ enlace sencillo, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=0-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 =$ enlace sencillo, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -SZ_a$;
- 15 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=0-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -SZ_a$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -SZ_a$;
- 20 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$; ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$; ▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$;
- 25 ▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$; ▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -(OCH_2CH_2)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$; ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$;
- 30 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=0-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G=NRR'$, $RCG1 = -C(=O)Z_bR_b$.

En los grupos de compuestos definidos anteriormente:

i representa más particularmente un número entero que varía de 2 a 10, especialmente un número entero igual a 3;

L ₁	L ₂	Q	G	Compuesto de fórmula (IA)	n°
					
enlace sencillo	-(CH ₂ CH ₂ O) _j -CH ₂ CH ₂ NR"-ALK-	CO	NRR'		16
-D-ALK-	-(CH ₂ CH ₂ O) _j -CH ₂ CH ₂ NR"-ALK-	-	NRR'		17
-D-ALK-	-(CH ₂ CH ₂ O) _j -CH ₂ CH ₂ NR"-ALK-	CO	NRR'		18
-D-ALK-	ALK	-	NRR'		19
-D-ALK-	ALK	-	OR		20
-D-ALK-	ALK	-	OR		21
-D-ALK-	ALK	CO	OR		22
-D-ALK-	ALK	CO	OR		23

L ₁	L ₂	Q	G	Compuesto de fórmula (IA)	n°
					
-D-ALK-	ALK	-	OR		24
-D-ALK-	ALK	CO	OR		25
-(OCH ₂ CH ₂) _i -	ALK	-	OR		26
-(OCH ₂ CH ₂) _i -	ALK	CO	OR		27
-D-ALK-	ALK	-	NRR'		28
-D-ALK-	ALK	CO	NRR'		29
-D-ALK-	ALK	-	OR		30
-D-ALK-	ALK	CO	OR		31

L ₁	L ₂	Q	G	Compuesto de fórmula (IA)	n°
-D-ALK-	-(CH ₂ CH ₂ O) _j -CH ₂ CH ₂ -	-	OR		32
-D-ALK-	-(CH ₂ CH ₂ O) _j -CH ₂ CH ₂ -	CO	OR		33
-D-ALK-	-(CH ₂ CH ₂ O) _j -CH ₂ CH ₂ -	-	NRR'		34
-D-ALK-	-(CH ₂ CH ₂ O) _j -CH ₂ CH ₂ -	CO	NRR'		35
-D-ALK-	ALK	CO	NRR'		36

Los compuestos descritos comprenden un grupo químico reactivo (RCG1) que es reactivo hacia un grupo químico reactivo (RCG2) presente en el agente de unión. La reacción entre RCG1 y RCG2 realiza la ligación del compuesto de fórmula (I) al agente de unión mediante la formación de un enlace covalente. Así, los compuestos de fórmula (I) se pueden conjugar a un agente de unión.

5

RCG1 representa:

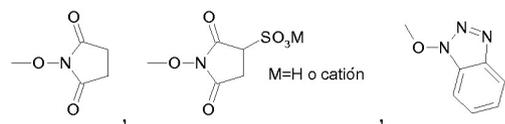
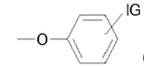
(i) el grupo reactivo -SZ_a para el que Z_a representa H o el grupo -SR_a y R_a representando un grupo alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C₄-C₁₀);

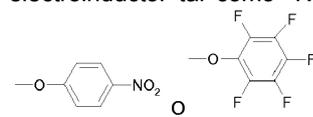
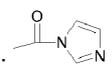
10 (ii) el grupo reactivo -C(=O)-Z_bR_b para el que Z_b representa un enlace sencillo, -O- o -NH-, más particularmente -O-, y R_b representando H o un grupo alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C₄-C₁₀).

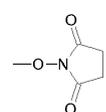
Más particularmente, -SZ_a puede representar -SH o -SS-alquilo(C₁-C₆), especialmente -SSMe, o -SS-heteroarilo,

especialmente  (definiéndose posteriormente en la presente X₁ y X₂). Más particularmente, -SZ_a puede representar -SH o -SS-alquilo(C₁-C₆), especialmente -SSMe.

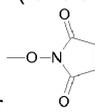
5 Más particularmente, -Z_bR_b puede representar -OH (función ácido), -O-alquilo(C₁-C₆), especialmente -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH=CH₂ (función éster) o alternativamente -Z_bR_b puede representar

 o el grupo  en el que IG representa al menos un grupo electroinductor tal como -NO₂ o -Hal, especialmente -F. Puede ser, por ejemplo, uno de los siguientes grupos:

 . Otro tipo de grupo -C(=O)Z_bR_b es el siguiente:  . Los grupos reactivos -SH y

10  muestran buena reactividad.

Más particularmente, -Z_bR_b puede representar -OH (función ácido), -O-alquilo(C₁-C₆), especialmente -OCH₃,

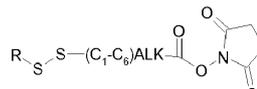
-OCH₂CH₃, o alternativamente -Z_bR_b puede representar  .

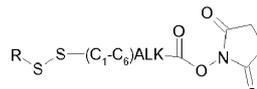
15 Más particularmente, RCG1 se puede elegir de uno de los descritos en los ejemplos.

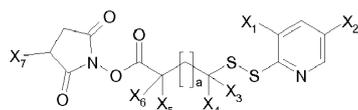
Como ejemplos de RCG2, se pueden mencionar los grupos ε-amino de lisinas soportadas por las cadenas laterales de residuos de lisina que están presentes en la superficie de un anticuerpo, los grupos sacáricos de la región de bisagra o los tioles de cisteínas mediante la reducción de enlaces disulfuro intracatenarios (Garnett M.C. y cols., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, 171-216). Más recientemente, se han considerado otros enfoques, tales como la introducción de cisteínas mediante mutación (Junutula J.R. y cols., *Nature Biotechnology* **2008**, 26, 925-932; documento **WO 09026274**) o la introducción de aminoácidos no naturales que permiten otros tipos de química (de Graaf A.J. y cols., *Bioconjugate Chem.* **2009**, Fecha de Publicación (Web): 3 de febrero de 2009 (Revisión); DOI: 10.1021/bc800294a; documento **WO 2006/069246** y según Chin J.W. y cols., *JACS* **2002**, 124, 9026-9027 (tecnología ReCode[®])). Estos modos de ligación usados con anticuerpos son aplicable a todos los agentes de elección de diana conocidos como una función de su estructura.

También es posible modificar químicamente el agente de elección de diana a fin de introducir nuevos grupos químicos reactivos RCG2. Así, es bien conocido por los expertos en la técnica cómo modificar un anticuerpo usando un agente de modificación (véase especialmente la página 14 del documento WO 2005/077090). La modificación hace posible mejorar la reacción de conjugación y usar una variedad más amplia de grupos RCG1.

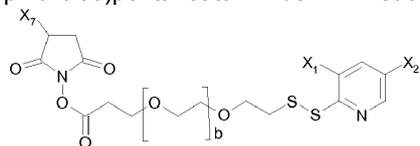
Agentes modificadores para introducir grupos disulfuro



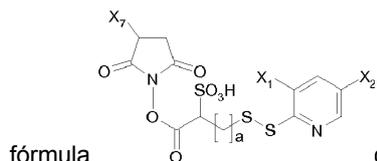
El agente modificador puede ser un éster activado NHS de fórmula  en la que R representa un grupo alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, cicloalquilo (C₃-C₇), heterocicloalquilo (C₄-C₁₀); por ejemplo, es posible usar ditiopropionato de N-piridilo (SPDP) o piridiltiobutirato de N-succinimidilo (SPDB) o el éster N-hidroxisuccinimidílico de ácido 4-(2-piridilditio)butanoico a fin de introducir grupos reactivos ditiopiridilo RCG2 (véase Bourdon M.A. y cols., *Biochem. J.* **1978**, 173, 723-737; US 5208020) que a continuación se pueden hacer reaccionar con un grupo químico reactivo RCG1 del tipo -SH presente sobre el enlazador del dímero de pirrolo[1,4]benzodiazepina a fin de formar un nuevo enlace -S-S- (véase el Ej. 1) para un conjugado que soporta un enlace disulfuro. El grupo N-hidroxisuccinimida reacciona preferentemente en los grupos amino presentes en el anticuerpo a fin de formar enlaces amida. Otro ejemplo de un agente modificador se describe en el documento **WO**



2004/016801 de fórmula piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SNPP), ; por ejemplo, es posible usar 4-(5-nitro-2-

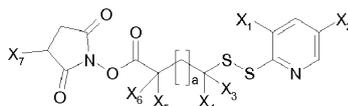


o un análogo pegilado de fórmula descrito en el documento **WO 2009/134976** o un análogo sulfónico de



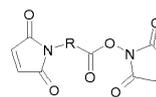
fórmula descrito en el documento **WO 2009/134977**, fórmulas en las que:

- 5 - X_3, X_4, X_5, X_6 representan H o un grupo alquilo (C_1-C_6),
- X_1 y X_2 representan -H, $-CONX_8X_9$, $-NO_2$, X_8 y representando X_9 H o un grupo alquilo (C_1-C_6),
- X_7 representa $-SO_3^-M^+$ o H o alternativamente un grupo amonio cuaternario;
- a indica un número entero que varía de 0 a 4 y b indica un número entero que varía de 0 a 2000, preferiblemente entre 1 y 200; a y b pueden tomar todos los valores entre, respectivamente, 0 y 4 o entre 0 y 2000.

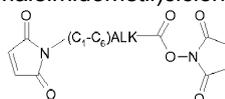


- 10 Preferiblemente, entre los compuestos de fórmula $X_1=X_4=X_5=X_6=X_7=H$, , $a=1$, $X_3=Me$ y $X_2=NO_2$ y

Agentes modificadores para introducir grupos maleimido



- 15 Otro agente modificador puede ser un éster activado NHS de fórmula en la que R representa un grupo $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_n-$ ciclohexil-, $-ciclohexil-(CH_2)_n-$ y n representa un número entero que varía de 1 a 10; por ejemplo, es posible usar 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (según el documento **EP 0306943**) o un sulfo-SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo).

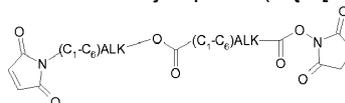


Otros ejemplos que se pueden mencionar incluyen: tales como 3-maleimidopropanoato de N-

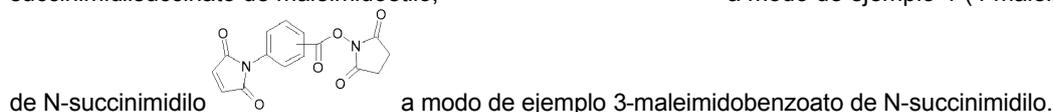
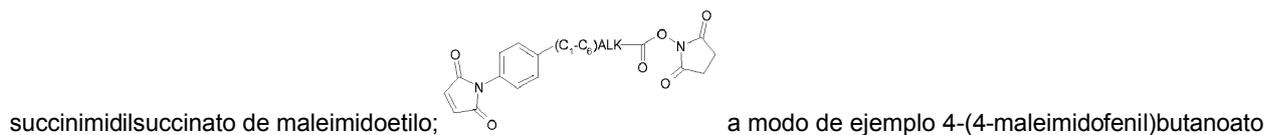
succinimidilo; a modo de ejemplo 6-(3-maleimidopropionamido)hexanoato de N-

succinimidilo; siendo b un número entero entre 0 y 2000, preferiblemente entre 1 y 200 (b puede tomar todos los valores entre 0 y 2000), a modo de ejemplo 3-(2-{2-[3-maleimidopropionilamino]-

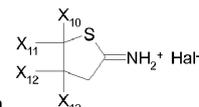
- 20 etoxi}etoxi)propanoato de N-succinimidilo o SM(PEG)₂; a modo de ejemplo N-



etoxi}etoxi)propanoato de N-succinimidilo o SM(PEG)₂; a modo de ejemplo N-



Agentes modificadores para introducir grupos tiol



5 Otro ejemplo de un agente modificador descrito en el documento **WO 90/06774** tiene la fórmula la que: en

- Hal representa un átomo de halógeno;

10 - X_{10} representa un átomo de halógeno o el grupo $COOX_{14}$, nitro, alquilo (C_1-C_8) no sustituido o halogenado, alcoxi (C_1-C_8) no sustituido o halogenado, alqueno (C_2-C_8) no sustituido o halogenado, alquilo (C_2-C_8) no sustituido o halogenado, cicloalquilo (C_3-C_8) no sustituido, arilo que no está sustituido o está sustituido con de uno a tres sustituyentes seleccionados de amino, un átomo de halógeno, un grupo alquilo (C_1-C_8) no sustituido o halogenado o un alcoxi (C_1-C_8) no sustituido o halogenado;

- cada uno de los grupos X_{11} , X_{12} , X_{13} representa independientemente un átomo de hidrógeno o alternativamente puede representar X_{10} ;

15 o X_{10} y X_{11} forman juntos un anillo de alqueno (C_2-C_5), que no está sustituido o está sustituido con de uno a cinco grupos alquilo (C_1-C_4);

o X_{10} o X_{11} forman, junto con X_{12} , un anillo de alqueno (C_1-C_5), que no está sustituido o está sustituido con de uno a cinco grupos alquilo (C_1-C_4);

20 y X_{14} es -H o un grupo alquilo (C_1-C_8);

o $X_{10}=X_{11}=X_{12}=X_{13}=H$.

25 Preferiblemente, Hal representa un átomo de cloro o bromo. Posibilidades para $X_{10}-X_{13}$ se encontrarán en la tabla posterior:

X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	Hal
Me	H	H	H	Cl
Ph	H	H	H	Cl
t-Bu	H	H	H	Cl
Me	Me	H	H	Cl
$(-CH_2(CH_2)_3CH_2-)$		H	H	Cl
H	$(-CH_2(CH_2)_3CH_2-)$	H	H	Cl
Et	H	H	H	Br
Et	Me	H	H	Cl
$\underbrace{-CH-CH_2-CH}$	H	H	H	Cl
Me	H	Me	H	Cl
H	H	Me	Me	Cl
Ph	Me	H	H	Cl

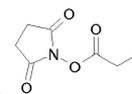
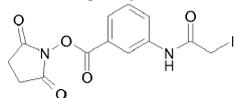
X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	Hal
4-CIPh	H	H	H	Cl
3-furanilo	H	H	H	Cl
i-Pr	H	H	H	Cl
Me	Me	Me	Me	Cl
C ₆ H ₁₁	H	H	H	Cl
CH ₂ Br	H	H	H	Cl
CF ₃	H	H	H	Cl
CH=CH ₂	H	H	H	Cl
2-NH ₂ Ph	H	H	H	Cl



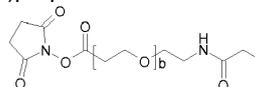
Un ejemplo de un iminotiolano preferido es el siguiente:

Agentes modificadores para introducir grupos haloacetamido

Otro ejemplo de un agente modificador es 4-(N-yodoacetil)aminobenzoato de succinimidilo (SIAB)

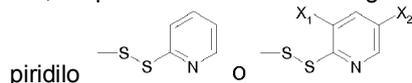


5 , o compuestos similares, incluyendo N-yodoacetato de succinimidilo (SIA) , N-bromoacetato de succinimidilo (SBA) o 3-(N-bromoacetamido)propionato de succinimidilo (SBAP) o un compuesto

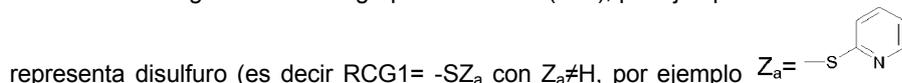


10 pegilado similar descrito en el documento **WO 2009/134976** , siendo **b** como se describe previamente. Las Figuras 1 y 2 ilustran la modificación de un grupo amino de un agente de unión con SPDP o alternativamente el iminotiolano preferido anterior.

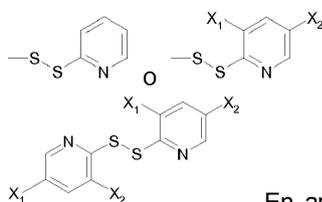
Así, es posible introducir en el agente de unión grupos RCG2 disulfuro (-SSR), especialmente de tipo disulfuro de



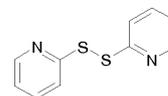
piridilo en el caso en el que RCG1 representa -SH. De forma similar, es posible introducir en el agente de unión grupos RCG2 tiol (-SH), por ejemplo con un iminotiolano, en el caso en el que RCG1



15 representa disulfuro (es decir RCG1= -SZ_a con Z_a≠H, por ejemplo Z_a= -S-). También es posible modificar estos grupos RCG2 tiol (-SH) en grupos RCG2 disulfuro (-SSR), especialmente de tipo disulfuro de piridilo

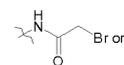
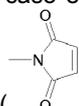


mediante reacción con los correspondientes disulfuros aromáticos



En ambos casos, el enlace covalente que se forma mediante la reacción entre RCG1 y RCG2 es un enlace disulfuro escindible.

20 También es posible, en el caso en el RCG1 representa -SH, introducir en la superficie del agente de unión RCG2



grupos de tipo maleimido () o haloacetamido (p. ej. bromo- o yodoacetamido). En este caso, el enlace covalente que se forma mediante la reacción entre RCG1 y RCG2 es un enlace disulfuro no escindible.

Así,

■ en presencia de un derivado de fórmula (I) que comprende un grupo químico reactivo RCG1 del tipo -SZ_a, el agente de unión comprende:

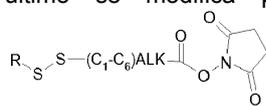
- grupos químicos disulfuro en el caso en el que RCG1 representa -SH;
- grupos químicos tiol en el caso en el que RCG1 representa -SZ_a con Z_a≠H;

5 ▪ grupos químicos maleimido o haloacetamido en el caso en el que RCG1 representa -SH;

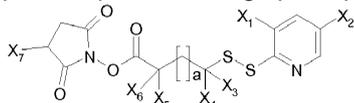
■ en presencia de un derivado de fórmula (I) que comprende un grupo químico reactivo RCG1 del tipo -C(=O)-Z_bR_b, el derivado de fórmula (I) se hace reaccionar con las funciones amino del agente de unión, especialmente los grupos ε-amino soportados por las cadenas laterales de los residuos de lisina (Lys) de un anticuerpo.

Más particularmente,

10 ■ cuando el grupo químico reactivo RCG1 es del tipo -SH, y cuando el agente de unión soporta funciones amino, especialmente grupos ε-amino soportados por las cadenas laterales de los residuos de lisina de un anticuerpo, el último se modifica por medio de un agente modificador elegido de un compuesto de fórmula:

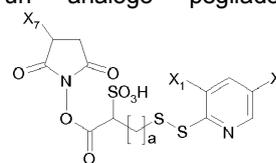
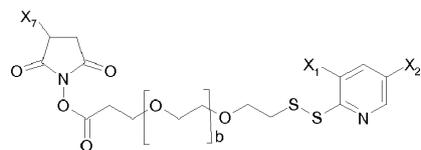


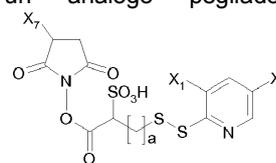
o en la que R representa un grupo alquilo (C₁-C₆), arilo, heteroarilo, cicloalquilo (C₃-C₇),

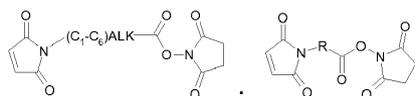


heterocicloalquilo (C₄-C₁₀);

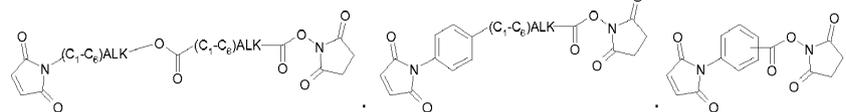
, un análogo pegilado de fórmula:



15 o un análogo sulfónico de fórmula  en la que X₃ X₄, X₅, X₆ representan H o un grupo alquilo (C₁-C₆), X₁ y X₂ representan -H, -CONX₈X₉, -NO₂, X₈ y representando X₉ H o un grupo alquilo (C₁-C₆), X₇ representa -SO₃⁻M⁺ o H o alternativamente un grupo amonio cuaternario y a indica un número entero que varía de 0 a 4 y b indica un número entero que varía de 0 a 2000; o se elige de 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo; 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de



20 sulfosuccinimidilo; en el que R representa un grupo -(CH₂)_n-(CH₂)_n-ciclohexil-, -ciclohexil-(CH₂)_n- y n representa un número entero que varía de 1 a 10;

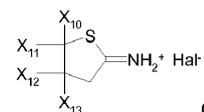


siendo b un número entero entre 0 y

2000; ; N-bromoacetato de succinimidilo; 3-(N-bromoacetamido)propionato de

25 succinimidilo; , siendo b un número entero entre 0 y 2000.

■ cuando el grupo químico reactivo RCG1 es del tipo -SZ_a con Z_a≠H, y cuando el agente de unión soporta funciones amino, especialmente grupos ε-amino soportados por las cadenas laterales de los residuos de lisina de un



anticuerpo, el último se modifica por medio de un agente modificador de fórmula previamente.

descrito

- 5 ■ cuando el grupo químico reactivo RCG1 es del tipo -SH, y cuando el agente de unión contiene funciones tiol, especialmente después de la introducción de cisteínas mediante la mutación o mediante la modificación química de un agente de unión que contiene funciones amino, el agente de unión se modifica de modo que sus funciones tiol se conviertan en funciones disulfuro. Es posible, por ejemplo, usar un agente modificador elegido de un compuesto de

fórmula en la que X₁ y X₂ representan -H, -CONX₈X₉ o -NO₂, representando X₈ y X₉ H o un grupo alquilo (C₁-C₆).

- 10 La **Tabla II** posterior ilustra la modificación de un grupo amino de un agente de unión según los métodos precedentes. Por simplicidad, se usan las siguientes abreviaturas:

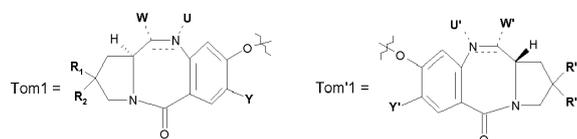
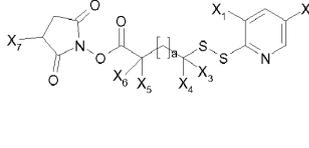
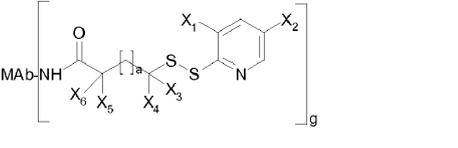
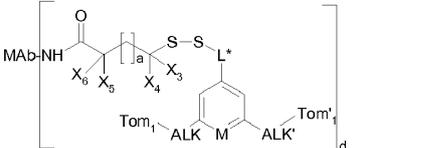
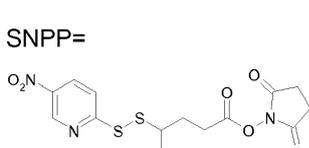
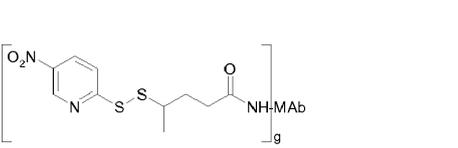
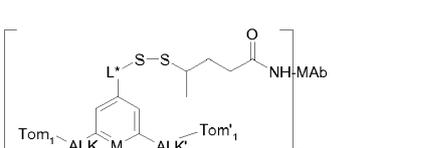
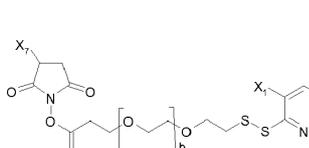
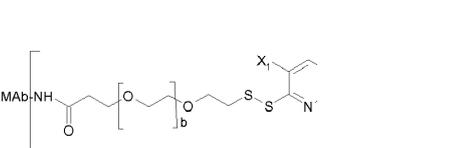
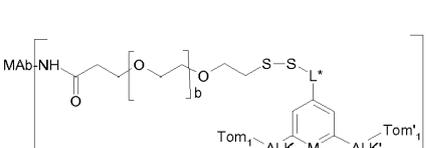
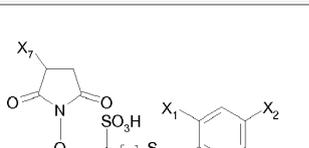
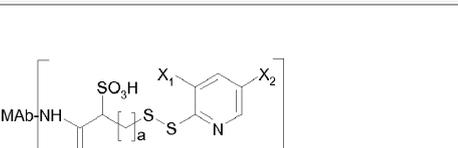
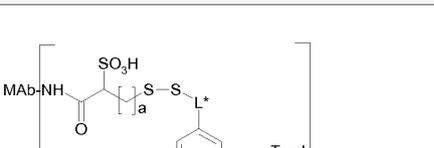
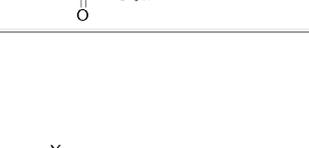
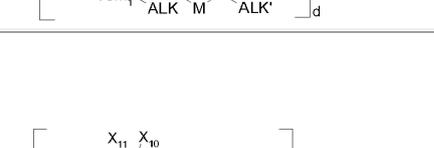
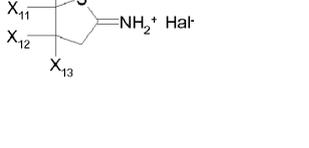
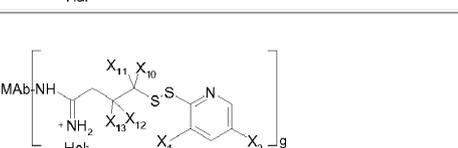
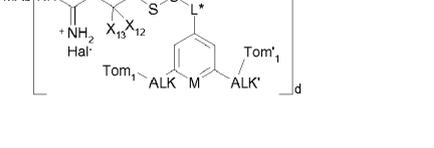
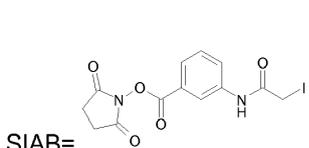
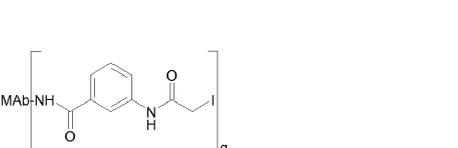
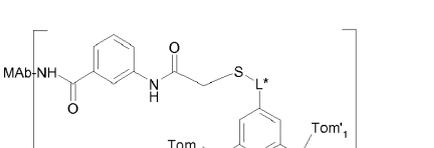
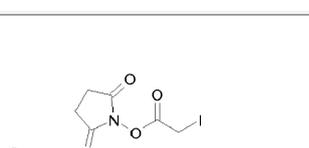
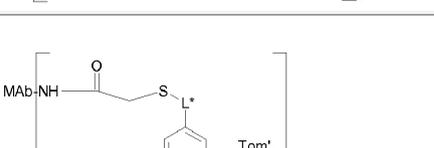
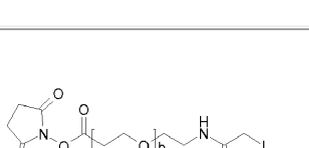
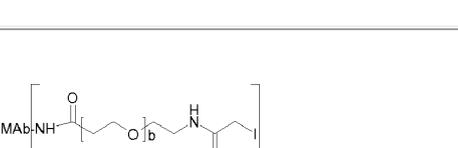
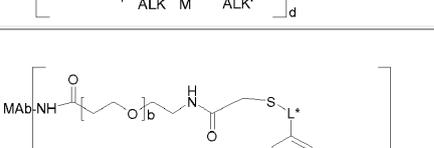


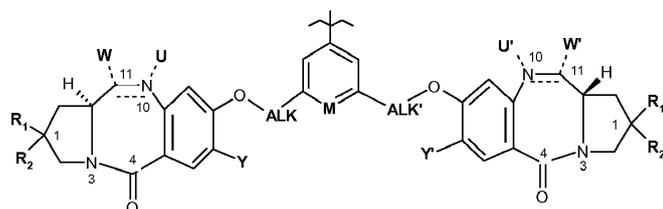
Tabla II: ejemplos de modificaciones de agentes de unión cuando RCG1=-SZ_a

Agente modificador	Ejemplo después de la reacción en un grupo amino, especialmente lisina, de un anticuerpo, indicado MAb	Conjugado
SPDP= 		
SPDB= 		
SMCC= 		
sulfo-SMCC= 		

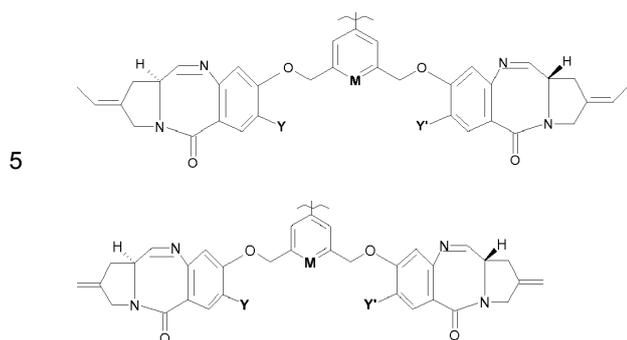
Agente modificador	Ejemplo después de la reacción en un grupo amino, especialmente lisina, de un anticuerpo, indicado MAb	Conjugado
		
<p>SNPP=</p> 		
		
		
		
		
<p>SIAB=</p> 		
<p>SIA=</p> 		
		

g: número de funciones RCG2 en un agente de unión modificado; d: número de dímeros de pirrolo[1,4]benzodiazepina en el agente de unión Mab
L* representa -L₁-(Q-CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂-G)-L₂-

Los compuestos según la invención se pueden usar así para la preparación de un agente de unión al que está ligado covalentemente en la posición para de **M** el dímero de fórmula:

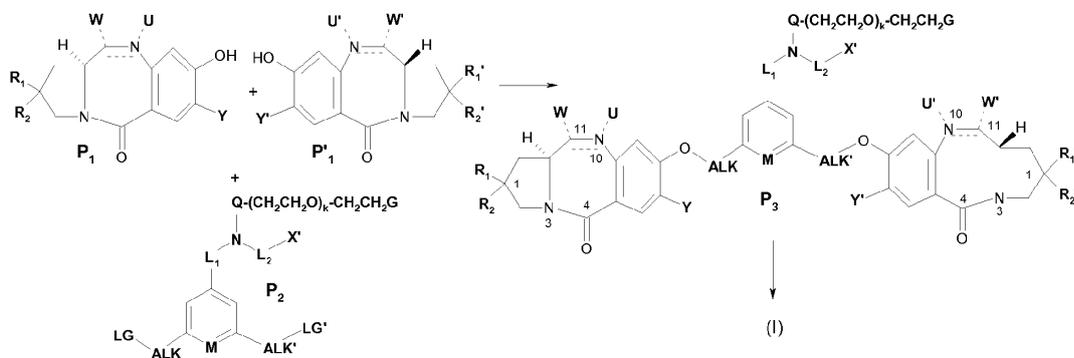


Más particularmente, el agente de unión es un anticuerpo. Más particularmente, el dímero tiene la fórmula:



Procedimiento para preparar los compuestos de fórmula (I)

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar según el **Esquema 1**:



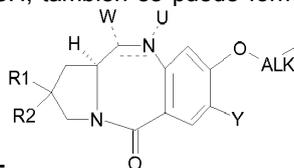
Esquema 1

Los compuestos **P₁**, **P₁'** y **P₂** se hacen reaccionar entre sí para dar **P₃**. **LG** y **LG'** indican un grupo de salida. El término "grupo de salida" indica un átomo o un grupo de átomos que, en la reacción heterolítica entre **P₂** y **P₁** o **P₁'**, sale tomando el par solitario de electrones del enlace covalente que conecta **ALK** y **LG** o **LG'**. El grupo de salida se elige más particularmente de un átomo de halógeno, especialmente cloro o bromo, un grupo mesilato, tosilato o nosilato o $-OPPh_3^+$. Los compuestos **P₂** intermedios también forman parte de la invención.

En la preparación de un compuesto de fórmula (I) que comprende el grupo RCG1, **X'** puede representar dicho grupo RCG1, en cuyo caso **P₃** representa un compuesto de fórmula (I). **X'** también puede ser un precursor de dicho grupo RCG1 del tipo $-SZ_a$ o alternativamente $-C(=O)Z_bR_b$ y, en este caso, es necesario convertir **X'** en RCG1 por medio de una o más reacciones químicas. Según una variante, la conversión $X' \rightarrow$ RCG1 también se puede realizar sobre **P₂**.

Así, para la preparación de un compuesto **P₃** (o según la variante **P₂**) para el que $Z_a=H$, se prefiere introducir un grupo $X'=-SZ_a$ para el que $Z_a=-S$ -alquilo(C_1-C_6) usando el precursor del enlazador correspondiente, y a continuación reducir la función disulfuro $-SS$ -alquilo(C_1-C_6) hasta una función tiol $-SH$. Para hacer esto, se puede hacer uso, por ejemplo, de tris(2-carboxietil)fosfina: véase a este respecto Burns J.A. y cols., *J. Org. Chem.* **1991**, 56(8), 2648-2650. Esta conversión $-SS$ -alquilo(C_1-C_6) \rightarrow $-SH$ se puede aplicar especialmente a los compuestos **1** a **19** de la **Tabla I**.

En el caso de la preparación de un compuesto de fórmula (I) a partir de **P**₃ según la conversión **X'** → RCG1 de modo que RCG1 represente el grupo -SH, también se puede formar un compuesto **P**₃, de modo que **X'** también pueda

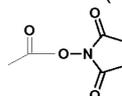


representar el grupo -SZ_a con Z_a=

correspondiente al aducto de una función tiol hasta la función imina.

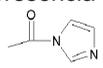
5

De forma similar, para la producción de un compuesto de fórmula (I) que comprende un grupo RCG1= -C(=O)Z_bR_b, es posible convertir un grupo X'= -C(=O)Z_bR_b en un grupo RCG1= -C(=O)Z_bR_b por medio de una o más reacciones



químicas. En particular, en el caso en el que -C(=O)Z_bR_b= , es posible introducir en un compuesto **P**₃ (o según la variante **P**₂) el grupo **X'** = -C(=O)O-alquilo(C₁-C₄) o -C(=O)O-alilo, que a continuación se convierte en un grupo -C(=O)OH, que finalmente reacciona con carbonato de N,N'-disuccinimidilo o NHS. La conversión -COOalquilo/alilo en -COOH se puede realizar mediante tratamiento con una base tal como LiOH o un catalizador de paladio, por ejemplo tetraquis(trifenilfosfina)paladio en presencia de un "eliminador" de amina, por ejemplo morfolina. La reacción con N,N'-disuccinimidilo se realiza en presencia de una base, por ejemplo DIPEA; la reacción con NHS se realiza en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo DCC. De forma similar, en el caso en el que

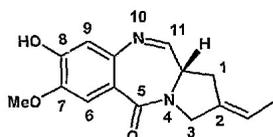
10

-C(=O)Z_bR_b= , es posible introducir un grupo -C(=O)Z_bR_b= -COOH, que a continuación reacciona con N,N'-carbonyldiimidazol (JACS **1958**, 80, 4423; JACS **1960**, 82, 4596). Esta conversión **X'** = -C(=O)Z_bR_b → RCG1 = -C(=O)Z_bR_b se puede aplicar especialmente a los compuestos de los Ejemplos **20** a **36** de la **Tabla I**.

15

Los compuestos **P**₁ y **P**₁' se describen en las solicitudes de patente WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, WO 07085930 o WO 2009/016516 o son accesibles a través de síntesis total (Mori M. y cols., *Tetrahedron*, **1986**, 42, 3793-3806). En el caso en el que **P**₁ y/o **P**₁' represente(n) tomamicina de fórmula:

20



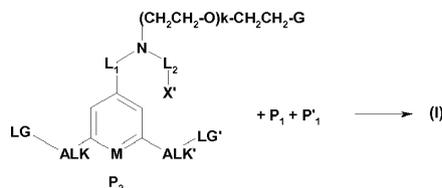
Tomamicina

la última se puede preparar con la ayuda de la cepa *Streptomyces croceus* al seguir la enseñanza del documento FR 1516743 o alternativamente mediante síntesis total (véase *J. Antibiotics* **1983**, XXXVI(3), 276-282 Z. Tozuka "Studies on tomaymycin. Total syntheses of the antitumor antibiotics E- y Z-tomaymycins"). También existen compuestos **P**₁/**P**₁' comerciales.

25

Para la introducción de los grupos WW', la función imina (---- = doble enlace) es capaz de añadir diversos compuestos HW/HW' (por ejemplo H₂O, alcohol ROH).

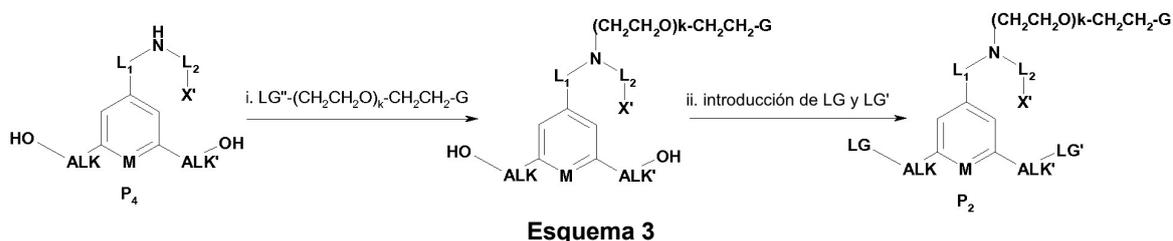
Caso en el que Q = enlace sencillo



30

Esquema 2

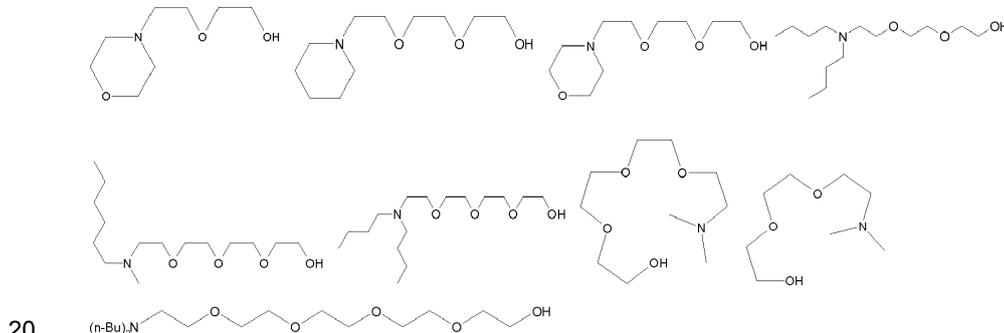
Preparación de P₂



- 5 i. reacción nucleófila entre la función amina secundaria -NH- de P₄ y un reactivo de fórmula LG''-(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂-G (LG'' = grupo de salida) en presencia de una base, a modo de ejemplo K₂CO₃ en un disolvente polar tal como DMF o THF.

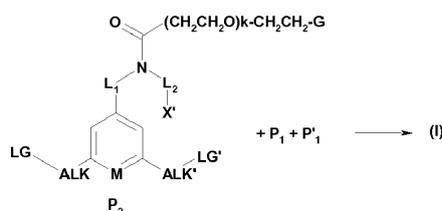
10 El reactivo LG''-(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂-G se obtiene a partir de un compuesto de fórmula HO-(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂-G al reemplazar el grupo -OH por el grupo de salida LG'' por medio de reacciones químicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en el caso en el que LG'' representa un grupo mesilato, se hace uso de cloruro de metanosulfonilo en presencia de una base tal como una amina terciaria (por ejemplo TEA). En el caso en el que LG'' representa I, el mesilato está sustituido con I, por ejemplo usando yoduro sódico, según D. Marquis y cols. *J. Org. Chem.* **1995**, 24, 7984-96.

15 Los PEG-alcoholes de fórmula HO(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂OCH₃ están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, el catálogo de la compañía americana QuantaBioDesign, Ltd.). Otros PEG-alcoholes HO(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂OR con R≠Me están disponibles comercialmente o alternativamente están disponibles de HO(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂OH por medio de reacciones químicas conocidas por los expertos en la técnica. De forma similar, ciertos compuestos para los que G=NRR' y k>=1 están disponibles comercialmente, por ejemplo:



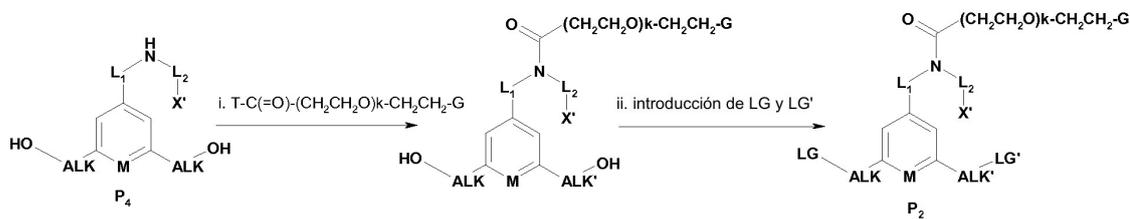
- ii. introducción de LG y LG'. En el caso de un grupo mesilato, se hace uso de MSC en presencia de una base tal como una amina terciaria (por ejemplo TEA).

Caso en el que Q=C(=O)



25

Preparación de P₂



Esquema 5

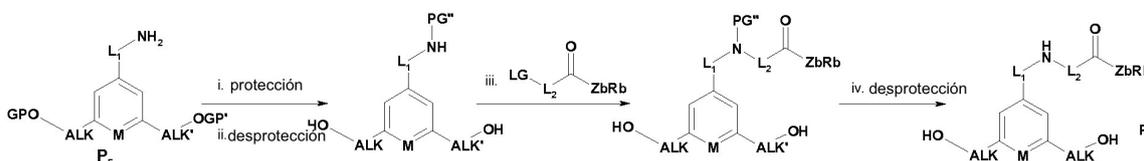
i. Reacción de amidación entre P₄ y un derivado de ácido carboxílico de fórmula T-C(=O)-(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂-G.

5 El derivado de ácido carboxílico puede ser un haluro de acilo (T = -Hal). Según una variante, se hace uso de un éster activado (por ejemplo T = -ONHS) o alternativamente el ácido carboxílico (T = -OH) en presencia de un agente de acoplamiento. Los PEG-ácidos de fórmula HOC(=O)-(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂OR se pueden preparar a partir de los correspondientes PEG-alcoholes de fórmula HO-(CH₂CH₂O)_{k-1}-CH₂CH₂OR, que están disponibles comercialmente para k= 1 a 11, mediante la adición de acrilato sódico, según J. Huskens, J.A. Peters, H. van Bekkum, *Tetrahedron* 1993, 15, 3149-64. Asimismo, este es el caso cuando G es el grupo NRR' para k>=1 partiendo de los correspondientes compuestos de fórmula H-(OCH₂CH₂)_{k-1}-CH₂CH₂NRR'. De forma similar, los compuestos HOC(=O)-(CH₂CH₂)-NRR' (k=0) están disponibles comercialmente.

ii. introducción de LG y LG'. En el caso de un grupo mesilato, se hace uso de MSC en presencia de una base tal como una amina terciaria (por ejemplo TEA).

15 Preparación de P₄

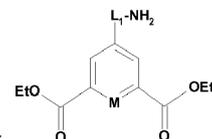
Caso en el que X' = -C(=O)-Z_bR_b



Esquema 6

20 i. introducción del grupo protector PG". En el caso de un grupo nosilato, se hace uso de cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo en presencia de una base tal como una amina terciaria (por ejemplo TEA) o piridina;

ii. desprotección de los grupos PG y PG'. Por ejemplo, en presencia de ácido clorhídrico o TFA cuando los grupos PG y PG' son TBDMS.



25 Según una variante, en el caso en el que ALK=ALK'=-CH₂-, P₅ puede representar . La etapa de desprotección se reemplaza a continuación por una etapa de reducción de la función éster hasta un -CH₂OH, por ejemplo como borohidruro sódico; para hacer esto, se pueden aplicar las condiciones de reducción dadas en las páginas 62-63 del documento WO 2007/085930. Según se describe posteriormente, esta variante que consiste en usar un diéster y a continuación aplicar una reducción se puede generalizar al otro P₅. Por otra parte, la reducción de las funciones éster se puede realizar sobre un P₄ pero opcionalmente también, según una variante, sobre un P₅.

30 iii. Reacción nucleófila entre la función amina protegida -NH(PG'') y un reactivo de fórmula LG-L₂-C(=O)-Z_bR_b en presencia de una base, a modo de ejemplo K₂CO₃ en un disolvente polar tal como DMF o THF.

Para el caso en el que L₂=ALK(C₁-C₆), están disponibles comercialmente los ésteres bromoalquílicos de fórmula Br-ALK(C₁-C₆)-C(=O)-OMe. Para el caso en el que L₂=(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-, LG se puede introducir partiendo de los

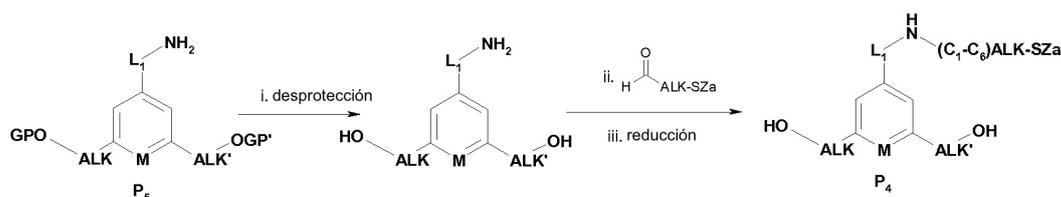
correspondientes PEG-alcoholes de fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{Z}_b\text{R}_b$. Estos compuestos están disponibles comercialmente o alternativamente se pueden obtener a partir de los correspondientes PEG-dioles de fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{H}$, que están disponibles comercialmente para $j = 1$ a 11, mediante la adición de acrilato sódico, según J. Huskens, J.A. Peters, H. van Bekkum, *Tetrahedron* **1993**, 15, 3149-64.

- 5 iv. desprotección del grupo PG'' . Por ejemplo en presencia de tiofenol y una base tal como carbonato de cesio cuando PG'' es el grupo nosilato.

Caso en el que $\text{X}' = -\text{SZ}_a$

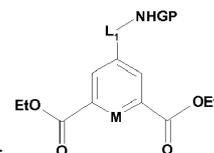
Caso en el que $\text{L}_2 = \text{ALK}(\text{C}_1-\text{C}_6)$

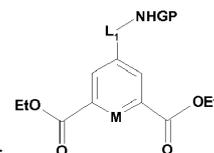
10



Esquema 7

i. desprotección de los grupos protectores PG y PG' , preferiblemente en medio ácido, por ejemplo en presencia de ácido clorhídrico o TFA cuando los grupos PG y PG' son TBDMS.

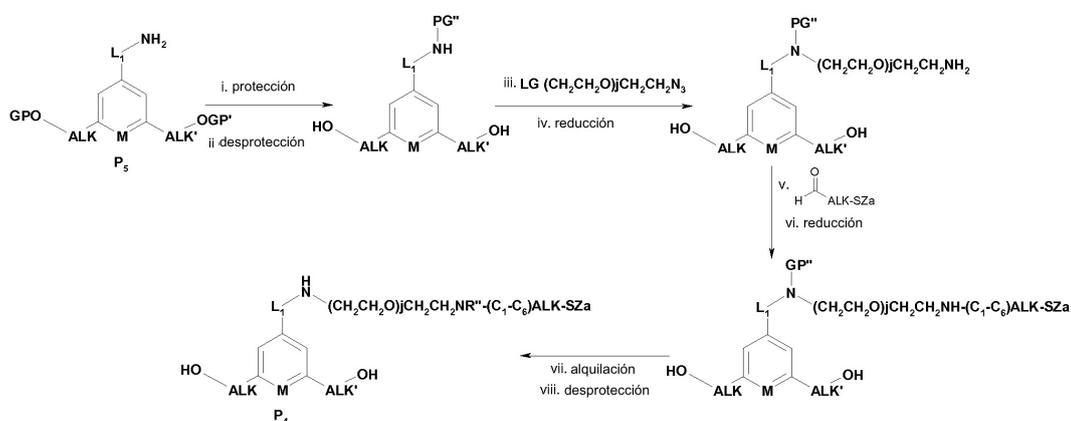


- 15 Según una variante, en el caso en el que $\text{ALK} = \text{ALK}' = -\text{CH}_2-$, P_5 puede representar . La etapa de desprotección de las funciones alcohol se reemplaza a continuación por una reacción de reducción de la función éster hasta una función $-\text{CH}_2\text{OH}$, por ejemplo con borohidruro sódico, seguida por una etapa de desprotección de la función amina; para hacer esto, se pueden aplicar las condiciones de reacción dadas en las páginas 62-63 del documento WO 2007/085930.

ii. aminación reductiva con el aldehído de fórmula $\text{HC}(=\text{O})-\text{ALK}-\text{SZ}_a$;

- 20 iii. la amina intermedia se reduce in situ con un agente reductor, a modo de ejemplo triacetoxiborohidruro sódico según A.F. Abdel-Magid y cols., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3849-62, preferiblemente en ácido acético.

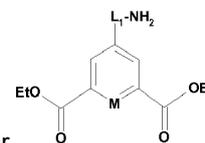
Caso en el que $\text{L}_2 = -(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}''-\text{ALK}-$

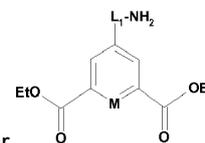


Esquema 8

i. introducción del grupo protector PG". En el caso de un grupo nosilato, se hace uso de cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo en presencia de una base tal como una amina terciaria (por ejemplo TEA) o piridina;

ii. desprotección de los grupos PG y PG'. Por ejemplo en presencia de ácido clorhídrico o TFA cuando los grupos PG y PG' son TBDMS.



5 Según una variante, en el caso en el que $ALK=ALK'=-CH_2-$, P_5 puede representar . A continuación, la etapa de desprotección se reemplaza por una etapa de reducción de la función éster hasta una función $-CH_2OH$, por ejemplo con borohidruro sódico; para hacer esto, se pueden aplicar las condiciones de reducción dadas en las páginas 62-63 del documento WO 2007/085930.

10 iii. reacción nucleófila entre la función amina protegida $-NH(PG'')$ y un reactivo de fórmula $LG-(CH_2CH_2O)_jCH_2CH_2N_3$ en presencia de una base, a modo de ejemplo K_2CO_3 en un disolvente polar tal como DMF o THF. Estos compuestos se pueden obtener según el documento WO 07/085930, partiendo de los correspondientes PEG-dioles de fórmula $HO-(CH_2CH_2O)_j-H$, que están disponibles comercialmente para $j=0$ a 10.

iv. reducción del grupo azido, por ejemplo a través de la reacción de Staudinger en presencia de trifetilfosfina y agua.

15 v. aminación reductiva con el aldehído de fórmula $HC(=O)-ALK-SZa$;

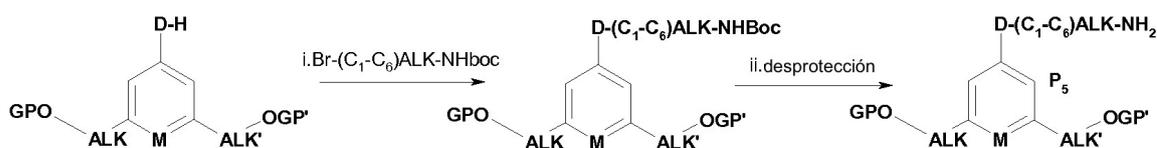
vi. la amina intermedia se reduce in situ con un agente reductor, a modo de ejemplo triacetoxiborohidruro sódico, según A.F. Abdel-Magid y cols., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3849-62, preferiblemente en ácido acético.

vii. alquilación de la función amina secundaria.

20 viii. desprotección del grupo PG". Por ejemplo en presencia de tiofenol y una base tal como carbonato de cesio cuando PG" es el grupo nosilato.

Preparación de P_5

Caso en el que $L_1=-D-ALK(C_1-C_6)-$, $D = O$ o NH

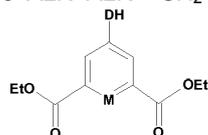


Esquema 9

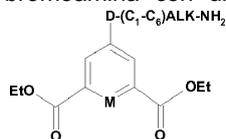
25 i. reacción nucleófila entre la función $-DH$ y una bromoamina protegida con boc de fórmula $Br-ALK(C_1-C_6)-NHboc$ en presencia de una base, a modo de ejemplo K_2CO_3 en un disolvente polar tal como DMF o THF (véanse, por ejemplo, las condiciones de la página 63 del documento WO 07085930).

30 ii. desprotección selectiva de la amina, preferiblemente en medio ácido, por ejemplo en presencia de ácido clorhídrico o TFA. Para los casos en los que no se puede realizar una desprotección selectiva, por ejemplo cuando los grupos PG y PG' son TBDMS, es necesaria una etapa de reprotección selectiva de los alcoholes.

Según una variante, en el caso en el que $ALK=ALK'=-CH_2-$, es posible realizar la sustitución nucleófila de la

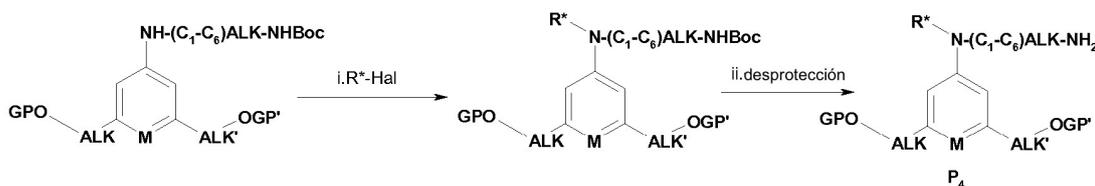


bromoamina con un diéster de fórmula:



que se usa en la forma que se obtiene, para la preparación de **P₄**.

Caso en el que $L_1=-N(\text{alquil}(C_1-C_4))-ALK(C_1-C_6)-$

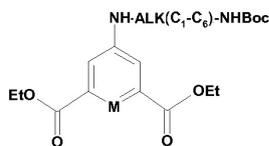


5

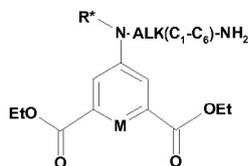
Esquema 9'

i. reacción nucleófila entre la función -NH- y un haluro de alquilo de fórmula R^*-Hal con $R^* = \text{alquilo } (C_1-C_4)$ en presencia de una base, a modo de ejemplo K_2CO_3 en un disolvente polar tal como DMF o THF.

Según una variante, en el caso en el que $ALK=ALK'=-CH_2-$, es posible realizar la sustitución nucleófila del haluro de

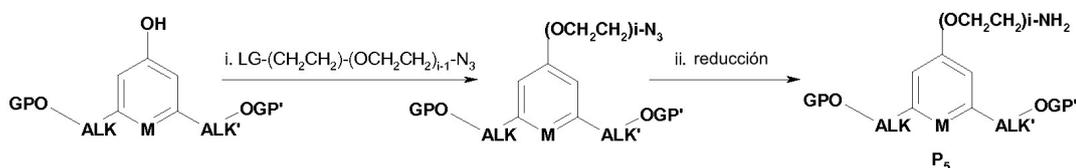


10 alquilo con un diéster de fórmula:



que se usa en la forma que se obtiene, para la preparación de **P₄**.

Caso en el que $L_1=-(OCH_2CH_2)_i$

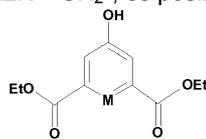


Esquema 10

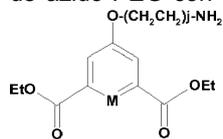
15 i. reacción nucleófila entre una de las funciones -OH (estando las dos otras protegidas con PG que indica un grupo protector) y un reactivo de azido-PEG de fórmula $LG-(CH_2CH_2)-(OCH_2CH_2)_{i-1}-N_3$ que soporta un grupo nucleófilo (LG) tal como Hal o mesilato, en presencia de una base, a modo de ejemplo K_2CO_3 en un disolvente polar tal como DMF o THF (véanse, por ejemplo, las condiciones de la página 63 del documento **WO 07085930**).

20 ii. reducción del grupo azido, por ejemplo con trifetilfosfina en presencia de agua en un disolvente polar tal como THF.

Según una variante, en el caso en el que $ALK=ALK'=-CH_2-$, es posible realizar una sustitución nucleófila del reactivo

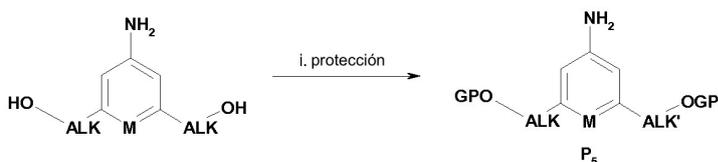


de azido-PEG con el hidroxidiéster de fórmula:



, a fin de obtener un compuesto P_5 de fórmula

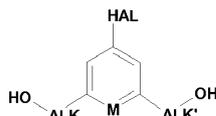
Caso en el que $L_1 =$ enlace sencillo



5

Esquema 11

i. protección de los grupos alcohol



P_5 se puede obtener a partir del halo-diolo de fórmula

10 (compuestos 2 y 3 del Esquema 1). Dos ejemplos de dioles protegidos son los de N° CAS 181225-40-1 y 181225-41-2. El halo-diolo se puede obtener mediante la reducción del correspondiente compuesto de diácido o diéster, por ejemplo el de N° CAS 193010-40-1. Véase también en el caso de una piridina ($M=N$): *Liebigs Annalen der Chemie* **1991**, 10, 987-988 o *Tetrahedron* **2005**, 61(7), 1755-1763 (compuesto 3 del Esquema 1).

15 Un experto en la técnica puede ser inspirado por las condiciones operativas de los ejemplos descritos posteriormente que se dan para los enlazadores particulares L_1 y L_2 y pueden adaptarlas a los otros enlazadores L_1 y L_2 .

Procedimiento para preparar el conjugado

El conjugado se obtiene a través del procedimiento que consiste en:

20 (i) poner en contacto y dejar reaccionar una solución acuosa, opcionalmente tamponada, del agente de unión, opcionalmente modificado con un agente modificador, y una solución de un compuesto de fórmula (I);

(ii) y a continuación opcionalmente separar los conjugados formados en la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) y/o el agente de unión sin reaccionar y/o cualesquiera agregados que se puedan haber formado.

25 El grupo químico RCG1 del compuesto de fórmula (I) debe ser reactivo hacia los grupos químicos RCG2 presentes en el agente de unión, especialmente hacia los grupos amino presentes en anticuerpos, habiendo sido introducidos dichos grupos químicos RCG2, cuando sea apropiado, por el agente modificador, a fin de ligar el compuesto de fórmula (I) al agente de unión a través de la formación de un enlace covalente.

30 Según una variante, en la etapa (ii) el conjugado formado en la etapa (i) se separa del agente de unión sin reaccionar y de cualesquiera agregados que puedan estar presentes en la solución. Según otra variante, en la etapa (ii) el conjugado procedente de la etapa (i) se separa solamente del compuesto de fórmula (I) sin reaccionar y de los agregados que se puedan haber formado, y cualquier agente de unión sin reaccionar se deja en solución.

La solución acuosa del agente de unión se puede tamponar con al menos un tampón, a modo de ejemplo fosfato potásico o ácido N-2-hidroxietilpiperacino-N'-2-etanosulfónico (tampón de HEPES). El tampón depende de la naturaleza del agente de unión. El compuesto de fórmula (I) se disuelve en un disolvente orgánico polar, por ejemplo DMSO o DMA.

La reacción tiene lugar a una temperatura generalmente de entre 20 y 40°C. El tiempo de reacción puede variar entre 1 y 24 horas. La reacción entre el agente de unión y el compuesto de fórmula (I) se puede verificar mediante SEC con un detector refractométrico y/o ultravioleta, a fin de determinar su avance. Si el grado de injerto es insuficiente, la reacción se puede dejar durante más tiempo y/o se puede añadir compuesto de fórmula (I). Se puede hacer referencia al método general dado en la sección de ejemplos para detalles adicionales referentes a las condiciones particulares que se pueden usar para la conjugación.

Un experto en la técnica tiene a su disposición diversas técnicas cromatográficas para la separación de la etapa (ii): el conjugado se puede purificar, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión estérica (SEC), mediante cromatografía de adsorción (tal como intercambio iónico, IEC), mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), mediante cromatografía de afinidad, mediante cromatografía sobre soportes mixtos tales como hidroxiapatito cerámico, o mediante HPLC. También se puede usar la purificación mediante diálisis o diafiltración.

El término "agregados" significa asociaciones que se pueden formar entre dos o más agentes de unión, posiblemente habiéndose modificado los agentes de unión mediante conjugación. Los agregados son capaces de formarse bajo la influencia de un gran número de parámetros tales como alta concentración del agente de unión en la solución, el pH de la solución, altas fuerzas de cizalladura, el número de dímeros injertados y su naturaleza hidrófoba, la temperatura (véanse las referencias citadas en la introducción de *J. Membrane Sci.* **2008**, 318, 311-316), ocasionalmente no explicándose con precisión la influencia de algunos de ellos. En el caso de las proteínas o los anticuerpos, se puede hacer referencia a *AAPS Journal*, "Protein Aggregation and Bioprocessing" **2006**, 8(3), E572-E579. El contenido de agregados se puede determinar por medio de técnicas conocidas tales como SEC (véase a este respecto *Analytical Biochemistry* **1993**, 212(2), 469-480). Después de la etapa (i) o (ii), la solución del conjugado puede sufrir una etapa (iii) de ultrafiltración y/o diafiltración. El conjugado en la solución acuosa se obtiene así después de estas etapas.

30 Anticuerpo

El anticuerpo (véase a este respecto Janeway y cols. "Immunobiology", 5ª edición, 2001, Garland Publishing, Nueva York) se puede elegir de los descritos especialmente en las solicitudes de patente WO 04043344, WO 08010101, WO 08047242, WO 05009369 (anti-CA6). El anticuerpo puede ser especialmente monoclonal, policlonal o multiespecífico. También puede ser un fragmento de anticuerpo. También puede ser un anticuerpo murino, humano, humanizado o quimérico.

Conjugado

Una conjugado comprende generalmente de aproximadamente 1 a 10 dímeros de pirrolo[1,4]benzodiazepina ligados al agente de unión (este es el grado de injerto o la "relación de fármaco a anticuerpo" (o "DAR")). Este número varía como una función de la naturaleza del agente de unión y del dímero, y también de las condiciones operativas usadas para la conjugación (por ejemplo el número de equivalentes de dímero con relación al agente de unión, el tiempo de reacción, la naturaleza del disolvente y de cualquier codisolvente). Poner en contacto el agente de unión y el dímero conduce a una mezcla que comprende: varios conjugados que se distinguen individualmente entre sí por diferentes DAR; posiblemente en agente de unión sin reaccionar (en el caso de una reacción incompleta); posiblemente agregados. La DAR, que se determina sobre la solución final, por ejemplo mediante espectroscopía UV, corresponde así a una DAR media.

En el caso en el que el agente de unión es un anticuerpo, la espectroscopía UV puede ser un método usado para determinar la DAR. Este método está inspirado por el presentado en Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, "Therapeutic Antibodies y Protocols", vol. 525, 445, Springer Science. Consiste en medir la absorbancia de una solución de conjugado después de la etapa de separación (ii) a dos longitudes de onda señaladas WL1 y WL2. Se usan los siguientes coeficientes de extinción molar del anticuerpo puro y del dímero de pirrolo[1,4]benzodiazepina antes de la conjugación.

Las absorbancias de la solución de conjugado a WL1 y WL2 (A_{WL1}) y (A_{WL2}) se miden bien en el pico correspondiente del espectro de SEC (lo que hace posible calcular una "DAR(SEC)") o bien al usar un espectrofotómetro UV estándar (lo que hace posible calcular una "DAR(UV)"). Las absorbancias se pueden expresar en la forma:

$$A_{WL1} = (C_D \times \epsilon_{D, WL1}) + (C_A \times \epsilon_{A, WL1})$$

$$A_{WL2} = (C_D \times e_{D WL2}) + (C_A \times e_{A WL2})$$

ecuaciones para las que:

5 • C_D y C_A indican, respectivamente, las concentraciones en la solución de la parte del conjugado relacionada con el dímero de pirrolo[1,4]benzodiazepina y la parte del conjugado relativa al anticuerpo;

• $e_{D WL1}$ y $e_{D WL2}$ indican, respectivamente, los coeficientes de extinción molar del dímero de pirrolo[1,4]benzodiazepina antes de la conjugación a las longitudes de onda $WL1$ y $WL2$;

• $e_{A WL1}$ y $e_{A WL2}$ indican, respectivamente, los coeficientes de extinción molar del anticuerpo puro a las dos longitudes de onda $WL1$ y $WL2$.

10 El término "anticuerpo puro" significa el anticuerpo al que no está ligada pirrolo[1,4]benzodiazepina, es decir, el anticuerpo antes de la etapa de conjugación.

La resolución de estas dos ecuaciones conduce a:

$$C_D = [(e_{A WL1} \times A_{WL2}) - (e_{A WL2} \times A_{WL1})] / [(e_{D WL2} \times e_{A WL1}) - (e_{A WL2} \times e_{D WL1})]$$

15 $C_A = [A_{WL1} - (C_D \times e_{D WL1})] / e_{A WL1}$

La DAR media corresponde entonces a C_D/C_A . En el caso de los dímeros de pirrolo[1,4]benzodiazepina, las dos longitudes de onda consideradas son: $WL1= 280$ nm y $WL2= 320$ nm. La DAR media está preferiblemente entre 1 y 10, y preferiblemente entre 1,5 y 7.

20 El conjugado se puede usar como un agente anticanceroso. En virtud de la presencia del agente de unión, el conjugado se hace muy selectivo hacia células tumorales en vez de células sanas. Esto hace posible dirigir el compuesto de fórmula (I) que tiene actividad anticancerosa a un ambiente cercano a estas células tumorales o directamente a las mismas (véanse a este respecto las siguientes publicaciones que describen el uso de conjugados de anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer: "Antibody-drug conjugates for cancer therapy" Carter P.J. y cols., *Cancer J.* **2008**, 14, 154-169; "Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs" Chari R., *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 98-107). Es posible trata cánceres sólidos o líquidos.

25

El conjugado se formula en la forma de una solución acuosa tamponada a una concentración generalmente de entre 1 y 10 mg/ml. Esta solución se puede inyectar en forma de perfusión como tal, o se puede rediluir para formar una solución de perfusión.

30

Ejemplos

Método A: Cromatografía de líquidos de alta presión – Espectrometría de masas (LMSC)

35 Los espectros de adquirieron en una máquina Waters UPLC-SQD en modo de ionización por electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-). Condiciones cromatográficas: columna: ACQUITY BEH C18- 1,7 μ m – 2,1x50 mm; disolventes: A: H₂O (0,1% de ácido fórmico) B: CH₃CN (0,1% de ácido fórmico); temperatura de la columna: 50°C; caudal: 1 ml/min; gradiente (2 min): de 5 a 50% de B en 0,8 min; 1,2 min: 100% de B; 1,85 min: 100% de B; 1,95: 5% de B.

Método B: Cromatografía de líquidos de alta presión – Espectrometría de masas (LMSC)

40 Los espectros de adquirieron en una máquina Waters ZQ en modo de electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-) con un detector U.V. DAD 200<WL<400 nm. Condiciones cromatográficas: columna: Fenomenex Kinetex C18 100A 3x50 mm, diámetro de partícula 2,6 μ m; disolventes: A: H₂O (0,1% de ácido fórmico) B: CH₃CN; temperatura de la columna: 50°C; caudal: 1 ml/min; gradiente (6 min): 6% de B durante 0,80 min; de 6 a 100% de B en 3,9 min; 4,80 min: 100% de B; 5 min: 6% de B; 6 min: 6% de B.

Método C: Cromatografía de líquidos de alta presión – Espectrometría de masas (LMSC)

Los espectros de adquirieron en una máquina Waters ZQ en modo de electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-) con un detector U.V. DAD 200<WL<400 nm. Condiciones cromatográficas: columna: columna Phenomenex Kinetex C18 3x100 mm, diámetro de partícula 2,6 µm; disolventes: A: H₂O (0,1% de ácido fórmico) B: CH₃CN; temperatura de la columna: 50°C; caudal: 0,8 ml/min; gradiente (8,2 min): 4% de B durante 0,15 min; de 6 a 100% de B en 6,85 min; 7,1 min: 100% de B; 7,4 min: 4% de B; 8,2 min: 4% de B.

Método D: desglicosilación y espectrometría de masas (HRMS) de un conjugado

La desglicosilación es una técnica de digestión enzimática que usa glicosidasa. Se realiza partiendo de 500 µl de conjugado + 100 µl de tampón Tris HCl 50 mM + 10 µl de enzima glicanasa-F (100 unidades de enzima liofilizada/100 µl de agua). La mezcla se somete a turbulencia y se mantiene durante la noche a 37°C. La muestra desglicosilada está entonces lista para ser analizada mediante HRMS. Dependiendo del caso, el análisis de HRMS de la muestra se puede realizar sin desglicosilación previa. En ambos casos, los espectros de masas se obtuvieron en una máquina Waters Xévo Q-ToF en el modo de electropulverización positivo (ES+). Condiciones cromatográficas: columna Acquity UPLC Waters BEH 300 C4 2,1x150 mm, diámetro de partícula 1,7 µm; disolventes: A: H₂O + 0,1% de ácido fórmico; B: CH₃CN + 0,1% de ácido fórmico; temperatura de la columna 70°C; caudal 0,5 ml/min; gradiente (10 min): 20% de B durante 2 min 50 s; de 20 a 80% de B en 2 min 5 s; 8 min 50 s: 80% de B; 8 min 55 s: 20% de B; 10 min: 20% de B.

Método E: Cromatografía de líquidos de alta presión – Espectrometría de masas (LMSC)

Los espectros de adquirieron en un conducto Waters UPLC-SQD en modo de ionización por electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-) con un detector U.V. DAD 210<WL<400 nm. Condiciones cromatográficas: columna: ACQUITY UPLC BEH C18- 1,7 µm – 2,1x30 mm; disolventes: A: H₂O (0,1% de ácido fórmico) B: CH₃CN (0,1% de ácido fórmico); temperatura de la columna: 45°C; caudal: 0,6 ml/min; gradiente (2 min): de 5 a 50% de B en 1 min; de 50 a 100% de B en 0,3 min; 1,45 min: 100% de B; de 100 a 5% de B en 0,3 min; 2 min: 100% de B.

Método F: Cromatografía de líquidos de alta presión – Espectrometría de masas (LMSC)

Los espectros de adquirieron en un conducto Waters ZQ en modo de electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-) con un detector U.V. DAD 200<WL<400 nm. Condiciones cromatográficas: columna: XSelect CSH Waters C18 3x75 mm, diámetro de partícula 3,5 µm; disolventes: A: H₂O (0,1% de ácido fórmico) B: CH₃CN (0,1% de ácido fórmico); temperatura de la columna: 50°C; caudal: 0,8 ml/min; gradiente (6 min): 6% de B durante 0,80 min; de 6 a 100% de B en 3,9 min; 4,80 min: 100% de B; 5 min: 6% de B; 6 min: 6% de B.

Método G: Cromatografía de líquidos de alta presión – Espectrometría de masas (LMSC)

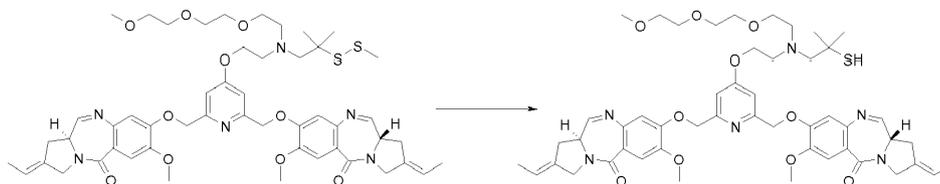
Los espectros de adquirieron en una máquina Waters UPLC-SQD en modo de ionización por electropulverización positivo y/o negativo (ES+/-). Condiciones cromatográficas: columna: ACQUITY BEH C18- 1,7 µm – 2,1x50 mm; disolventes: A: H₂O (0,1% de ácido fórmico) B: CH₃CN (0,1% de ácido fórmico); temperatura de la columna: 50°C; caudal: 0,8 ml/min; gradiente (2,5 min): de 5 a 100% de B en 1,8 min; 2,40 min: 100% de B; 2,45 min: 100% de B; de 100 a 5% de B 0,05 min.

Se usa el anticuerpo hu2H11 (también conocido como hu53 2H11 en la página 15 del documento **WO 2008010101**; es un anticuerpo que comprende una Vh que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 24) o el anticuerpo hu2H11 R35R74 obtenido mediante la mutagénesis dirigida de hu53 2H11 (mencionado en la página 20 del documento **WO 2011039721**; es un anticuerpo que comprende una Vh que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 18 y una VI que tiene la secuencia SEQ N° 16).

Capítulo 1: Nuevos derivados de tomamicina

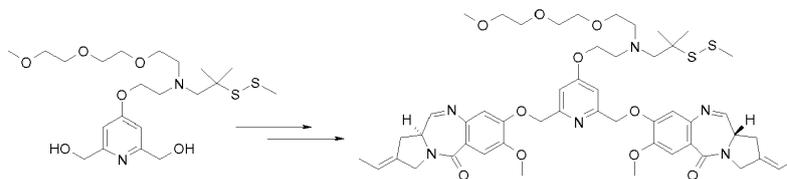
Ejemplo de referencia 1:

1.1. 4-{2-[[2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]}-(2-metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina



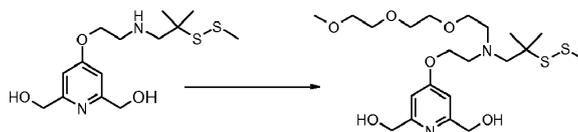
Se añade una solución de 17,5 mg de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina y 15,8 mg de NaHCO₃ en 370 µl de agua a 20 mg de 4-{2-[[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina disuelta en 900 µl de MeOH y 400 µl de DMF. La mezcla obtenida se agita durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Interchrom Puriflash Silica 15/35U 2G), usando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en una mezcla de DCM/acetonitrilo 9:1. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se usan así 7 mg de 4-{2-[[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina: LC/MS (A): t_R = 1,06 min; [M+H]⁺: m/z 941; [M+H₂O+H]⁺: m/z 959.

1.2. 4-{2-[[2-[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina



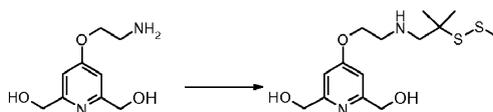
Se añaden 19,4 µl de MSC a una solución de 30 mg de 4-{2-[[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina y 65,5 µl de diisopropiletilamina en 200 µl de DCM enfriado hasta -20°C. Después de agitar durante 20 minutos, la mezcla se hidroliza y la fase orgánica se lava con agua y a continuación se seca sobre MgSO₄ y se concentra bajo presión reducida. El residuo obtenido (36 mg) disuelto en 400 µl de DMF se añade a una solución de 26 mg de tomamicina en 425 µl de DMF, junto con 39,6 mg de K₂CO₃ y 15,8 mg de KI. La mezcla se agita durante 12 horas a 30°C y a continuación se hidroliza hasta que tiene lugar la precipitación. La materia insoluble se retira mediante filtración sobre un embudo sinterizado, se lava con DCM y a continuación las fases orgánicas combinadas se concentran bajo presión reducida y se purifican mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-8g) usando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida, se recogen en una mezcla de dioxano/agua 1/1 y se concentran de nuevo bajo presión reducida. Se obtienen así 23 mg de 4-{2-[[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina. ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d): señales anchas: 1,20 a 1,78 (m, 12 H); 2,40 (s, 3 H); 2,70 a 3,10 (m, 10 H); 3,34 (m, 4 H); 3,49 a 3,70 (m, 8 H); 3,71 (s, 3 H); 3,91 (m, 2 H); 4,00 (s, 6 H); 4,27 (m, 4 H); 5,27 (m, 4 H); 5,60 (m, 2 H); 6,86 (s, 2 H); 7,00 (m, 2H); 7,56 (s, 2 H); 7,65 (d, J=4,4 Hz, 2 H). LC/MS (A): t_R = 0,81 min; [M+H]⁺: m/z 987.

1.3. 4-{2-[[2-(2-Metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



Se añaden 99 mg de 1-yodo-2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etano (B. Ben Aroya Bar Nir, J.F. Kadla *Carbohydrate Polymers*, **2009**, 76, 60-67) y 54 mg de K_2CO_3 a una solución de 100 mg de 4-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propil-amino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina en 2 ml de DMF. Después de 12 horas a $60^\circ C$, la mezcla se complementa con 40 mg de 1-yodo-2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etano y 55 mg adicionales de K_2CO_3 . La mezcla obtenida se agita durante 24 horas más a $80^\circ C$. Después de la concentración bajo presión reducida, el producto en bruto así obtenido se disuelve en una cantidad mínima de MeOH y se aplica sobre Mega BE-SCX, 1GM 6ML (Varian). Después de lavar la fase con MeOH, el producto de interés se eluye con una solución 2 N de amoníaco en MeOH. La fase de MeOH se concentra bajo presión reducida y a continuación se reaplica sobre Mega BE-SCX, 2GM 12ML (Varian) según el mismo protocolo. Las fases de metanol/ NH_3 se concentran bajo presión reducida y el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (columna de 10 g Merck SuperVarioFlash, Si60 15-40 μm), usando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen así 30 mg de 4-{2-[[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): 1,27 (s, 6 H); 2,40 (s, 3 H); 2,75 (s, 2 H); 2,80 (t, J=5,9 Hz, 2 H); 3,00 (t, J=5,9 Hz, 2 H); 3,23 (s, 3 H); 3,40 (m, 2 H); 3,47 a 3,55 (m, 8 H); 4,12 (t, J=5,9 Hz, 2 H); 4,45 (d, J=5,9 Hz, 4 H); 5,30 (t, J=5,9 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): t_R = 0,44 min; $[M+H]^+$: m/z 479; $[M-H+HCO_2H]^-$: m/z 523.

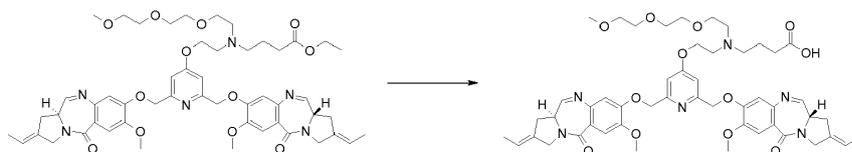
1.4. 4-[2-(2-Metil-2-metildisulfanil-propil-amino)-etoxil]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



Se añaden 270 μl de 2-(metilditio)-isobutiraldehído y 730 μl de isopropóxido de titanio a una suspensión de 390 mg de 4-[2-amino-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (preparada después de la desprotección del grupo boc de 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina descrita en la página 101 del documento **WO 07085930**) en 2 ml de THF. Después de 20 min, se añaden 270 μl más de 2-(metilditio)-isobutiraldehído y 730 μl de isopropóxido de titanio y la mezcla se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se complementa con 6 ml de etanol, se agita durante 20 min a temperatura ambiente y a continuación se complementa con 124 mg de cianoborohidruro sódico. Después de agitar durante 45 minutos, se añaden 124 mg de cianoborohidruro sódico y, después de agitar durante 1 hora, la mezcla se concentra bajo presión reducida y se diluye con EtOAc y agua. El precipitado resultante se separa por filtración y se disuelve en solución acuosa de HCl 1 M. La fase acuosa obtenida se lleva hasta pH básico con solución acuosa de hidróxido sódico 5 M, se extrae 3x con DCM y las fases orgánicas combinadas se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 322 mg de 4-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propil-amino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): 1,26 (s, 6 H); 1,81 (m ancho, 1 H); 2,39 (s, 3 H); 2,67 (s ancho, 2 H); 2,94 (t ancho, J=5,7 Hz, 2 H); 4,11 (t, J=5,7 Hz, 2 H); 4,45 (d, J=5,5 Hz, 4 H); 5,32 (t, J=5,5 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): t_R = 0,24 min; $[M+H]^+$: m/z 347.

Ejemplo 2

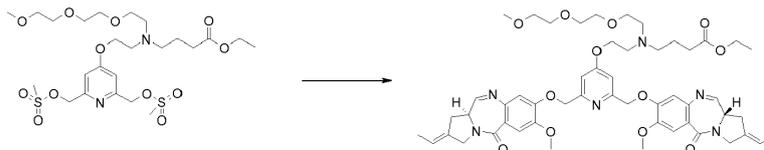
2.1. Ácido 4-[[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,1a-tetrahidro-pirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino]-butanoico



Se añaden 32 μl de una solución acuosa de hidróxido de litio 1 M a una solución de 28 mg de 4-[[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,1a-tetrahidro-pirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-amino]-butanoato de etilo en 527 μl de THF y 61 μl de agua. La mezcla se agita durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente y se añaden a la misma 5 μl adicionales de solución acuosa de hidróxido de litio 1 M. Después de agitar durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se acidifica hasta un

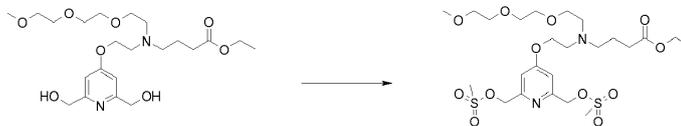
pH cercano a 3 al añadir 800 µl de tampón de fosfato potásico (pH=3) y a continuación se extrae 5x con DCM. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre MgSO₄, se concentran bajo presión reducida y se purifican mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF10-4g), usando un gradiente de 3 a 20% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 10,2 mg de ácido 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1.4]benzo-diazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoico. LC/MS (B): t_R= 3,08min; [M+H]⁺: m/z 939.

2.2. 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo



Se añaden 77 mg de K₂CO₃, 30,7 mg de yoduro potásico y 67 mg de 4-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butirato de etilo a una solución de 50,4 mg de (S)-2-et-(E)-iliden-8-hidroxi-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona en 4 ml de DMF. La mezcla se calienta durante 18 horas a 30°C y a continuación se enfría hasta temperatura ambiente, se filtra a través de una membrana de 0,45 µm, se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF15-12g), usando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 51 mg de 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo. LC/MS (B): t_R= 3,20 min; [M+H]⁺: m/z 967.

2.3. ([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butirato de etilo



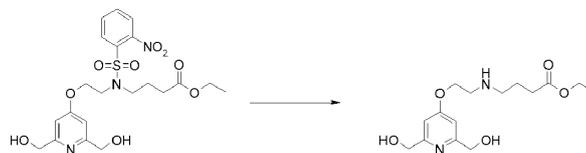
Se añaden 110 µl de diisopropiletilamina y 34 µl de MSC a una solución de 51 mg de 4-([2-(2,6-bis-hidroxi-metil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo en 5 ml de DCM, preenfriada hasta -25°C. La mezcla se agita durante 1 hora a -15°C y a continuación se lava con 5 ml de agua. La fase acuosa se extrae con 5 ml de DCM. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre MgSO₄ y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 69 mg de 4-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butirato de etilo. LC/MS (B): t_R= 2,87 min; [M+H]⁺: m/z 615.

2.4. 4-([2-(2,6-bis-hidroxi-metil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo



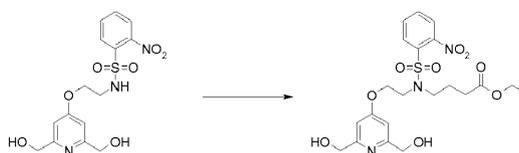
Se añaden 207 mg de 1-yodo-2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etano y 192 µl de diisopropiletilamina a una solución de 180 mg de 4-([2-(2,6-bis-hidroxi-metil-piridin-4-iloxi)-etil]-amino)-butanoato de etilo en 18 ml de acetonitrilo. La mezcla se calienta durante 3 días a 80°C y a continuación se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (columna de 15 g Merck SuperVarioFlash, Si60 15-40 µm), usando una mezcla de DCM/MeOH/agua (40/5/0.5). Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 51 mg de 4-([2-(2,6-bis-hidroxi-metil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo. LC/MS (B): t_R= 0,70 min; [M+H]⁺: m/z 459.

2.5. 4-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-butanoato de etilo



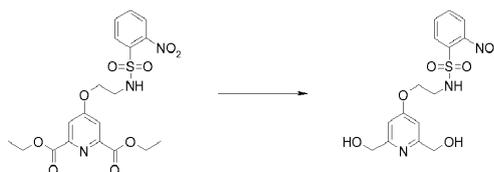
Se añaden 766 mg de carbonato de cesio y 160 μ l de tiofenol a una solución de 390 mg de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-(2-nitro-benceno-sulfonil)-amino]-butanoato de etilo en 10 ml de acetonitrilo, bajo argón. La mezcla se agita durante 17 horas a temperatura ambiente y a continuación se filtra a través de un sinterizado de porosidad 4. La torta se lava con EtOAc y el filtrado se concentra bajo presión reducida y se purifica en un cartucho Mega BE-SCX, 2GM 12ML (Varian), usando un lavado con MeOH y separación del producto esperado con una solución 2 N de amoníaco en MeOH. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 183 mg de 4-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-butanoato de etilo. LC/MS (B): t_R = 0,68 min; $[M+H]^+$: m/z 313.

2.6. 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-(2-nitro-benceno-sulfonil)-amino]-butanoato de etilo



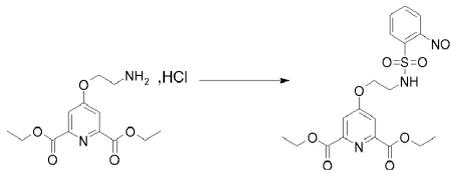
Se añaden 344 μ l de 3-bromo-butirato de etilo y 1,38 g de K_2CO_3 a una solución de 767 mg de N-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-2-nitro-bencenosulfonamida en 15 ml de DMF, bajo argón. La mezcla se agita durante aproximadamente 20 horas a 40°C y a continuación se filtra a través de un sinterizado de porosidad 4. La torta se lava con EtOAc y el filtrado se concentra bajo presión reducida. El producto en bruto se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (columna de 90 g Merck SuperVarioPrep, Si60 15-40 μ m), usando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 395 mg de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-butanoato de etilo. LC/MS (B): t_R = 2,72 min; $[M+H]^+$: m/z 498; $[M+HCO_2H-H]^+$: m/z 542.

2.7. N-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-2-nitro-bencenosulfonamida



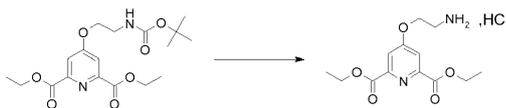
Se añaden sucesivamente 315 mg de borohidruro sódico y 941 mg de $CaCl_2$ a una solución de 1,3 g de 4-[2-(2-nitro-bencenosulfonilamino)-etoxi]-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo en 200 ml de etanol. La mezcla se agita durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se añaden a la misma 50 ml de agua. El etanol se retira bajo presión reducida y se añaden 50 ml de agua al residuo obtenido; la fase acuosa se extrae 3x con EtOAc. Las fases orgánicas se combinan, se lavan con solución saturada de NaCl, se secan sobre $MgSO_4$ y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 1,06 g de N-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-2-nitro-bencenosulfonamida. LC/MS (A): t_R = 0,57 min; $[M+H]^+$: m/z 384.

2.8. 4-[2-(2-Nitro-bencenosulfonilamino)-etoxi]-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo



Se añaden 798 mg de cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo a una solución de 957 mg de monohidrocloreto de 4-(2-amino-etoxi)-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo en 30 ml de DCM y 734 μ l de piridina, preenfriados hasta aproximadamente 5°C. La mezcla se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. A continuación, se añaden a la misma 244 μ l de piridina y 665 mg de cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo adicionales y la agitación se continúa durante 15 horas. La mezcla se lava con 25 ml de agua y la fase acuosa se extrae 2x con 25 ml de DCM. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre $MgSO_4$, se concentran bajo presión reducida y se purifican mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (columna de 150 g Merck EasyVarioPrep, Si60 15-40 μ m), usando un gradiente de 0 a 10% de EtOAc en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 960 mg de 4-[2-(2-nitro-bencenosulfonilamino)-etoxi]-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): 1,35 (t, $J=7,2$ Hz, 6H); 3,41 (t, $J=5,2$ Hz, 2 H); 4,22 (t, $J=5,2$ Hz, 2 H); 4,39 (c, $J=7,2$ Hz, 4 H); 7,50 (s, 2 H); 7,80 (m, 2 H); 7,92 (m, 1 H); 8,04 (m, 2 H); 8,40 (m, 1 H). LC/MS (C): $t_R=3,50$ min; $[M+H]^+$: m/z 468.

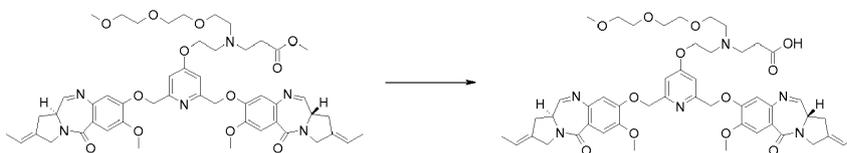
2.9. Monohidrocloreto de 4-(2-amino-etoxi)-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo



Se añaden 20,7 ml de ácido clorhídrico 4 N a una solución de 2,64 g de 4-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-etoxi)-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo (descrito en la página 101 del documento **WO 07085930**) en 27 ml de dioxano. La mezcla se agita durante aproximadamente 20 horas a temperatura ambiente y a continuación se concentra bajo presión reducida. El residuo de evaporación se recoge en aproximadamente 70 ml de dioxano y a continuación se concentra de nuevo bajo presión reducida. La operación se repite 3x. La mezcla se recoge en 50 ml de *tert*-butil-metil-éter y la suspensión obtenida se filtra a través de un sinterizado de porosidad 4. La torta se lava con *tert*-butil-metil-éter y se seca en un desecador bajo presión reducida a temperatura ambiente. Se obtienen 2 g de monohidrocloreto de 4-(2-amino-etoxi)-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo. 1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$): 1,35 (t, $J=7,2$ Hz, 6H); 3,26 (m, 2H); 4,39 (c, $J=7,2$ Hz, 4 H); 4,45 (m, 2 H); 7,77 (s, 2 H); 8,16 (m ancho, 3 H). LC/MS (C): $t_R=2,39$ min; $[M+H]^+$: m/z 283.

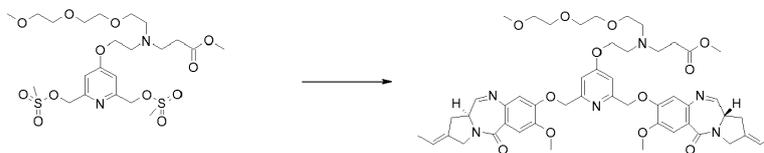
Ejemplo 3

3.1. Ácido 3-([2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino]-propanoico



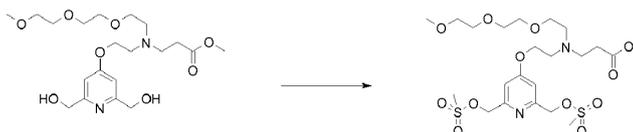
Se añaden 35 μ l de una solución acuosa de hidróxido de litio 1 M a una solución de 30 mg de 3-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino]-propanoato de metilo en 576 μ l de THF y 67 μ l de agua. La mezcla se agita durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se recoge en 4 ml de DCM y se acidifica hasta un pH cercano a 3 al añadir 1 ml de tampón de fosfato potásico (pH=3). La mezcla se extrae 4x con DCM y las fases orgánicas se combinan, se secan sobre $MgSO_4$, se concentran bajo presión reducida y se purifican mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF10-4g), usando un gradiente de 10 a 20% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 13 mg de ácido 3-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino]-propanoico. LC/MS (B): $t_R=3,07$ min; $[M+H]^+$: m/z 925

3.2. 3-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo



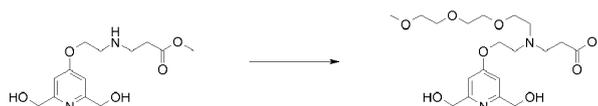
5 Se añaden 128 mg de K_2CO_3 , 51 mg de KI y 110 mg de 3-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo a una solución de 84 mg de (S)-2-et-(E)-iliden-8-hidroxi-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2.1-c][1.4]benzodiazepin-5-ona en 5 ml de DMF. La mezcla se calienta durante 18 horas a $30^\circ C$ y a continuación se enfría hasta temperatura ambiente, se filtra a través de una membrana de $0,45 \mu m$, se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF15-24g), usando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 33 mg de 3-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo. LC/MS (B): $t_R = 3,21$ min; $[M+H]^+$: m/z 939

3.3. 3-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo



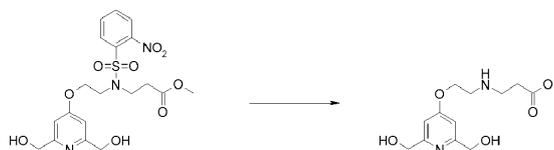
15 Se añaden 183 μl de diisopropiletilamina y 57 μl de cloruro de metanosulfonilo a una solución de 80 mg de 3-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo en 8 ml de DCM, preenfriada hasta $-25^\circ C$. La mezcla se agita durante 1 hora a $-15^\circ C$ y a continuación se lava con 5 ml de agua. La fase acuosa se extrae con 5 ml de DCM. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre $MgSO_4$ y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 110 mg de 3-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo. LC/MS (B): $t_R = 2,67$ min; $[M+H]^+$: m/z 587

3.4. 3-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo



25 Se añaden 356 mg de 1-yodo-2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil]-etano y 330 μl de diisopropiletilamina a una solución de 284 mg de 3-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo en 28 ml de acetonitrilo. La mezcla se calienta a $80^\circ C$ durante 3 días y a continuación se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-40g), usando un gradiente de 5 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 165 mg de 3-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo. LC/MS (B): $t_R = 0,44$ min; $[M+H]^+$: m/z 431.

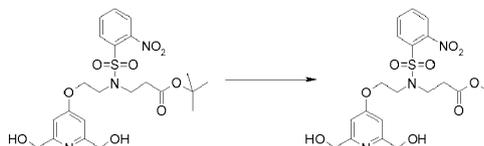
3.5. 3-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo



35 Bajo argón, se añaden 325 mg de carbonato de cesio y 67 μl de tiofenol a una solución de 155 mg de 3-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-amino}-propanoato de metilo en 6 ml de acetonitrilo. La mezcla se agita durante 4 horas a temperatura ambiente y a continuación se filtra a través de un sinterizado de porosidad 4. La torta se lava con EtOAc y el filtrado se concentra bajo presión reducida y se purifica en un cartucho

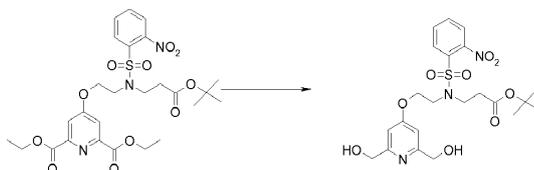
Mega BE-SCX, 2GM 12ML (Varian), usando lavado con MeOH y separación del producto esperado con una solución 2 N de amoníaco en MeOH. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 82 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-propanoato de metilo. LC/MS (B): $t_R= 0,33$ min; $[M+H]^+$: m/z 285.

5 3.6. 3-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propanoato de metilo



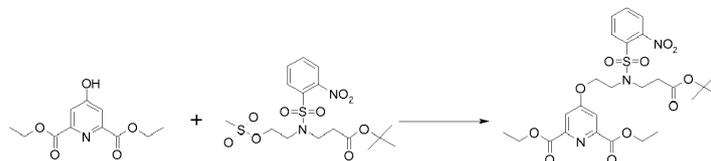
Se añaden 2 ml de TFA a una solución de 670 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-propanoato de *tert*-butilo en 20 ml de DCM. La mezcla se agita durante 6 horas a temperatura ambiente y a continuación se concentra bajo presión reducida, se recoge en DCM y se concentra de nuevo bajo presión reducida. Se añaden, a 10 5°C, 7 ml de una solución 2 M de (trimetilsilil)diazometano en hexano al residuo obtenido, disuelto en 10 ml de MeOH. La mezcla se agita durante 1 hora 30 minutos a 5°C y a continuación se añaden 200 μ l de ácido acético. La mezcla se recoge en 30 ml de agua y 30 ml de EtOAc. La fase acuosa se extrae 2x con 30 ml de EtOAc. Las fases orgánicas se combinan, se lavan con solución saturada de NaCl, se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF15-24g), usando un 15 gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 155 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-propanoato de metilo. LC/MS (C): $t_R= 2,56$ min; $[M+H]^+$: m/z 470.

3.7. 3-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propanoato de *tert*-butilo

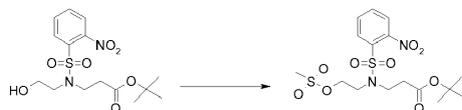


20 Se añaden sucesivamente 152 mg de borohidruro sódico y 447 mg de CaCl₂ a una solución de 0,8 g de 4-{2-[(2-*tert*-butoxicarbonil-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-etoxi}-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo en 80 ml de etanol. La mezcla se agita a temperatura ambiente y a continuación se añaden 20 ml de agua al final de la reacción. El etanol se retira bajo presión reducida, se añaden 100 ml de agua al residuo obtenido y la fase acuosa se extrae 3x con 25 EtOAc. Las fases orgánicas se combinan, se lavan con solución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄ y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 670 mg de 3-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propanoato de *tert*-butilo. LC/MS (C): $t_R= 3$ min; $[M+H]^+$: m/z 512.

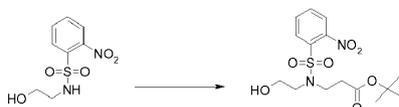
3.8. 4-{2-[(2-*tert*-butoxicarbonil-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-etoxi}-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo



30 Se añaden 16,2 g de K₂CO₃ y 5,6 g de 4-hidroxi-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo a una solución de 10,6 g de 3-[(2-metanosulfoniloxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propanoato de *tert*-butilo en 220 ml de DMF. La mezcla se calienta durante 20 horas a 60°C y a continuación se concentra bajo presión reducida y se recoge en 200 ml de agua y 200 ml de EtOAc. La fase acuosa se extrae 2x con EtOAc. Las fases orgánicas se combinan, se lavan con solución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄, se concentran bajo presión reducida y se purifican mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (columna de 600 g Merck EasyVarioPrep, Si60 15-40 μ m), usando un 35 gradiente de 0 a 20% de EtOAc en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 6,56 g de 4-{2-[(2-*tert*-butoxicarbonil-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-etoxi}-piridino-2,6-dicarboxilato de dietilo. LC/MS (C): $t_R= 4,14$ min; $[M+H]^+$: m/z 596.

3.9. 3-[(2-Metanosulfoniloxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo

Se añaden 8,1 ml de diisopropiletilamina a una solución de 9,2 g de 3-[(2-hidroxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo en 92 ml de DCM. La mezcla se enfría hasta -5°C y se añade gota a gota una solución de 2,34 ml de MSC en 10 ml de DCM. Después de calentar hasta temperatura ambiente, la mezcla se agita durante aproximadamente 2 horas y a continuación se complementa con 100 ml de agua. La fase acuosa se extrae dos veces con DCM y las fases orgánicas se combinan, se secan sobre MgSO_4 , se concentran bajo presión reducida y se purifican mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF40-240g), usando un gradiente de 0 a 5% de acetato de etilo en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 10,62 g de 3-[(2-metanosulfoniloxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo. LC/MS (C): $t_{\text{R}} = 3,77$ min; $[\text{M}+\text{Na}]^{\text{T}}$: m/z 475.

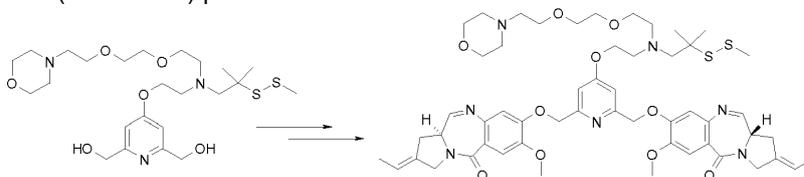
3.10. 3-[(2-Hidroxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo

Bajo argón, se añaden 8,8 ml de 3-bromopropionato de *terc*-butilo y 14,6 g de K_2CO_3 a una solución de 8,7 g de N-(2-hidroxi-etil)-2-nitro-bencenosulfonamida (Skerlj, R.T.; Nan, S.; Zhou, Y.; Bridger, G.J. *Tetrahedron Lett.* **2002** (43) 7569-7571) en 87 ml de DMF. La mezcla se agita durante 15 horas a 40°C y a continuación se añadieron 5 ml adicionales de 3-bromopropionato de *terc*-butilo. La mezcla se calienta a 40°C durante la noche y a continuación se filtra a través de un sinterizado de porosidad 4. La torta se lava con acetato de etilo y a continuación el filtrado se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (columna de 400 g Merck EasyVarioPrep, Si60 15-40 μm), usando un gradiente de 0 a 10% de EtOAc en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 9,54 g de 3-[(2-hidroxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo. LC/MS (C): $t_{\text{R}} = 3,39$ min; $[\text{M}+\text{Na}]^{\text{T}}$: m/z 397.

Ejemplo 4

4.1. 4-[2-((2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-etoxil-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,1a-tetrahidropirrol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina

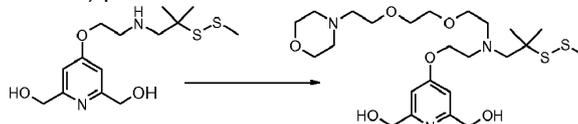
Preparada como para el Ej. 1, partiendo de 4-[2-((2-metil-2-metildisulfanil-propil)-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-etoxil-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:



^1H RMN (500 MHz, DMSO-d_6): 1,22 (s, 6 H); 1,69 (d, $J=7,0$ Hz, 6 H); 2,28 a 2,44 (m, 6 H); 2,36 (m, 3 H); 2,71 (s, 2 H); 2,77 (t, $J=6,7$ Hz, 2 H); 2,88 a 3,08 (m, 6 H); 3,42 a 3,55 (m, 12 H); 3,86 (s, 6 H); 3,88 (m, 2 H); 4,10 (s, 4 H); 4,15 (t, $J=5,7$ Hz, 2 H); 5,17 (d, $J=13,2$ Hz, 2 H); 5,23 (d, $J=13,2$ Hz, 2 H); 5,55 (m, 2 H); 6,93 (s, 2 H); 7,06 (s, 2 H); 7,38 (s, 2 H); 7,76 (d, $J=4,4$ Hz, 2 H). LC/MS (A): $t_{\text{R}} = 0,68$ min; $[\text{M}+\text{H}]^{\text{T}}$: m/z 1042; $[\text{M}+2\text{H}]^{2\text{T}}$: m/z 521,5 (pico base)

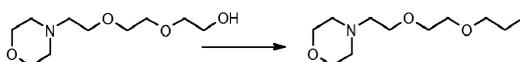
4.2. 4-[2-((2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-etoxil-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

Preparada como para el Ej. 1, partiendo de 4-[2-[2-(2-yodo-etoxi)-etoxi]-etil]-morfolina y 4-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:



5 $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 1,26 (s, 6 H); 2,36 (m, 4 H); 2,39 (s, 3 H); 2,43 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 2,74 (s, 2 H); 2,79 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 3,00 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 3,46 a 3,55 (m, 12 H); 4,12 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 4,45 (d, $J=5,9$ Hz, 4 H); 5,30 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 6,84 (s, 2 H). LC/MS (E): $t_R=0,33$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 534

4.3. 4-{2-[2-(2-Yodo-etoxi)-etoxil-etil]-morfolina

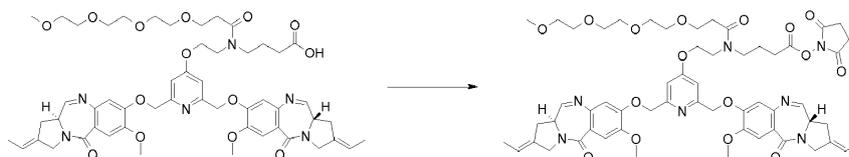


10 A una solución de 1,12 g de 2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etanol y 940 μl de diisopropiletilamina en 6 ml de DCM, enfriada a 0°C , se añade una solución de 440 μl de cloruro de metanosulfonilo en 3 ml de DCM a la misma temperatura. La mezcla se agita durante 1 hora a 0°C y a continuación se lava con 8 ml de agua. La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 y se concentra bajo presión reducida.

15 El residuo obtenido se disuelve en 30 ml de acetona y a continuación se complementa con 1,42 g de yoduro sódico. Después de agitar a reflujo durante 5 horas, la materia insoluble se retira mediante filtración sobre un embudo sinterizado. El filtrado se concentra bajo presión reducida y a continuación se recoge en diclorometano. La materia insoluble se retira de nuevo mediante filtración, y el filtrado se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-40g), usando un gradiente de 0 a 5% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 1,09 g de 4-{2-[2-(2-yodo-etoxi)-etoxi]-etil}-morfolina $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 2,39 (m, 4 H); 2,45 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 3,32 (t, $J=6,4$ Hz, 2 H); 3,47 a 3,60 (m, 10 H); 3,67 (t, $J=6,4$ Hz, 2 H). LC/MS (A): $t_R=0,29$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 330

25 Ejemplo 5

5.1. 4-([2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{3-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etoxil-propionil]-amino]-butanoato de N-hidroxisuccinimidilo



30 Se añaden 67 μl de DIPEA y 33 mg de carbonato de N,N'-disuccinimidilo a 65 mg de ácido 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{3-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoico disueltos en 3,8 ml de THF. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se añaden 8 ml de DCM y la fase orgánica resultante se lava dos veces con agua, se seca sobre MgSO_4 , se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF10-8g), usando un gradiente de 0 a 7,5% de metanol en DCM. Se obtienen así 35 mg de 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{3-[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de N-hidroxisuccinimidilo.

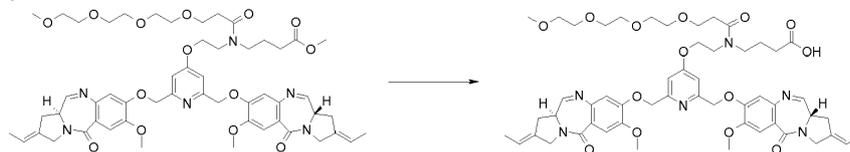
35 LC/MS (F): $t_R=3,54$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 1108; $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$: m/z 1126; $[\text{M}+2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$: m/z 1144

40

5.2. Ácido 4-[[2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etoxi]-propionil)-amino]-butanoico

Preparado como para el Ej. 2, partiendo de 4-[[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de metilo:

5

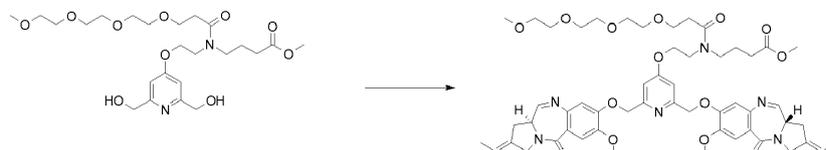


LC/MS (E): $t_R = 1,05$ min; $[M+H]^+$: m/z 1011; $[M+H_2O+H]^+$: m/z 1029; $[M+2H_2O+H]^+$: m/z 1047

5.3. 4-[[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de metilo

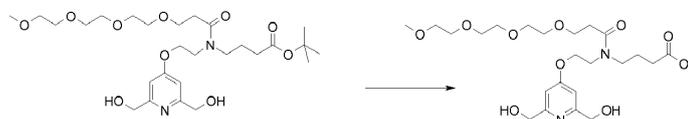
10

Preparado como para el Ej. 2, partiendo de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxil-propionil)-amino]-butanoato de etilo:



15 LC/MS (E): $t_R = 1,14$ min; $[M+H]^+$: m/z 1025; $[M+H_2O+H]^+$: m/z 1043; $[M+2H_2O+H]^+$: m/z 1061

5.4. 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de metilo

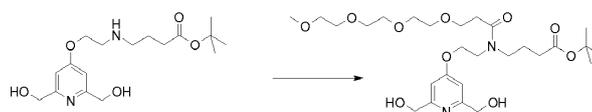


20 Se añaden 1.14 ml de TFA a una solución de 460 mg de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de *terc*-butilo en 7 ml de DCM. La mezcla se agita durante 15 horas a temperatura ambiente y a continuación se concentra bajo presión reducida. Se añaden, a 5°C, 3,1 ml de una solución 2 M de (trimetilsilil)diazometano en hexano al residuo obtenido, disuelto en 3,8 ml de MeOH. La mezcla se agita durante 1 hora a 5°C y a continuación se añaden 100 µl de ácido acético. Después de la concentración bajo presión reducida, el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-40g), usando un gradiente de 2 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 265 mg de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de metilo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): mezcla 50%-50% de conformeros con: 1,67 a 1,86 (m, 2 H); 2,27 (t, J=7,3 Hz, 1 H); 2,36 (t, J=7,3 Hz, 1 H); 2,57 (t, J=6,7 Hz, 1 H); 2,66 (t, J=6,7 Hz, 1 H); 3,23 (s, 3 H); 3,31 a 3,75 (m, 21 H); 4,14 (t, J=5,6 Hz, 1 H); 4,19 (t, J=5,6 Hz, 1 H); 4,45 (m, 4 H); 5,30 (m, 2 H); 6,84 (s, 1 H); 6,86 (s, 1 H). LC/MS (G): $t_R = 0,62$ min; $[M+H]^+$: m/z 517; $[M-H+HCO_2H]^+$: m/z 561

25

30

5.5. 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de *terc*-butilo

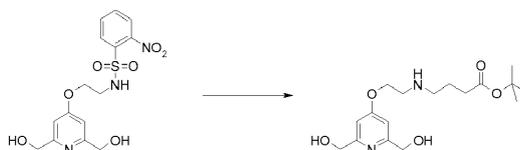


35 Se añade una solución de 658 mg de 3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo (cfr. M.A. Miller, N.B. Malkar, D. Severynse-Stevens, K.G. Yarbrough, M.J. Bednarcik, R.E. Dugdell, M.E. Puskas, R. Krishnan, K.D. James *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 267-274) en 4 ml de DMF a una solución de 560 mg de 3-{2-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-butanoato de *terc*-butilo en 4 ml de DMF. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 15 horas y a continuación se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante

cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF40-80g), usando un gradiente de 0 a 10% de una solución al 10% de amoníaco en MeOH, en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 460 mg de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de *terc*-butilo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): mezcla 50%-50% de confórmeros con: 1,39 (s, 4,5 H); 1,40 (s, 4,5 H); 1,63 a 1,81 (m, 2 H); 2,16 (t, *J*=7,3 Hz, 1 H); 2,25 (t, *J*=7,3 Hz, 1 H); 2,57 (t, *J*=6,7 Hz, 1 H); 2,66 (t, *J*=6,7 Hz, 1 H); 3,23 (s, 3 H); 3,31 a 3,74 (m, 18 H); 4,14 (t, *J*=5,7 Hz, 1 H); 4,19 (t, *J*=5,7 Hz, 1 H); 4,45 (m, 4 H); 5,30 (m, 2 H); 6,84 (s, 1 H); 6,86 (s, 1 H). LC/MS (G): t_R= 0,80 min; [M+H]⁺: m/z 559; [M-H+HCO₂H]⁻: m/z 603.

5.6. 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilaminol]-butanoato de *terc*-butilo

- 10 Preparado como para el Ej. 2, partiendo de 3-bromo-butirato de *terc*-butilo y N-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-2-nitro-bencenosulfonamida:

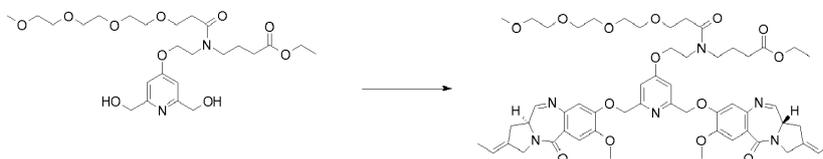


- 15 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): 1,39 (s, 9 H); 1,62 (t, *J*=7,2 Hz, 2 H); 1,84 (m ancho, 1 H); 2,22 (t, *J*=7,2 Hz, 2 H); 2,55 (t, *J*=7,2 Hz, 2 H); 2,86 (t, *J*=5,7 Hz, 2 H); 4,07 (t, *J*=5,7 Hz, 2 H); 4,45 (d, *J*=5,7 Hz, 4 H); 5,29 (t, *J*=5,7 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): t_R= 0,40 min; [M+H]⁺: m/z 341; pico base: m/z 156.

Ejemplo 6

6.1. 4-[[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de etilo

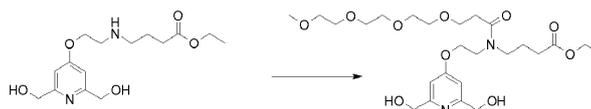
- 20 Preparado como para el Ej. 5, partiendo de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de etilo:



- 25 ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): mezcla 50%-50% de confórmeros con: 1,11 a 1,18 (m, 3 H); 1,54 a 1,82 (m, 8 H); 2,24 (d, *J*=7,3 Hz, 1 H); 2,32 (d, *J*=7,3 Hz, 1 H); 2,53 a 2,68 (m, 4 H); 2,87 a 3,07 (m, 4 H); 3,20 (s, 1,5 H); 3,21 (s, 1,5 H); 3,31 a 4,27 (m, 32 H); 5,16 (d, *J*=13,2 Hz, 2 H); 5,22 (d, *J*=13,2 Hz, 2 H); 5,55 (c, *J*=7,0 Hz, 2 H); 6,94 (s, 2 H); 7,08 (s, 2 H); 7,37 (s, 2 H); 7,76 (d, *J*=4,4 Hz, 2 H). LC/MS (A): t_R= 0,86 min; [M+H]⁺: m/z 1039; pico base: m/z 376.

- 30 6.2. 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de etilo

Preparado como para el Ej. 5, partiendo de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilaminol]-butanoato de etilo:

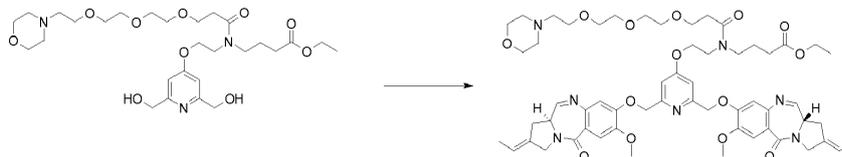


- 35 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) mezcla 50%-50% de confórmeros con: 1,16 (t, *J*=7,1 Hz, 1,5 H); 1,17 (t, *J*=7,1 Hz, 1,5 H); 1,67 a 1,97 (m, 2 H); 2,25 (t, *J*=7,3 Hz, 1 H); 2,34 (t, *J*=7,3 Hz, 1 H); 2,57 (t, *J*=6,8 Hz, 1 H); 2,66 (t, *J*=6,8 Hz, 1 H); 3,23 (s, 3 H); 3,32 a 3,74 (m, 18 H); 4,04 (c, *J*=7,1 Hz, 1 H); 4,05 (c, *J*=7,1 Hz, 1 H); 4,14 (t, *J*=5,7 Hz, 1 H); 4,19 (t, *J*=5,7 Hz, 1 H); 4,45 (m, 4 H); 5,30 (m, 2 H); 6,84 (s, 1 H); 6,86 (s, 1 H). LC/MS (A): t_R= 0,47 min; [M+H]⁺: m/z 531; pico base: m/z 376; [M-H+HCO₂H]⁻: m/z 575
- 40

Ejemplo 7

7.1. 4-[[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxil-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de metilo

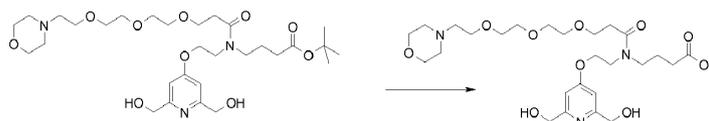
5 Preparado como para el Ej. 5, partiendo de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de metilo:



LC/MS (E): $t_R = 0,88$ min; $[M+H]^+$: m/z 1080; $[M+H_2O+H]^+$: m/z 1098; $[M+2H_2O+H]^+$: m/z 1116

10 7.2. 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxil-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de metilo

Preparado como para el Ej. 5, partiendo de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de *tert*-butilo:

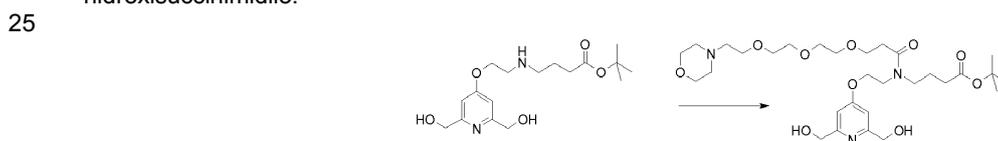


15 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): 1,83 (m, 2 H); 2,33 (m, 2 H); 2,42 (m, 4 H); 2,48 (t, J=5,8 Hz, 2 H); 2,61 (m, 2 H); 3,40 (m, 2 H); 3,49 a 3,55 (m, 10 H); 3,56 (m, 4 H); 3,62 (s, 3 H); 3,69 (t ancho, J=6,6 Hz, 4 H); 4,21 (t, J=5,6 Hz, 2 H); 4,49 (d, J=5,3 Hz, 4 H); 4,90 (t, J=5,3 Hz, 2 H); 6,87 (s, 2 H). LC/MS (G): $t_R = 0,50$ min; $[M+H]^+$: m/z 572; pico base: m/z 198; $[M-H+HCO_2H]^+$: m/z 616

20

7.3. 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxil-etoxil-propionil)-amino]-butanoato de *tert*-butilo

Preparado como para el Ej. 5, partiendo de 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo:



30 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): 1,42 (s, 9 H); 1,78 (m, 2 H); 2,22 (m, 2 H); 2,42 (m, 4 H); 2,48 (t, J=5,8 Hz, 2 H); 2,61 (m, 2 H); 3,39 (m, 2 H); 3,48 a 3,55 (m, 10 H); 3,56 (m, 4 H); 3,69 (t ancho, J=6,6 Hz, 4 H); 4,21 (t, J=5,6 Hz, 2 H); 4,49 (d, J=5,3 Hz, 4 H); 4,90 (t, J=5,3 Hz, 2 H); 6,87 (s, 2 H). LC/MS (G): $t_R = 0,65$ min; $[M+H]^+$: m/z 614; pico base: m/z 240

7.4. 3-{2-[2-(2-Morfolin-4-il-etoxi)-etoxil-etoxi]-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo



35 Se añaden 1,1 g de carbonato de N,N'-disuccinimidilo y 1,5 ml de DIPEA a 830 mg de ácido 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoico disuelto en 50 ml de THF. Después de 24 horas a temperatura ambiente, se añaden 200 ml de DCM y la fase orgánica resultante se concentra hasta la mitad de su volumen bajo presión reducida y a continuación se lava con agua, se seca sobre $MgSO_4$ y se concentra bajo presión reducida. Se obtienen así 1,05 g de 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo. 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): 2,39 (m, 4 H); 2,45 (t, J=5,9 Hz, 2 H); 2,81 (s, 4 H); 2,92 (t, J=6,0 Hz, 2 H); 3,45 a 3,57 (m, 14 H); 3,72 (t, J=6,0 Hz, 2 H). LC/MS (G): t_R (ELSD) = 0,49 min; $[M+H]^+$: m/z 389.

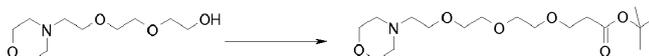
40

7.5. Ácido 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxil-etoxi]-propanoico



Se añaden 4 ml de TFA a una solución de 1 g de 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxil-propanoato de *terc*-butilo en 50 ml de DCM. La mezcla se agita durante 10 horas a temperatura ambiente y a continuación se concentra bajo presión reducida y se purifica en un cartucho Mega BE-SCX, 25GM 150ML (Varian), usando lavado con MeOH y separación del producto esperado con una solución 2 N de amoníaco en MeOH. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtienen 830 mg de ácido 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoico. LC/MS (E): t_R (ELSD) = 0,16 min; [M+H]⁺: m/z 292

7.6. 3-{2-[2-(2-Morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoato de *terc*-butilo



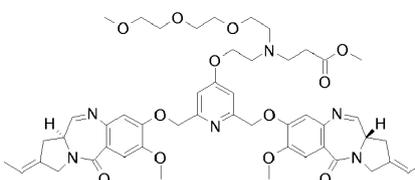
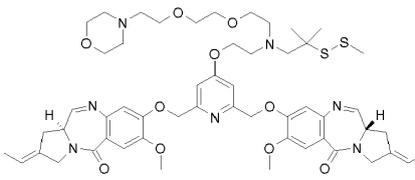
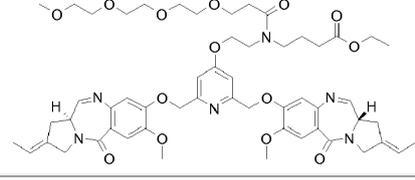
Se añaden 1,04 mg de sodio a una solución de 989 mg de 2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etanol en 2,8 ml de THF anhidro. Después de calentar a 40°C durante 2 horas 15 minutos, se añaden 793 µl de acrilato de *terc*-butilo. Después de calentar durante dos horas más a 40°C, la mezcla de reacción se deja durante 20 horas a temperatura ambiente y a continuación se concentra bajo presión reducida y se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido sobre sílice (columna de 70 g Merck SuperVarioPrep, Si60 15-40 µm), usando un gradiente de 0 a 6% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto deseado se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se obtiene 1 g de 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoato de *terc*-butilo. LC/MS (E): t_R (ELSD) = 0,59 min; [M+H]⁺: m/z 348

Evaluación de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-A1 y HCT116 con los compuestos de fórmula (IA) con RCG1=-S_{Z_a} (Z_a=SMe) o RCG1 = -C(=O)Z_bR_b (Z_bR_b=OMe)

Células MDA-MB-231, MDA-A1 o HCT116 en su fase de crecimiento exponencial se tripsinizan y se resuspenden en su medio de cultivo respectivo (DMEM/F12 Gibco N° 21331, 10% de FCS Gibco N° 10500-056, 2 nM de glutamina Gibco N° 25030 para las células MDA; DMEM Gibco N° 11960, 10% de FCS Gibco N° 10500-056, 2 mM de glutamina Gibco N° 25030 para las células HCT116). La suspensión celular se siembra en placas de cultivo de 96 pocillos Cytostar (GE Healthcare Europe, N° RPNQ0163) en el medio de cultivo completo que contiene suero hasta una densidad de 5000 células/pocillo (MDA-MB-231, MDA-A1, HCT116). Después de la incubación durante 4 horas, diluciones sucesivas de los dímeros de tomamicina se añaden a los pocillos por triplicado para cada concentración. Las células se cultivan durante 3 días a 37°C bajo una atmosfera de 5% de CO₂ en presencia de los agentes citotóxicos. Al cuarto día, se añaden a cada pocillo 10 µl de una solución de ¹⁴C-timidina (0,1 µCi/pocillo, Perkin Elmer N° NEC56825000). La incorporación de ¹⁴C-timidina se mide 96 horas después del comienzo del experimento con un contador de radiactividad Microbeta (Perkin Elmer). Los datos se expresan en la forma de un porcentaje de supervivencia al determinar la relación entre el recuento obtenido con las células tratadas con los agentes citotóxicos y el obtenido con las células de los pocillos de control (tratadas con el medio de cultivo solo).

Tabla II

Inhibición de la proliferación (impulso de ¹⁴ C-timidina a las 96 h)	IC50 [pM]		
	HCT116	MDA-MB231	MDA-A1
<p>Estructura del compuesto de fórmula (IA)</p>	61	128	16270
	18	41	3465

Inhibición de la proliferación (impulso de ^{14}C -timidina a las 96 h)	IC50 [pM]		
Estructura del compuesto de fórmula (IA)	HCT116	MDA-MB231	MDA-A1
	235	384	17849
	48	81	26474
	4984	5665	>50000

Se encuentra que los compuestos de prueba, para los que $\text{RCG1} = -\text{SZ}_a$, con $\text{Z}_a = \text{SMe}$ o $\text{RCG1} = -\text{C}(=\text{O})\text{Z}_b\text{R}_b$, con $\text{Z}_b\text{R}_b = \text{OMe}$, tienen una potente actividad anticancerosa; esto sugiere que compuestos similares caracterizados con otro grupo Z_bR_b son propensos a tener una actividad al menos idéntica.

5 Capítulo 2: Nuevos conjugados de tomamicina

Ejemplo de referencia 8: preparación de un conjugado hu2H11 modificado con SPDB con 4-{2-[[2-[(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-(2-metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina

Se añaden 320 μg de SPDB (descrito en la página 7 del documento **WO 2010/076474**) disueltos en 62 μl de DMA con agitación magnética a 24 mg de hu2H11 (anticuerpo descrito también por hu53 2H11 en la página 15 del documento **WO 2008010101**; este es un anticuerpo que comprende una Vh que tiene una secuencia de aminoácidos SED ID N° 24) en 2,37 ml de un tampón acuoso con una concentración de fosfato potásico de 0,05 M, 0,05 M de NaCl y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de pH = 6.5. Después de 4 horas a temperatura ambiente, el anticuerpo modificado se purifica mediante filtración en gel sobre Sephadex G25 (columna PD-10 GE) preequilibrada en un tampón acuoso con una concentración de 0,05 M de ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperacina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M de NaCl y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de pH = 8. Una parte alícuota del anticuerpo modificado se trata con ditiotretol (DTT) para escindir los grupos ditiopiridina. El anticuerpo modificado junto con el piridinotiol liberado se ensayan mediante espectrofotometría usando los coeficientes de extinción de piridinotiol ($\epsilon_{343 \text{ nm}} = 8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), del grupo ditiopiridina ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y hu2H11 ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 206941 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): se determinó un promedio de 3,2 grupos ditiopiridina por molécula de anticuerpo a una concentración de 7,08 mg/ml.

Se añaden 713 μl de DMA y 1,22 mg de 4-{2-[[2-[(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil]-(2-metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirroló[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina disueltos en 87 μl de dimetilacetamida (DMA) con agitación magnética a 12 mg del anticuerpo modificado anterior en 3,2 ml de un tampón acuoso con una concentración de 0,05 M de ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperacina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M de NaCl y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de pH = 8. Después de 12 horas a 30°C, la mezcla se filtra sobre Millex^R-SV 0.45 μm (PVDF Durapore Millipore) y se purifica en una columna de calidad preparativa SuperdexTM 200 (columna HiloadTM 26/60 GE) preequilibrada en un tampón de fosfato salino que contiene 20% de N-metilpirrolidona (NMP). Las fracciones de interés se combinan y se concentran sobre Amicon Ultra-15 (Ultrasel 50k Millipore) y a continuación se filtran en Sephadex G-25 (columnas PD10, GE) preequilibradas en un tampón acuoso a pH=6,5, con una concentración de 10 mM de histidina que contiene 10% de sacarosa y 5% de NMP.

El conjugado obtenido (3,5 ml) se ensaya mediante espectrofotometría usando los coeficientes de extinción $e_{320\text{ nm}} = 7843\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $e_{280\text{ nm}} = 4436\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para 4-{2-[[2-{2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridina y $e_{280\text{ nm}} = 206941\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para hu2H11: se determinó un promedio de 2,9 dímeros de tomamicina (4-{2-[[2-{2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metil-2-mercaptopropil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridina) por molécula de anticuerpo a una concentración de 1,74 mg/ml.

Ejemplo de referencia 9: Preparación de un conjugado hu2H11R35R74 modificado con SNPP con 4-{2-[[2-{2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etil}-(2-metil-2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina

Se añaden 1,3 mg de SNPP (descrito en la página 36 del documento **WO 2004/016801**) disueltos en 186 µl de DMA con agitación magnética a 100 mg de hu2H11 R35R74 (Ref en la página 20 del documento **WO 2011039721**) en 8,2 ml de un tampón acuoso con una concentración de 0,05 M de fosfato potásico, 0,05 M de NaCl y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de pH = 6,5. Después de 4 horas a temperatura ambiente, la solución de anticuerpo modificado se fracciona en cuatro y se purifica mediante filtración sobre cuatro columnas Sephadex G25 (columna PD-10 GE) preequilibradas en un tampón acuoso con una concentración de 0,05 M de ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperacino-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M de NaCl y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de pH = 8. Después de mezclar y homogeneizar los cuatro filtrados así obtenidos, el anticuerpo modificado se ensaya mediante espectrofotometría usando los coeficientes de extinción de nitropiridinotiol ($e_{280\text{ nm}} = 3344\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $e_{325\text{ nm}} = 10964\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) y hu2H11 R35R74 ($e_{280\text{ nm}} = 219528\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): se determinaba un promedio de 4,47 grupos ditionitropiridina por molécula de anticuerpo a una concentración de concentración de 6,27 mg/ml.

Se añaden 4,38 ml de DMA y 17,73 mg de 4-{2-[[2-{2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metil-2-mercaptopropil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridina disueltos en 1,43 ml de Dimetilacetamida (DMA) con agitación magnética a 87 mg del anticuerpo modificado anterior en 23,24 ml de un tampón acuoso con una concentración de 0,05 M de ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperacino-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M de NaCl y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de pH = 8. Después de 17 horas a 30°C, la mezcla se filtra sobre Steriflip[®] 0.45 µM (PVDF Durapore Millipore) y se purifica mediante 3 inyecciones en una columna de calidad preparativa Superdex[™] 200 (columna Hiload[™] 26/60 GE) preequilibrada en un tampón de fosfato salino que contiene 20% de N-metilpirrolidona (NMP). Las fracciones de interés se combinan y se concentran en Amicon Ultra-15 (Ultracel 50k Millipore) y a continuación se filtran sobre Sephadex G-25 (desalado con HiPrep 26/10, columna GE) preequilibrada en un tampón acuoso de pH = 6,5 con una concentración de 10 mM de histidina, que contiene 10% de sacarosa y 5% de NMP. El conjugado obtenido (28 ml) se ensaya mediante espectrofotometría usando el coeficiente de extinción $e_{280\text{ nm}} = 219528\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para hu2H11 R35R74: se determinaba un promedio de 3,13 dímeros de tomamicina (4-{2-[[2-{2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridina) por molécula de anticuerpo a una concentración de 1,99 mg/ml.

Ejemplo de referencia 10: preparación de un conjugado hu2H11R35R74 modificado con SPDB con 4-{2-[[2-{2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,1a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]piridina

Preparado como para el Ej. 8, partiendo de hu2H11 R35R74: se determinaba un promedio de 2,92 dímeros de tomamicina (4-{2-[[2-{2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridina) por molécula de anticuerpo.

Ejemplo 11: preparación de un conjugado hu2H11R35R74 con 4-[[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxil-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de N-hidroxisuccinimidilo

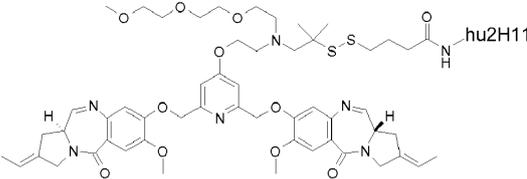
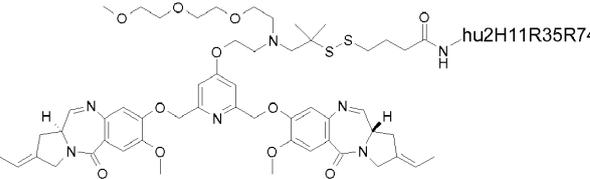
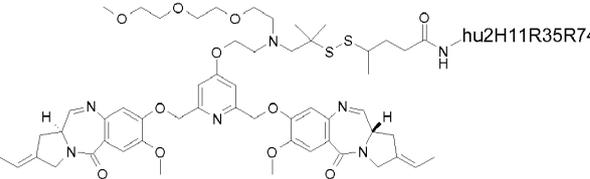
Se añaden sucesivamente 6 µl de una solución acuosa 1 M de HEPES, seguido por 267 µl de un tampón acuoso con una concentración de 0,05 M de ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperacino-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M de NaCl y 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de pH = 8, 100 µl de DMA y a continuación 83 µg de 4-[[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolol[2,1c][1.4]benzodiazepin-5-on-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi-propionil)-amino]-butanoato de N-hidroxisuccinimidilo disueltos en 5 µl de DMA a una solución de 1,59 mg de hu2H11 R35R74 en 150 µl de un tampón acuoso con una concentración de 0,043 M de fosfato potásico de pH=6,6. Después de 4 horas a 30°C, la mezcla se filtra sobre Sephadex G-25 (columnas NAP-5 GE) preequilibradas en un tampón acuoso de pH = 6,5 con una concentración de 10 mM de histidina, que contiene 10% de sacarosa y 5% de NMP.

El conjugado obtenido (1 ml) se ensaya mediante espectrofotometría usando los coeficientes de extinción de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de etilo ($\epsilon_{322\text{ nm}} = 7971\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 5219\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): se determinó un promedio de 4,18 dímeros de tomamicina por molécula de anticuerpo a una concentración de 1,14 mg/ml.

- 5 Evaluación de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231 con el conjugado citotóxico hu2H11 (o hu2H11R35R74, respectivamente)

10 Células MDA-MB-231 en su fase de crecimiento exponencial se tripsinizan y se resuspenden en su medio de cultivo (DMEM/F12 Gibco N° 21331, 10% de FCS Gibco N° 10500-056, 2 nM de glutamina Gibco N° 25030). La suspensión celular se siembra en placas de 96 pocillos Cytostar (GE Healthcare Europe, N° RPNQ0163) en medio de cultivo
 15 entero que contiene suero hasta una densidad de 5000 células/pocillo. Después de la incubación durante 4 horas, se añaden a los pocillos diluciones sucesivas de los inmunconjugados de anticuerpo-agente citotóxico en concentraciones decrecientes de 10^{-7} a 10^{-12} M (por triplicado para cada concentración). Las células se cultivan a 37°C bajo una atmósfera que contienen 5% de CO_2 en presencia de los inmunconjugados de anticuerpo-agente
 20 citotóxico durante 3 días. Al cuarto día, se añaden a cada pocillo 10 μl de una solución de ^{14}C -timidina (0,1 μCi /pocillo, Perkin Elmer N° NEC56825000). La incorporación de ^{14}C -timidina se mide 96 horas después del comienzo del experimento con un contador de radiactividad Microbeta (Perkin Elmer). Los datos se expresan en forma de un porcentaje de supervivencia al determinar la relación entre recuentos obtenidos con las células tratadas con el inmunconjugado y las obtenidas con las células de los pocillos de control (tratadas con el medio de cultivo solo). En ciertos experimentos indicados con un asterisco (*), se añadió el anticuerpo puro hu2H11 (o hu2H11 R35R74, respectivamente) a los pocillos a una concentración de 1 μM al principio del experimento y la inhibición de la proliferación se midió como se describe previamente.

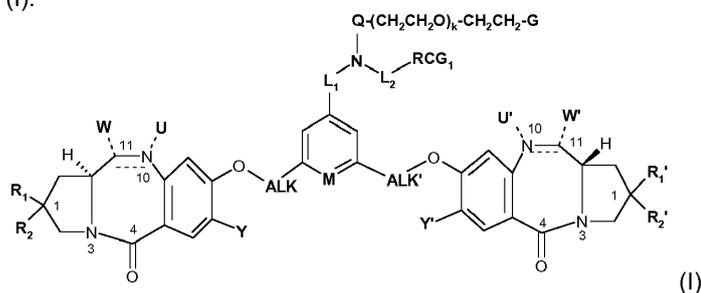
Tabla III

Inhibición de la proliferación (impulso de ^{14}C -timidina a las 96 h)	IC50 [pM]		
Estructura	Media IC50	Media IC50 (+Ab puro*)	relación de IC50
	58	760	13
	32	502	16
	72	3550	49

25

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



en el que:

- 5
- --- representa un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que
 - si --- representa un enlace sencillo, entonces:
 - ⊗ **U** y/o **U'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H;
 - ⊗ **W** y/o **W'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí: OH, -OR, -OCOR, -COOR, -OCOOR, -OCONRR', un carbamato cíclico tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -NRCONRR', -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -SH, -SR, -SOR, -SOOR, -SO₃⁻, -NRSOOR', -NRR', una amina cíclica tal que N10 y C11 se incluyan en un anillo, -NROR', -NRCOR', -N₃, -CN, Hal, un grupo trialkilfosfonio o triarilfosfonio;
 - si --- representa un doble enlace, entonces:
 - ⊗ **U** y **U'** están ausentes;
- 15
- ⊗ **W** y/o **W'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H;
 - **R₁**, **R₂**, **R₁'**, **R₂'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí: H, Hal o un grupo alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR con q = 0, 1 o 2;

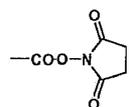
o alternativamente

- 20
- R₁** y **R₂** y/o **R₁'** y **R₂'** forman juntos, respectivamente, un doble enlace =CH₂ o =CH-CH₃;
 - **Y** e **Y'**, que pueden ser idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, H o -OR;
 - **M** representa N;
 - **ALK** y **ALK'** son idénticos e indican un grupo CH₂;
- 25
- **R** y **R'** representan, independientemente entre sí, H o un grupo alquilo (C₁-C₆) o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos de: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;
 - **L₁** representa:
 - el grupo -D-ALK(C₁-C₆)- ligado al anillo de piridilo a través de D, en el que D representa -O-;
 - **L₂** representa:
 - un grupo -ALK(C₁-C₆)-;

- **Q** representa un enlace sencillo o el grupo C(=O);
- **k** representa un número entero que varía de 1 a 5;
- **G** representa un grupo -OMe o un grupo morfolino;
- **RCG1** representa el grupo -SZ_a o -C(=O)-Z_bR_b;

5

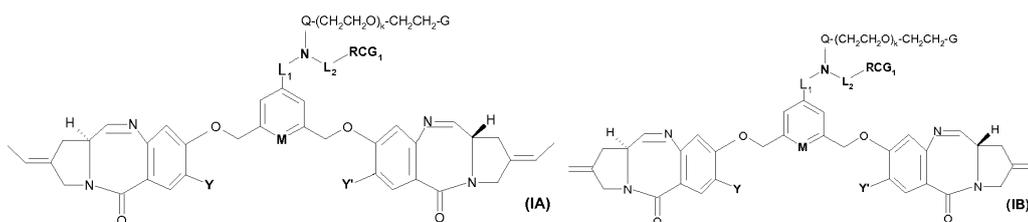
- **Z_a** representa SR_a;
- **R_a** representa H o un grupo alquilo (C₁-C₆);



- COZ_bR_b representa -COOH, -COO-alquilo(C₁-C₆), o

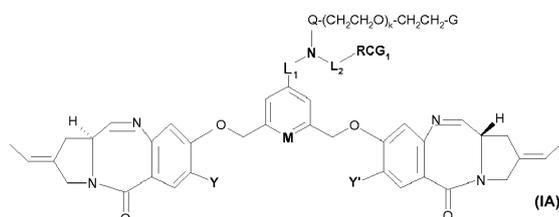
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que U=U' y/o W=W' y/o R₁=R₁' y/o R₂=R₂' y/o Y=Y'.

10 3. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (IA) o (IB):



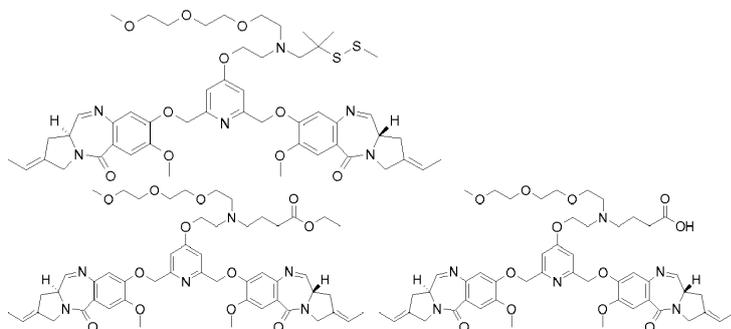
15

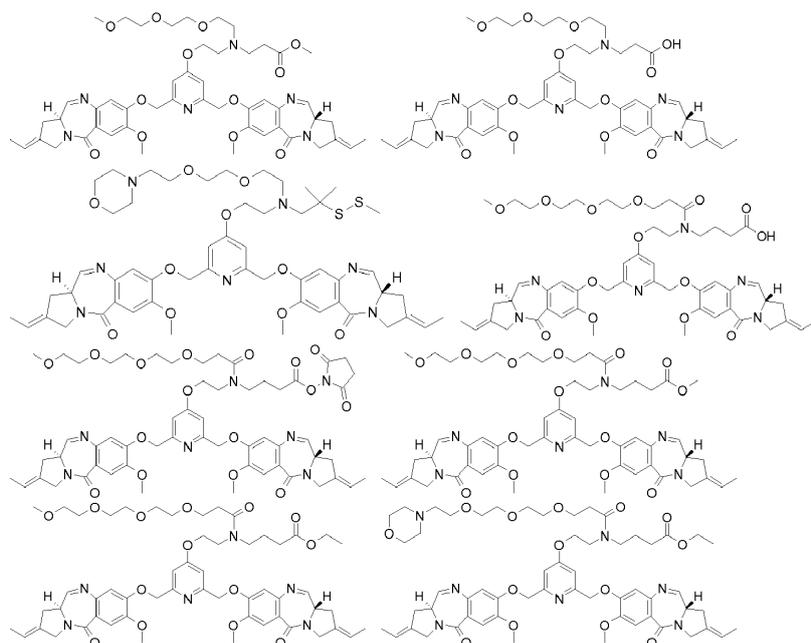
4. Compuesto según la reivindicación 3, de fórmula (IA):



5. Compuesto según la reivindicación 1 a 4, en el que Y e Y' representan un grupo alcoxi (C₁-C₄).

20 6. Compuesto según la reivindicación 1, elegido de uno de los siguientes:





5

7. Procedimiento para preparar un conjugado, que consiste en:

(i) poner en contacto y dejar reaccionar:

- una solución acuosa opcionalmente tamponada del agente de unión, opcionalmente modificado por medio de un agente modificador,

10 y

- una solución de un compuesto de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 6;

siendo el grupo químico RCG1 del compuesto de fórmula (I) reactivo hacia los grupos químicos RCG2 presentes en el agente de unión, especialmente hacia los grupos amino presentes en anticuerpos, habiendo sido introducidos dichos grupos químicos RCG2, cuando sea apropiado, por el agente modificador,

15

a fin de ligar el compuesto de fórmula (I) al agente de unión con la formación de un enlace covalente

(ii) y a continuación opcionalmente separar el conjugado formado en la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) y/o del agente de unión sin reaccionar y/o de cualesquiera agregados que se puedan haber formado.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que:

20 ■ en presencia de un derivado de fórmula (I) que comprende un grupo químico reactivo RCG1 del tipo $-SZ_a$, el agente de unión comprende:

- grupos químicos tiol en el caso en el que RCG1 representa $-SZ_a$

25 ■ en presencia de un derivado de fórmula (I) que comprende un grupo químico reactivo RCG1 del tipo $-C(=O)-Z_bR_b$, el derivado de fórmula (I) se hace reaccionar con las funciones amino del agente de unión, especialmente los grupos ϵ -amino soportados por las cadenas laterales de los residuos de lisina (Lys) de un anticuerpo.

9. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso como un agente anticanceroso.

Figura 1

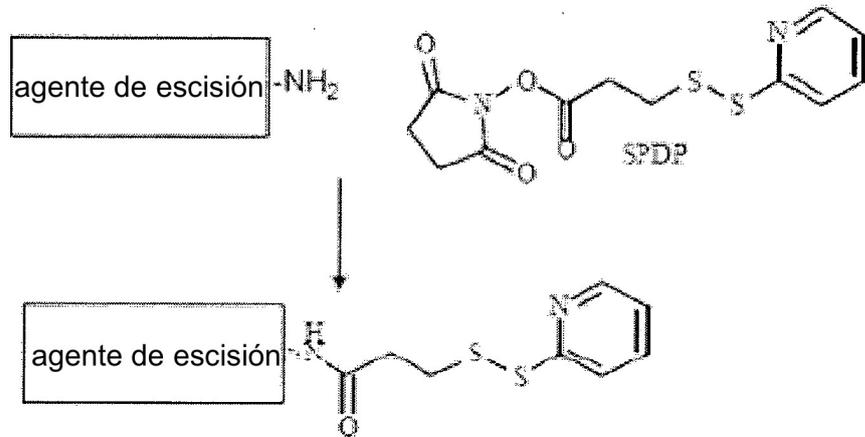


Figura 2

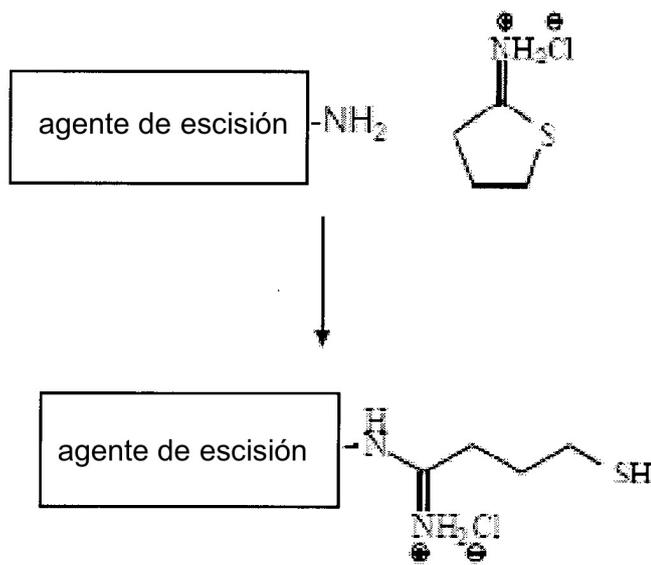


Figura 3: espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del Ej. 8 después de la desglucosilación

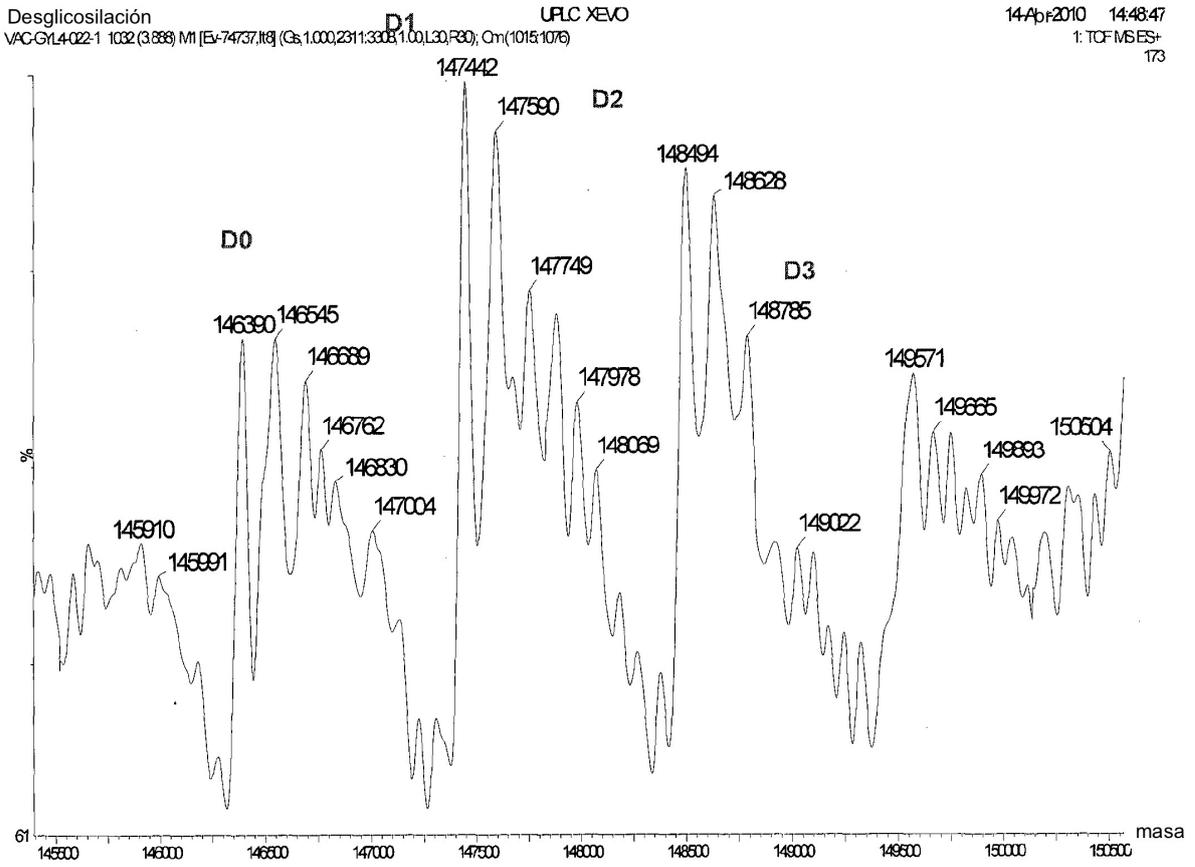


Figura 4: espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del Ej. 9 no desglucosilado

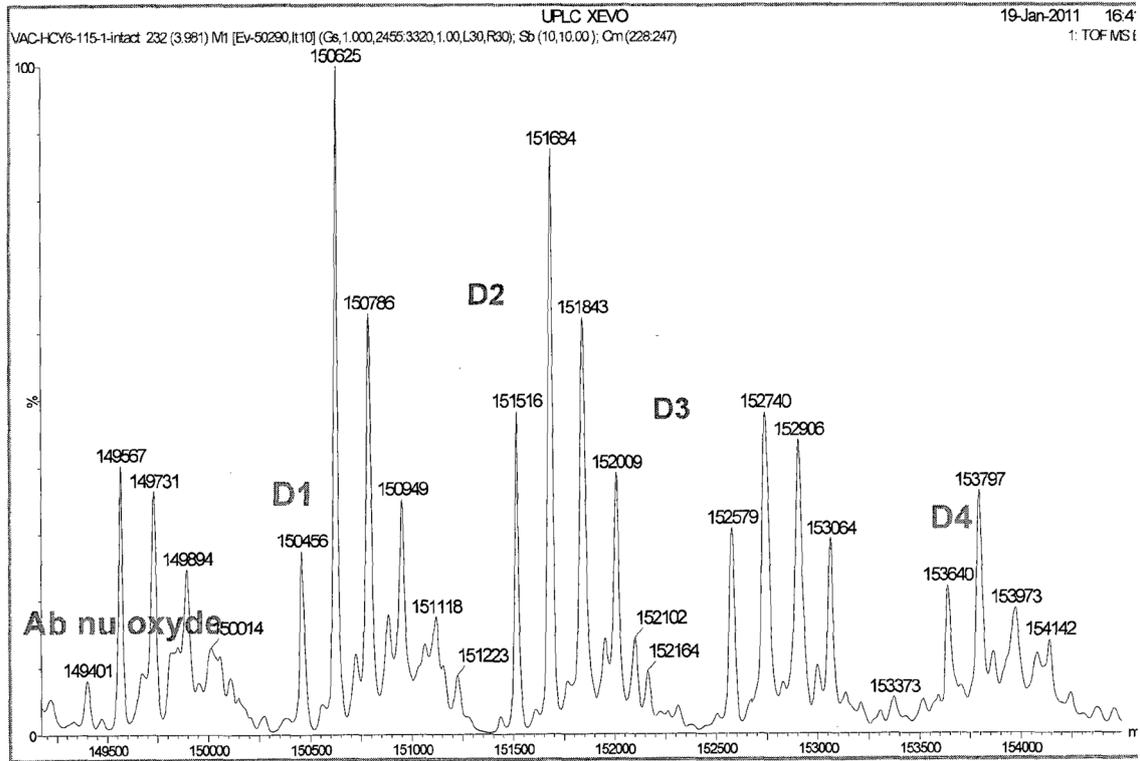


Figura 5: espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del Ej. 10 no desglicosilado

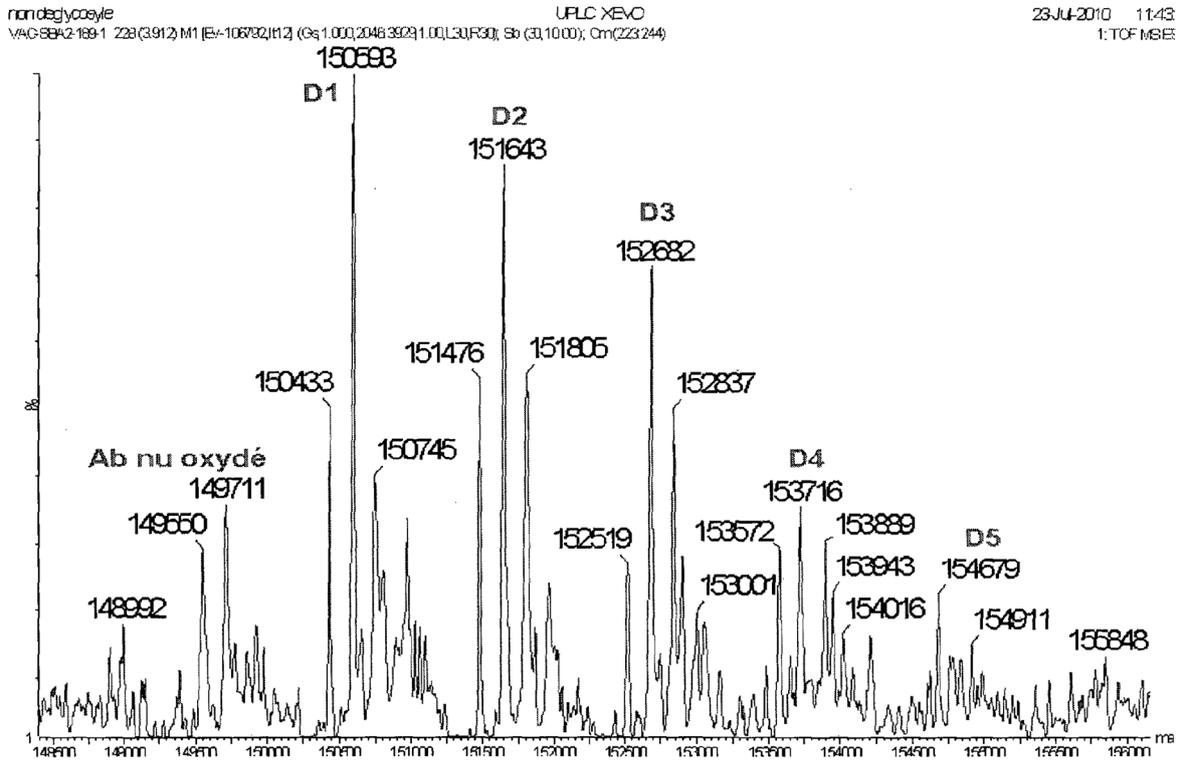


Figura 6: espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del Ej. 11 no desglucosilado

