

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 449**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2013 PCT/EP2013/071343**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14057115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2013 E 13788691 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2906252**

54 Título: **Conjugados de anticuerpos anti-her2-Pirrolobenzodiazepinas**

30 Prioridad:

12.10.2012 US 201261712924 P

12.10.2012 US 201261712928 P

14.03.2013 US 201361784270 P

14.03.2013 US 201361784233 P

14.03.2013 US 201361784249 P

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

03.11.2017

73 Titular/es:

ADC THERAPEUTICS SA (50.0%)

Route de la Corniche 3B

1066 Epalinges, CH y

MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

VAN BERKEL, PATRICIUS HENDRIKUS

CORNELIS y

HOWARD, PHILIP WILSON

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 640 449 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

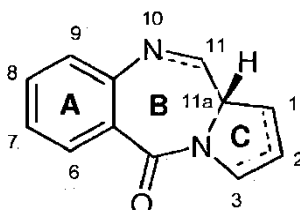
Conjugados de anticuerpos anti-her2-Pirrolobenzodiazepinas

- 5 La presente invención se refiere a pirrolobenzodiazepinas (PBD), en particular a pirrolobenzodiazepinas que tienen un grupo protector C2 o N10 lábil, en forma de un conector a un anticuerpo.

Antecedentes a la invención

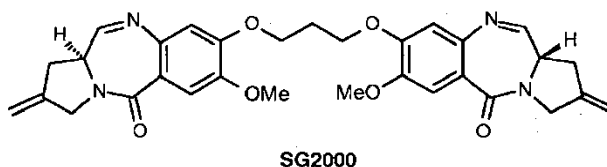
10 *Pirrolobenzodiazepinas*

Algunas pirrolobenzodiazepinas (PBD) tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferida es PuGPu. El primer antibiótico antitumoral de PBD, la antramizina, se descubrió en 1965 (Leimgruber y col., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber y col., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se ha informado de varias PBD que se producen naturalmente, y se han desarrollado más de 10 rutas de síntesis para varios análogos (Thurston y col., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994); Antonow, D. y Thurston, D.E., Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864). Miembros de la familia incluyen abeimicina (Hochlowski y col., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), chicamicina (Konishi y col., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (patente japonesa 58-180 487; Thurston y col., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose y col., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto y col., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi y col., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa y col., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu y col., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley y Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara y col., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh y col., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber y col., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima y col., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). Las PBD son de la estructura general:



Se diferencian en el número, tipo y posición de sustituyentes, en tanto sus anillos A aromáticos como anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay tanto una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) como un éter metílico de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11 que es el centro electrófilo responsable de alquilar ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición C11 quiral que les proporciona un giro hacia la derecha cuando se miran desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional apropiada para isohelicidad con el surco menor del ADN de forma B, conduciendo a un encaje ajustado en el sitio de unión (Kohn, en Antibiotics III. Springer-Verlag, Nueva York, pág. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor les permite interferir con el procesamiento de ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales.

Un compuesto de pirrolobenzodiazepina particularmente ventajoso se describe por Gregson y col. (Chem. Commun. 1999, 797-798) como el compuesto **1**, y por Gregson y col. (J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174) como el compuesto **4a**. Este compuesto, también conocido como SG2000, se muestra a continuación:



45 El documento WO 2007/085930 describe la preparación de compuestos de PBD diméricos que tienen grupos conectores para la conexión a un anticuerpo, tal como un anticuerpo. El conector está presente en el puente que une las unidades de PBD monoméricas del dímero.

Los presentes inventores han descrito compuestos de PBD diméricos que tienen grupos conectores para la conexión a un anticuerpo, tal como un anticuerpo, en el documento WO 2011/130613 y el documento WO 2011/130616. El conector en estos compuestos está unido al núcleo de PBD a través de la posición C2 y, generalmente se escinde por acción de una enzima en el grupo conector. En el documento WO 2011/130598, el conector en estos compuestos está unido a una de las posiciones N10 disponibles, y se escinden generalmente por la acción de una enzima sobre el grupo conector.

55

Conjugados de anticuerpo-fármaco

Se ha establecido la terapia con anticuerpos para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, trastornos inmunológicos y angiogénicos (Carter, P. (2006) Nature Reviews Immunology 6:343-357). El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer, se dirige a la administración de los restos de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en su interior, mientras que la administración sistémica de estos agentes de fármaco no conjugados puede producir niveles inaceptables de toxicidad a células normales (Xie y col. (2006) Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3):281-291; Kovtun y col. (2006) Cancer Res. 66(6):3214-3121; Law y col. (2006) Cancer Res. 66(4):2328-2337; Wu y col. (2005) Nature Biotech. 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) Current Opin. in Pharmacol. 5:543-549; Hamann P. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Trail y col. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614).

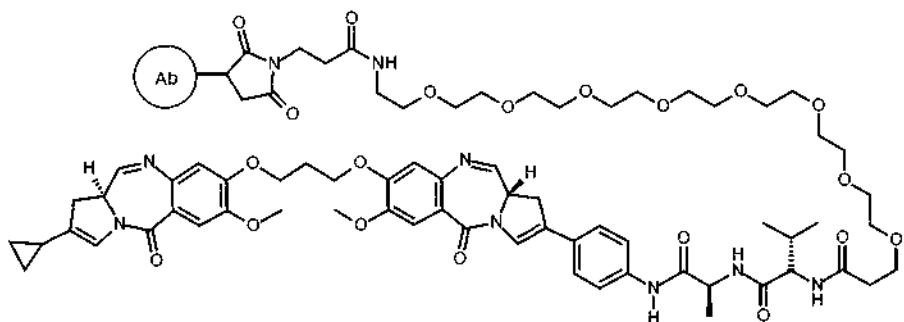
Así se busca máxima eficacia con la mínima toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y refinar ADC se han basado en la selectividad de anticuerpos monoclonales (mAb), además del mecanismo de acción del fármaco, enlace del fármaco, relación de fármaco/anticuerpo (carga) y propiedades de liberación de fármaco (Junutula y col., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan y col. (2009) Blood 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; WO2009/052249; McDonagh (2006) Protein Eng. Design & Sel. 19(7): 299-307; Doronina y col. (2006) Bioconj. Chem. 17:114-124; Erickson y col. (2006) Cancer Res. 66(8):1-8; Sanderson y col. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852; Jeffrey y col. (2005) J. Med. Chem. 48:1344-1358; Hamblett y col. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070). Los restos de fármaco pueden conferir sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN, inhibición de proteasoma y/o topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteína.

Los presentes inventores han desarrollado conjugados de anticuerpo dímeros de PBD particulares.

Divulgación de la invención

Un primer aspecto de la presente invención comprende un conjugado de fórmula

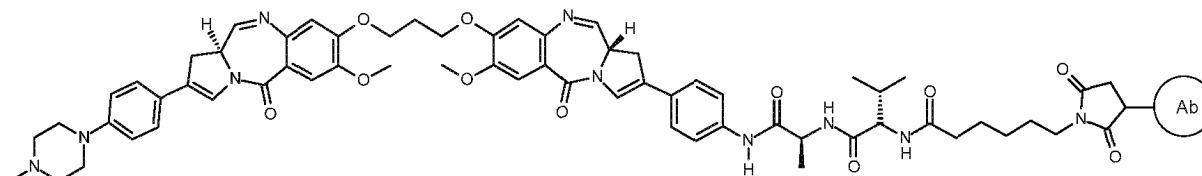
ConjA



ConjA

;

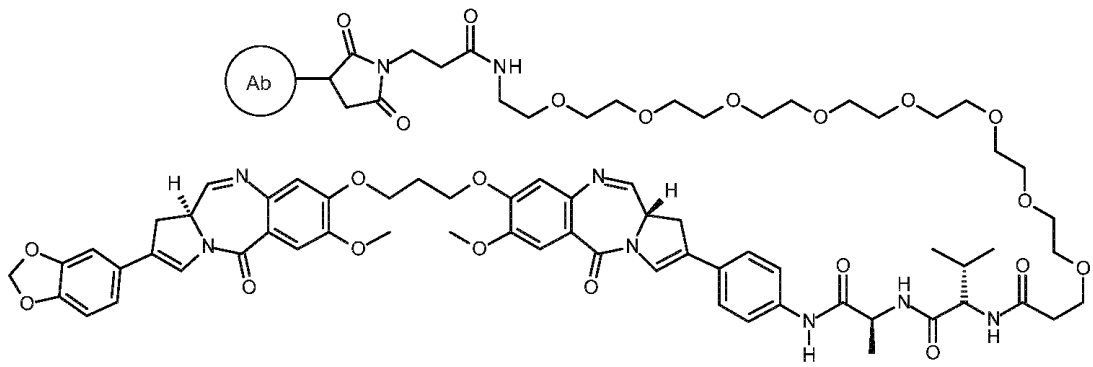
ConjB



ConjB

;

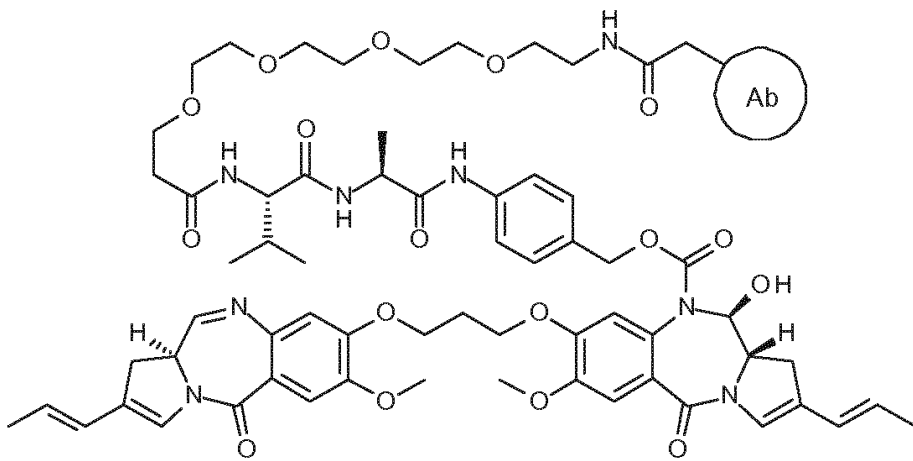
ConjC:



ConjC

;

ConjD

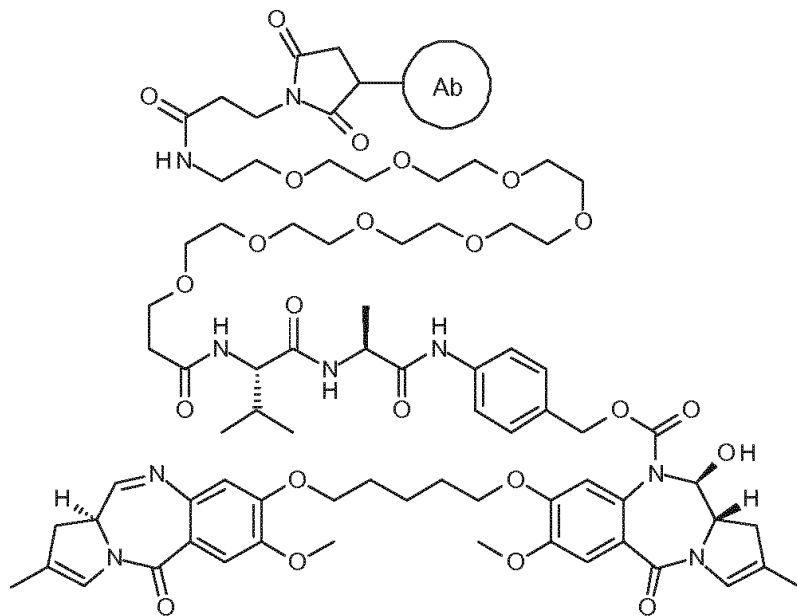


ConjD

;

5

ConjE:



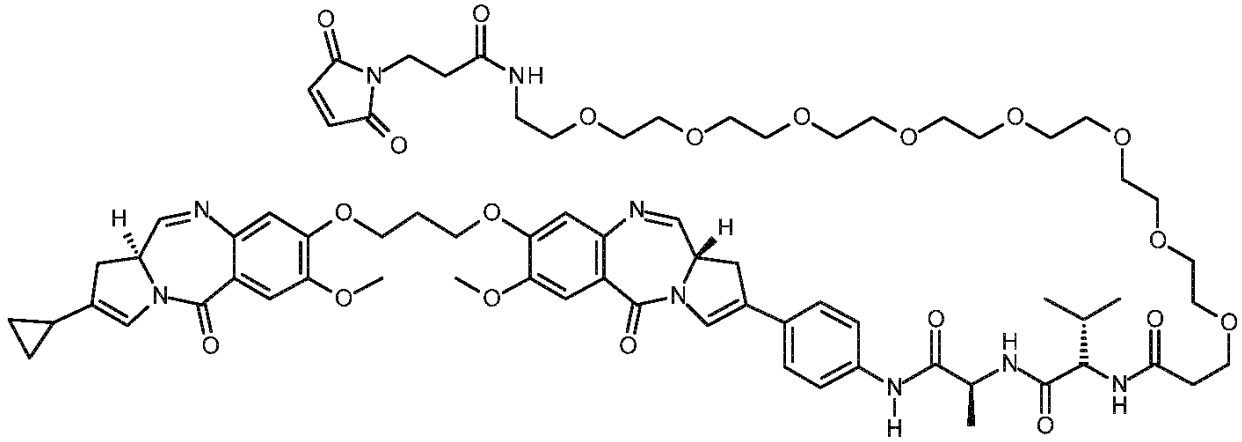
ConjE

.

10

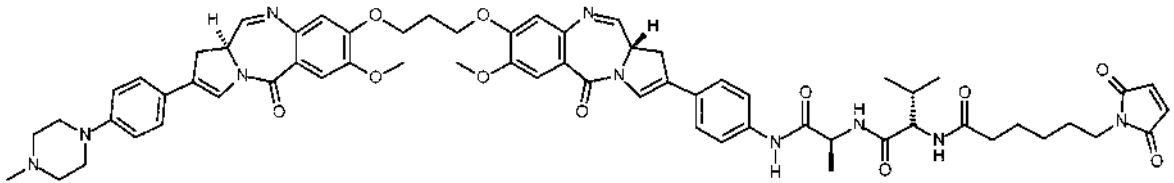
en la que Ab es un anticuerpo que se une a HER2, comprendiendo el anticuerpo un dominio VH que tiene la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO. 1; y en la que la carga de fármaco (p) de los fármacos (D) al anticuerpo (Ab) es un número entero de 1 a aproximadamente 8.

- 5 Se proporciona un método para preparar un conjugado seleccionado del grupo que consiste en ConjA, ConjB, ConjC, ConjD y ConjE, que comprende la conjugación de un compuesto que se selecciona respectivamente de A:



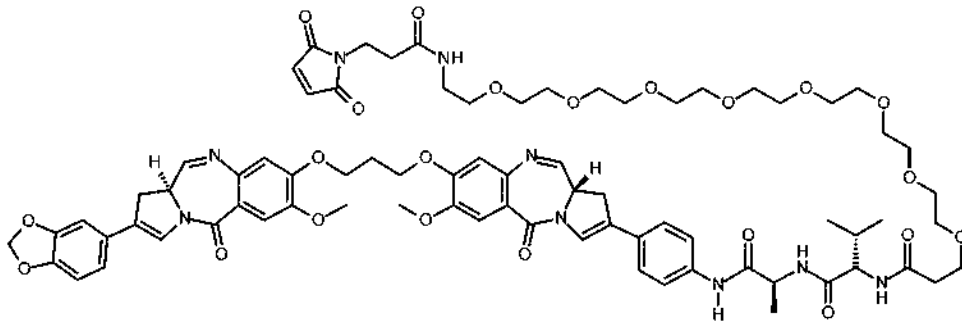
A

- 10 B:



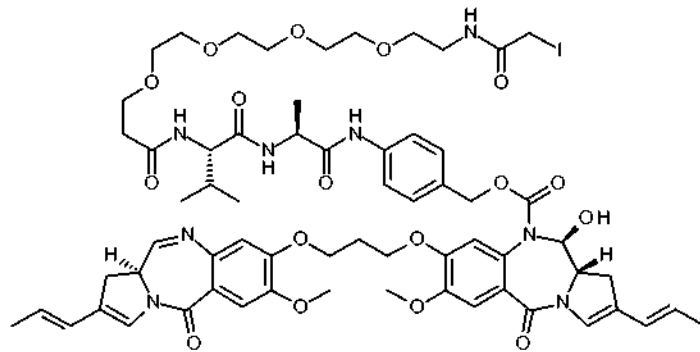
B

- 15 C:



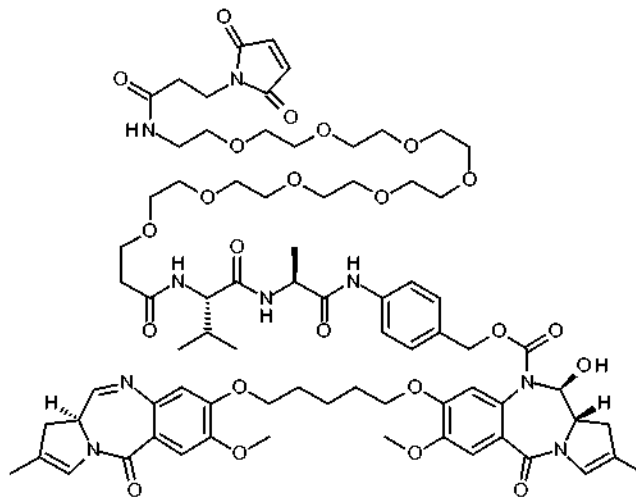
C

- D:



D

y E:



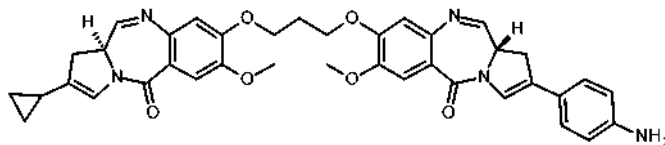
E

5

con un anticuerpo tal como se define a continuación.

El documento WO 2011/130615 divulga el compuesto 26:

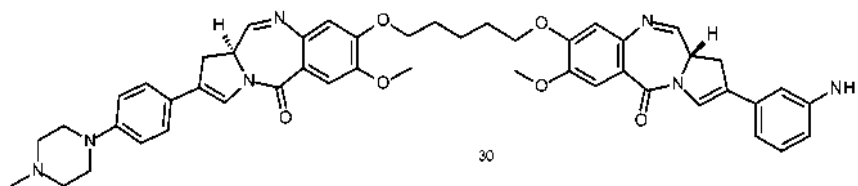
10



26

15 que es el compuesto parental de A. El compuesto A comprende este PBD con un conector para la unión a un agente de unión celular. El agente de unión celular proporciona un número de restos de etilenglicol para proporcionar solubilidad que es útil en la síntesis de conjugados.

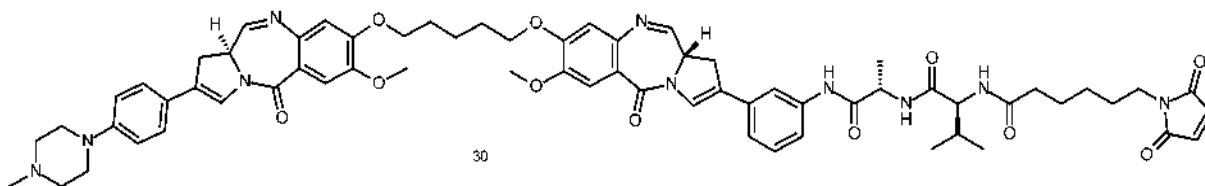
Los documentos WO 2010/043380 y WO 2011/130613 divulgan el compuesto 30:



30

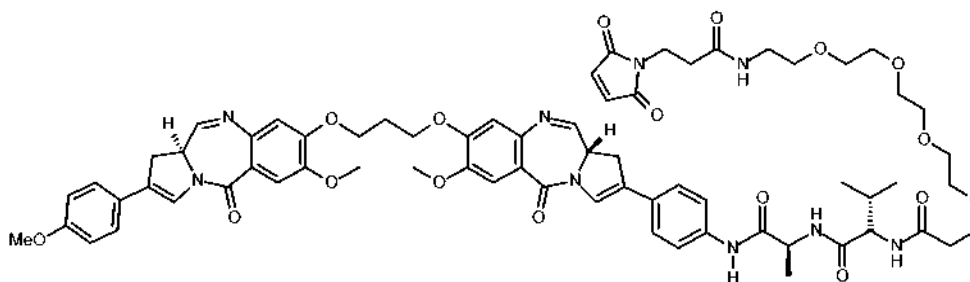
20

El documento WO 2011/130613 también divulga el compuesto 51:



El compuesto B difiere del compuesto 30 porque solo tiene una unión (CH₂)₃ entre los restos PBD, en lugar de una unión (CH₂)₅, lo que reduce la lipofilidad del dímero de PBD liberado. El grupo de unión está unido al grupo C2-fenilo en la posición para en lugar de meta.

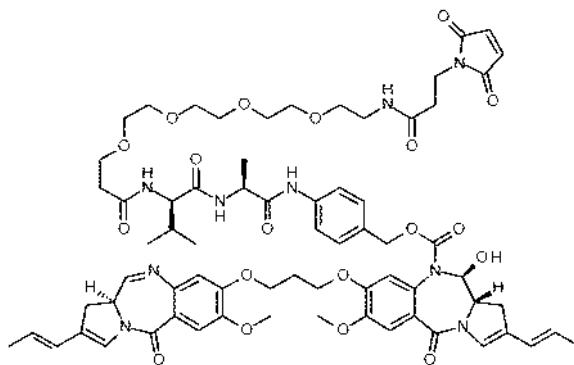
El documento WO 2011/130613 divulga el compuesto 93:



El compuesto C difiere de esto en dos aspectos. El agente de unión celular proporciona un número incrementado de restos de etilenglicol para proporcionar solubilidad que es útil en la síntesis de conjugados, y el sustituyente fenilo proporciona dos átomos de oxígeno en lugar de uno, lo cual también ayuda a la solubilidad. La estructura del compuesto C también puede significar que se une más fuertemente en el surco menor.

Los compuestos A, B y C tienen dos centros sp² en cada anillo en C₂, lo que puede permitir una unión más fuerte en el surco menor del ADN, que para compuestos con solo un centro sp² en cada anillo en C.

El documento WO 2011/130598 divulga el compuesto 80:



El compuesto D difiere de esto al comprender un grupo yodoacetamida para enlazar con el agente de unión celular. Este grupo puede ofrecer ventajas sobre el compuesto 80 con respecto a su estabilidad cuando está unido a un agente de unión celular (véase más adelante). El grupo maleimida en el compuesto 80 puede experimentar una reacción de retro-Michael, que se convierte en no conjugado del agente de unión celular, y por lo tanto vulnerable al secuestro por otras moléculas biológicas que contienen tiol, tales como albúmina y glutatión. Tal no conjugación no se puede producir con el compuesto A. Además, el grupo yodoacetamida puede evitar otras reacciones secundarias no deseadas.

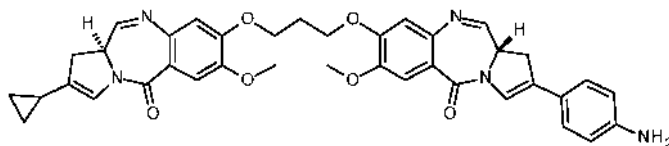
El compuesto E se diferencia de los dímeros de PBD previamente desvelados con un conector de fármaco que tiene un doble enlace en endo C2-3 por tener un sustituyente C2 menos lipófilo más pequeño, por ejemplo 4F-fenilo, propileno. Como tales, es menos probable que los conjugados del compuesto B (véase más adelante) se agreguen una vez sintetizados. Tal agregación de conjugados puede medirse por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tanto el compuesto D como el E tienen dos centros sp^2 en cada anillo C, que pueden permitir unión más fuerte en el surco menor del ADN, que para compuestos con solo un centro sp^2 en cada anillo C.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención es adecuada para su uso en proporcionar un compuesto de PBD a un sitio preferido en un sujeto. El conjugado permite la liberación de un compuesto de PBD activo que no retiene ninguna parte del conector. No hay ninguna punta presente que pudiera afectar la reactividad del compuesto de PBD. Así, ConjA liberaría el compuesto RelA:

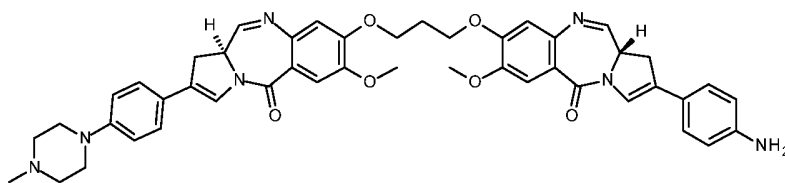
10



RelA

ConjB liberaría el compuesto RelB

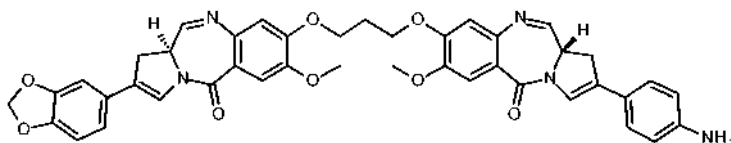
15



RelB

ConjC liberaría el compuesto RelC:

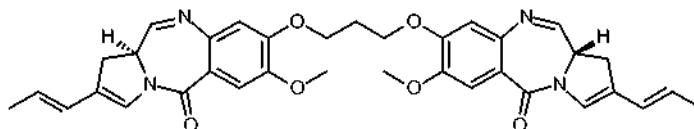
20



RelC

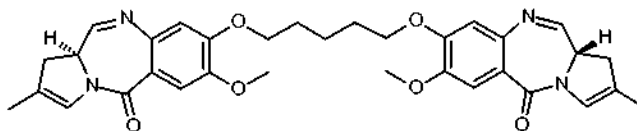
ConjD liberaría el compuesto RelD:

25



RelD

y ConjE liberaría el compuesto RelE



RelE

30 El enlace especificado entre el dímero de PBD y el anticuerpo, en la presente invención es preferentemente estable extracelularmente. Antes del transporte o administración en una célula, el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) es preferentemente estable y sigue intacto, es decir, el anticuerpo sigue ligado al resto de fármaco. Los conectores son estables fuera de la célula diana y pueden escindirse a alguna tasa eficaz dentro de la célula. Un conector eficaz: (i) mantendrá las propiedades de unión específica del anticuerpo; (ii) permitirá la administración intracelular del conjugado o resto de fármaco; (iii) seguirá siendo estable e intacto, es decir, no se escindirá, hasta que el conjugado se haya administrado o transportado a su sitio elegido como diana; y (iv) mantendrá un efecto citotóxico destructor de células o un efecto citostático del resto de fármaco de PBD. La estabilidad del ADC puede medirse por técnicas analíticas convencionales tales como espectroscopía de masas, HPLC y la técnica de separación/análisis EM/CL.

La administración de los compuestos de fórmulas RelA, RelB, RelC, RelD o RelE se logra en el sitio de activación deseado de los conjugados de fórmulas ConjA, ConjB, ConjC, ConjD o ConjE por la acción de una enzima, tal como catepsina, en el grupo de enlace, y en particular en el resto de dipéptido de valina-alanina.

5 Anticuerpo

En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo que se une a HER2, comprendiendo el anticuerpo un dominio VH que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 1.

10 El anticuerpo puede comprender además un dominio VL. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además un dominio VL que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio VH emparejado con un dominio VL, teniendo los dominios VH y VL las secuencias de SEQ ID NO. 1 emparejada con la SEQ ID NO. 2.

15 El dominio o dominios VH y VL pueden emparejarse para formar un sitio de unión a antígeno de anticuerpo que se une a HER2.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo intacto que comprende un dominio VH emparejado con un dominio VL, teniendo los dominios VH y VL las secuencias de SEQ ID NO. 1 emparejada con la SEQ ID NO. 2. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 3 emparejada con una cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 4. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo intacto que comprende dos cadenas pesadas que tienen la secuencia de SEQ ID NO. 3, cada una emparejada con una cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 4.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo compite con el anticuerpo secretado por el hibridoma de número de acceso en la ATCC CRL-10463 para la unión a HER2. En una realización, el anticuerpo se une a HER2 con una constante de asociación (K_a) no inferior a 2, 5 o 10 veces menor que el anticuerpo secretado por el hibridoma.

30 En un aspecto, el anticuerpo es el anticuerpo secretado por un hibridoma. En una realización, el hibridoma es el n.º de acceso en ATCC CRL-10463.

35 En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo como se describe en el presente documento que ha sido modificado (o modificado adicionalmente) como se describe a continuación. En algunas realizaciones, el anticuerpo es una versión humanizada, desimmunizada o reacondicionado de un anticuerpo divulgado en el presente documento.

Terminología

40 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada, por ejemplo, la capacidad para unirse a HER2 (Miller y col. (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que puede reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5ª ed., Garland Publishing, New York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopes, reconocidos por CDR sobre múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo diferente tiene una estructura diferente. Así, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de una diana de interés o parte del mismo, incluyendo tales dianas, pero no se limitan a, célula cancerosa o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase o alotipo (por ejemplo, G1m1 humano, G1m2, G1m3, no G1m1 [es decir, cualquier alotipo distinto de G1m1], G1m17, G2m23, G3m21, G3m28, G3m11, G3m5, G3m13, G3m14, G3m10, G3m15, G3m16, G3m6, G3m24, G3m26, G3m27, A2m1, A2m2, Km1, Km2 y Km3) de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie, que incluye origen humano, murino o de conejo.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, "se une a HER2" se usa para significar que el anticuerpo se une a HER2 con una afinidad más alta que un compañero inespecífico, tal como seroalbúmina bovina (BSA, n.º de acceso de Genbank CAA76847, versión CAA76847.1 GI: 3336842, fecha de actualización de registro: 7 de enero de 2011, 02:30 PM). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a HER2 con una constante de asociación (K_a) de al menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4 , 10^5 o 10^6 veces más que la constante de asociación del anticuerpo para BSA, cuando se mide en condiciones fisiológicas. Los anticuerpos de la invención pueden unirse a HER2 con una alta afinidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones el anticuerpo puede unirse a

HER2 con un KD igual o inferior a aproximadamente 10^{-6} M, tal como 1×10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} o 10^{-14} .

- 5 Como se usa en el presente documento, HER2 se refiere al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2. En una realización, el polipéptido HER2 corresponde al n.º de acceso en Genbank AAA75493, versión n.º AAA75493.1 GI: 306840, fecha de actualización del registro: 23 de junio de 2010 08:47 AM. En una realización, el ácido nucleico que codifica el polipéptido HER2 corresponde al n.º de acceso en Genbank M11730, versión n.º M11730.1 GI:183986, fecha de actualización del registro: 23 de junio de 2010, 08:47 AM
- 10 Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas,
- 15 anticuerpos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El adjetivo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) Nature 256:495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase el documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson y col. (1991) Nature, 352:624-628; Marks y col. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597, o de ratones transgénicos que llevan un sistema de inmunoglobulina completamente humana (Lonberg (2008) Curr. Opin. Opin. Opin 20(4):450-459).

35 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo o simio superior) y secuencias de la región constante humanas.

45 Un “anticuerpo intacto” en el presente documento es uno que comprende un dominio VL y VH, además de un dominio constante de la cadena ligera (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de la misma. El anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones efectoras”, que se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o región Fc variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación por disminución de receptores de la superficie celular tales como receptor de linfocitos B y BCR.

50 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse anticuerpos intactos a diferentes “clases”. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en “subclases” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

Modificación de anticuerpos

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden modificarse. Por ejemplo, para hacerlos menos inmunogénicos a un sujeto humano. Esto se puede conseguir usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas por el experto en la técnica. Algunas de estas técnicas se describen con más detalle a continuación.

Humanización

5 Las técnicas para reducir la inmunogenicidad *in vivo* de un anticuerpo no humano o fragmento de anticuerpo incluyen las denominadas “humanización”.

10 Un “anticuerpo humanizado” se refiere a un polipéptido que comprende al menos una porción de una región variable modificada de un anticuerpo humano en el que una porción de la región variable, preferentemente una porción sustancialmente inferior al dominio variable humano intacto, se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana y en la que la región variable modificada está unida a al menos otra parte de otra proteína, preferentemente la región constante de un anticuerpo humano. La expresión “anticuerpos humanizados” incluye anticuerpos humanos en los que uno o más restos de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (“CDR”) y/o uno o más restos de aminoácidos de la región estructural (“FW” o “FR”) están sustituidos por restos de aminoácidos de sitios análogos en roedores u otros anticuerpos no humanos. La expresión
15 “anticuerpo humanizado” también incluye una variante de la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende una FR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana.

20 Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. O, visto de otra forma, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo humano que también contiene secuencias seleccionadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) en lugar de las secuencias humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones de aminoácidos conservativas o restos no naturales de las mismas especies o de especies diferentes que no alteran
25 significativamente su unión y/o actividad biológica. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas.

30 Hay varias técnicas de humanización, que incluyen 'injerto de CD', 'selección guiada', 'desinmunización', 'acondicionamiento superficial' (también conocida como 'inactivación'), 'anticuerpos compuestos', 'optimización de contenidos de la cadena humana' y barajado de regiones estructurales.

Injerto de CDR

35 En esta técnica, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo del receptor están sustituidos por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata, camello, bovino, cabra o conejo que tiene las propiedades deseadas (de hecho, las CDR no humanas están 'injertadas' sobre la región estructural humana). En algunos casos, los restos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por restos no humanos correspondientes (esto puede ocurrir cuando, por ejemplo, un resto de FR
40 particular tiene efecto significativo sobre la unión al antígeno).

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que ni se encuentran en el anticuerpo del receptor ni en las CDR importadas o secuencias de la región estructural. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente y maximizar el rendimiento del anticuerpo. Así, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá
45 todos de al menos uno, y en un aspecto dos, dominios variables, en los que todos o todos los bucles hipervariables se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), o aquella de una inmunoglobulina humana.

Selección guiada

50 El método consiste en combinar el dominio V_H o V_L de un anticuerpo no humano dado específico para un epítipo particular con una biblioteca de V_H o V_L humana y los dominios V humanos específicos se seleccionan contra el antígeno de interés. Este V_H humano seleccionado se combina entonces con una biblioteca de V_L para generar una combinación de $V_H \times V_L$ completamente humana. El método se describe en Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

Anticuerpos compuestos

60 En este método, dos o más segmentos de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano se combinan dentro de la molécula de anticuerpo final. Se construyen combinando múltiples segmentos de la secuencia de V_H y V_L humana en combinaciones que limitan o evitan los epítopes de linfocitos T humanos en las regiones V de anticuerpos compuestos finales. Si se requiere, los epítopes de linfocitos T se limitan o evitan intercambiando
65 segmentos de las regiones V que contribuyen a o que codifican un epítipo de linfocitos T con segmentos alternativos que evitan epítopes de linfocitos T. Este método se describe en el documento US 2008/0206239 A1.

Desinmunización

5 Este método implica la eliminación de epítopes de linfocitos T humanos (u otra segunda especie) de las regiones V del anticuerpo terapéutico (u otra molécula). La secuencia de las regiones V de anticuerpos terapéuticos se analiza para la presencia de motivos de unión al MHC de clase II por, por ejemplo, comparación con bases de datos de motivos de unión al MHC (tales como la base de datos de "motivos" alojada en www.wehi.edu.au). Alternativamente, los motivos de unión al MHC de clase II pueden identificarse usando métodos de plegamiento computacional tales como aquellos ideados por Altuvia y col. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); en estos métodos, péptidos de solapamiento consecutivos de las secuencias de las regiones V están probándose para sus energías de unión a proteínas del MHC de clase II. Estos datos pueden entonces combinarse con información sobre otras características de secuencias que se refieren a péptidos satisfactoriamente presentados, tales como anfipaticidad, motivos de Rothbard y sitios de escisión para catepsina B y otras enzimas de procesamiento.

15 Una vez se han identificado posibles epítopes de linfocitos T de segundas especies (por ejemplo, humana), se eliminan por la alteración de uno o más aminoácidos. Los aminoácidos modificados están normalmente dentro del propio epítope del linfocito T, pero también pueden estar adyacentes al epítope en términos de la estructura primaria o secundaria de la proteína (y, por tanto, pueden no estar adyacentes en la estructura primaria). Lo más normalmente, la alteración es a modo de sustitución pero, en algunas circunstancias, será más apropiada la adición o delección de aminoácidos.

25 Todas las alteraciones pueden llevarse a cabo por tecnología de ADN recombinante, de manera que la molécula final pueda prepararse por expresión de un huésped recombinante usando métodos bien establecidos tales como mutagénesis dirigida al sitio. Sin embargo, también es posible el uso de química de proteínas o cualquier otro medio de alteración molecular.

Acondicionamiento superficial

Este método implica:

- 30 (a) determinar la estructura conformacional de la región variable del anticuerpo no humano (por ejemplo, roedor) (o fragmento del mismo) construyendo un modelo tridimensional de la región variable del anticuerpo no humano;
- 35 (b) generar alineamientos de secuencias usando distribuciones de relativa accesibilidad a partir de estructuras cristalográficas de rayos X de un número suficiente de cadenas pesadas y ligeras de las regiones variables de anticuerpos no humanos y humanos para dar un conjunto de posiciones de las regiones estructurales de las cadenas pesadas y ligeras en las que las posiciones de alineamiento son idénticas en el 98 % del número suficiente de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos no humanos;
- 40 (c) definir para el anticuerpo no humano que va a humanizarse un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las cadenas pesadas y ligeras usando el conjunto de posiciones de la región estructural generadas en la etapa (b);
- 45 (d) identificar a partir de las secuencias de aminoácidos de anticuerpo humano un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las cadenas pesadas y ligeras que es lo más estrechamente idéntico al conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie definidos en la etapa (c), en el que la cadena pesada y ligera del anticuerpo humano están o no están naturalmente apareadas;
- 50 (e) sustituir, en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo no humano que va a humanizarse, el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las cadenas pesadas y ligeras definido en la etapa (c) con el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las cadenas pesadas y ligeras identificado en la etapa (d);
- 55 (f) construir un modelo tridimensional de la región variable del anticuerpo no humano resultante de la sustitución especificada en la etapa (e);
- (g) identificar, comparando los modelos tridimensionales construidos en las etapas (a) y (f), cualquier resto de aminoácido de los conjuntos identificados en las etapas (c) o (d), que están dentro de 5 Angstroms de cualquier átomo de cualquier resto de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo no humano que va a humanizarse; y
- 60 (h) cambiar cualquier resto identificado en la etapa (g) del resto de aminoácido no humano original para así definir un conjunto humanizante de anticuerpos no humanos de restos de aminoácidos expuestos en la superficie; con la condición de que la etapa (a) no necesita realizarse primero, pero debe realizarse antes de etapa (g).

Superhumanización

65 El método compara la secuencia no humana con el repertorio de genes de la línea germinal humana funcional. Se seleccionan aquellos genes humanos que codifican estructuras canónicas idénticas o estrechamente relacionadas con las secuencias no humanas. Se eligen aquellos genes humanos seleccionados con la mayor homología dentro de las CDR como donantes de FR. Finalmente, las CDR no humanas se injertan sobre estas FR humanas. Este método se describe en la patente WO 2005/079479 A2.

Optimización de contenidos de la cadena humana

5 Este método compara la secuencia no humana (por ejemplo, de ratón) con el repertorio de genes de la línea germinal humana y las diferencias se puntúan como contenido de la cadena humana (HSC) que cuantifica una secuencia al nivel de posibles epítopes de MHC/linfocitos T. A continuación, la secuencia diana se humaniza maximizando su HSC en vez de usando una medida de identidad global para generar múltiples variantes humanizadas diversas (descritas en Molecular Immunology, 44, (2007) 1986-1998).

10 Barajado de regiones estructurales

15 Las CDR del anticuerpo no humano están fusionadas en marco con conjuntos de ADNc que engloban todas las regiones estructurales de genes de la línea germinal humana de cadenas pesadas y ligeras conocidas. A continuación, los anticuerpos humanizados se seleccionan, por ejemplo, por inmunopurificación de la biblioteca de anticuerpos expresados en fago. Esto se describe en Methods 36, 43-60 (2005).

Conjugados

20 La presente invención proporciona un conjugado que comprende un compuesto de PBD conectado al anticuerpo a través de una unidad conectora.

25 La presente invención es adecuada para su uso en la provisión de un compuesto PBD a un sitio preferido en un sujeto. En las realizaciones preferidas, el conjugado permite la liberación de un compuesto de PBD activo que no retiene ninguna parte del conector. No hay ningún cabo presente que pueda afectar la reactividad del compuesto de PBD.

Los enlazadores del ADC previenen preferentemente la agregación de moléculas de ADC y mantienen el ADC libremente soluble en medios acuosos y en un estado monomérico.

30 Los enlazadores del ADC son preferentemente estables extracelularmente. Antes del transporte o de la administración en una célula, el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) es preferentemente estable y permanece intacto, es decir, el anticuerpo permanece unido al resto del fármaco. Los enlazadores son estables fuera de la célula diana y pueden escindirse a alguna velocidad eficaz dentro de la célula. Un enlazador eficaz: (i) mantendrá las propiedades de unión específicas del anticuerpo; (ii) permitirá la administración intracelular del conjugado o resto de fármaco; (iii) permanecerá estable e intacto, es decir no escindido, hasta que el conjugado se haya sido administrado o transportado a su sitio diana; y (iv) mantendrá un efecto citotóxico, de muerte celular o un efecto citostático del resto de fármaco PBD. La estabilidad del ADC se puede medir mediante técnicas analíticas estándar tales como espectroscopía de masas, HPLC, y la técnica de separación/análisis CL/EM.

40 *Realizaciones*

Las realizaciones de la presente invención incluyen ConjA, en el que el anticuerpo es como se ha definido anteriormente.

45 Las realizaciones de la presente invención incluyen ConjB, en el que el anticuerpo es como se ha definido anteriormente.

50 Las realizaciones de la presente invención incluyen ConjC, en el que el anticuerpo es como se ha definido anteriormente.

Las realizaciones de la presente invención incluyen ConjD, en el que el anticuerpo es como se ha definido anteriormente.

55 Las realizaciones de la presente invención incluyen ConjE, en el que el anticuerpo es como se ha definido anteriormente.

Carga de fármaco

60 La carga de fármaco es el número promedio de fármacos de PBD por anticuerpo. Si los compuestos de la invención están unidos a cisteínas, la carga de fármaco puede oscilar de 1 a 8 fármacos (D) por anticuerpo, es decir, en los que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco están covalentemente unidos al anticuerpo. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de anticuerpos, conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 8.

65 El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse mediante medios convencionales tales como UV, HPLC de fase inversa, HIC, espectroscopía de masas, ensayo de ELISA y electroforesis. También puede determinarse la distribución cuantitativa de ADC en

términos de p . Por ELISA, puede determinarse el valor promediado de p en una preparación particular de ADC (Hamblett y col. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson y col. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la distribución de valores de p (fármaco) no es discernible por la unión anticuerpo-antígeno y la limitación de la detección de ELISA. Por tanto, el ensayo de ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo-fármaco no

5 determina si los restos de fármaco están unidos al anticuerpo, tal como los fragmentos de la cadena pesada o cadena ligera, o los restos de aminoácidos particulares. En algunos casos, puede lograrse separación, purificación y caracterización de ADC homogéneos en los que p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. Tales técnicas también son aplicables a otros tipos de conjugados.

10 Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión sobre el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos mediante los cuales puede unirse un conector. Mayor carga de fármaco, por ejemplo, $p > 5$, puede producir agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco.

15 Normalmente, menos del máximo teórico de los restos de fármaco están conjugados con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos de lisina que no reaccionan con el producto intermedio de fármaco-conector (D-L) o reactivo conector. Solo los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de conector reactivo con amina. Por tanto, solo los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de conector reactivo con tiol. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, si alguno, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan ligarse a un resto de fármaco. La mayoría de los restos de tiol de cisteína en los anticuerpos de los compuestos existen como puentes de disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, bajo condiciones reductoras parciales o

20 totales. La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, que incluyen: (i) limitando el exceso molar de producto intermedio de fármaco-conector (D-L) o reactivo de conector con respecto al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo de reacción de la conjugación o temperatura, y (iii) condiciones reductoras parciales o reductoras limitantes para la modificación del tiol de cisteína.

25 Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de conector mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) manipulando uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos del aminoácido cisteína no nativos). El documento US 7521541 enseña a manipular anticuerpos por introducción de aminoácidos de cisteína reactivos.

30 Los aminoácidos de cisteína pueden manipularse en sitios reactivos en un anticuerpo y que no forman enlaces disulfuro entre cadenas o intermoleculares (Junutula y col., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan y col. (2009) Blood 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Los tioles de cisteína manipulados pueden reaccionar con reactivos de conector o los reactivos de fármaco-conector de la presente invención que tienen grupos electrófilos reactivos con tiol tales como maleimida o alfa-haloamidas para formar ADC con anticuerpos manipulados por cisteína y el resto de fármacos de PBD. Así, la localización del resto de fármaco puede diseñarse, controlarse y conocerse. La carga de fármaco puede controlarse, ya que los grupos tiol de cisteína manipulados normalmente reaccionan con reactivos de conector reactivos con tiol o reactivos de fármaco-conector en alto rendimiento. La manipulación de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido de cisteína por sustitución en un único sitio sobre la cadena pesada o ligera da dos nuevas cisteínas sobre el anticuerpo simétrico. Una carga de fármaco próxima a 2 puede lograrse con casi homogeneidad del producto de conjugación ADC.

35 Alternativamente, la conjugación específica del sitio se puede conseguir mediante ingeniería de anticuerpos para contener aminoácidos no naturales en sus cadenas pesada y/o ligera como se describe en Axup et al. ((2012), Proc Natl Acad Sci USA. 109(40):16101-16116). Los aminoácidos no naturales proporcionan la ventaja adicional de que la química ortogonal puede diseñarse para unir el reactivo de unión y el fármaco.

40 Si más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un producto intermedio de fármaco-conector, o reactivo de conector seguido de resto de fármaco reactivo, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de restos de fármaco unidos a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía de líquidos tales como fase inversa polimérica (PLRP) e interacción hidrófoba (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla por el valor de carga del fármaco. Las preparaciones de ADC con un único valor de carga de fármaco (p) pueden aislarse, sin embargo, estos ADC de valor de carga único pueden todavía ser mezclas heterogéneas debido a que los restos de fármaco pueden unirse, mediante el conector, en diferentes sitios sobre el anticuerpo.

45 Así, las composiciones de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos de

conjugados de anticuerpo-fármaco en las que el anticuerpo tiene uno o más restos de fármaco de PBD y en las que los restos de fármaco pueden unirse al anticuerpo en diversos restos de aminoácidos.

En una realización, el número promedio de grupos de pirrolobenzodiazepina diméricos por anticuerpo está en el intervalo de 1 a 8, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 4, y 4 a 8.

En algunas realizaciones, hay un grupo de pirrolobenzodiazepina dimérico por anticuerpo.

Incluye otras formas

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

Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se tratan en Berge y col., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitaciones, iones de metales alcalinos tales como Na⁺ y K⁺, cationes alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes tales como Al³⁺. Ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ión amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺).

Ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, además de aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ión amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

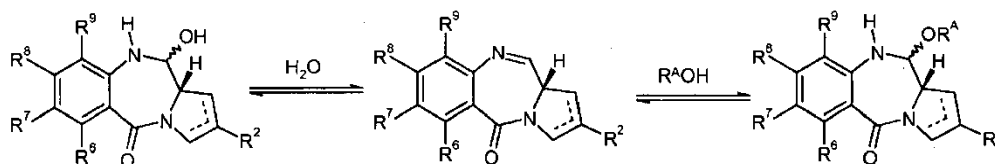
Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que pueda ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitaciones, aquellos derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de los siguientes ácidos orgánicos: ácido 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluceptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalenocarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, trifluoroacético y valérico. Ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitaciones, aquellos derivados de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

Solvatos

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto activo, sal de compuesto activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede denominarse convenientemente un hidrato, por ejemplo, un mono-hidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc.

La invención incluye compuestos en los que un disolvente se añade a través del enlace imina del resto de PBD, que se ilustra a continuación, en el que el disolvente es agua o un alcohol (R^AOH en la que R^A es alquilo C₁₋₄):



60

Estas formas pueden denominarse formas carbinolamina y de éter de carbinolamina de PBD (como se describe en la sección referente a R¹⁰ anterior). El equilibrio de estos equilibrios depende de las condiciones a las que los compuestos se encuentran, además de la naturaleza del propio resto.

- 5 Estos compuestos particulares pueden aislarse en forma sólida, por ejemplo, por liofilización.

Isómeros

- 10 Ciertos compuestos de la invención pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautómeras, conformacionales o anoméricas particulares, que incluyen, pero no se limitan a, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L, formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinales y anticlinales; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de barco, silla, giro, sobre y media silla; y combinaciones de las mismas, denominadas conjuntamente en lo sucesivo "isómeros" (o "formas isoméricas").

- 15 El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponibilidad del componente de la imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles sobre su componente de imagen especular.

- 20 El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

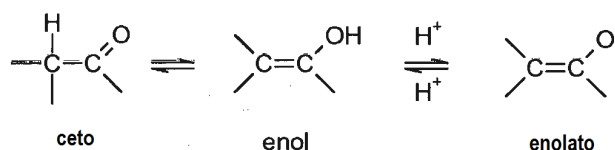
- 25 "Diaestereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros que quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diaestereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diaestereómeros pueden separarse bajo procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

- 30 "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

- 35 Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas en el presente documento generalmente siguen a S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la invención pueden contener centros asimétricos o quirales y, por tanto, existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se pretende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención, que incluyen, pero no se limitan a, diaestereómeros, enantiómeros y atropisómeros, además de mezclas de los mismos, tales como mezclas racémicas, formen parte de la presente invención. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano del plano-luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación del plano-luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto en que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse un enantiómero, y una mezcla de tales isómeros se denomina frecuentemente mezcla enantiomérica. Una mezcla 45:50 de enantiómeros se denomina una mezcla racémica o un racemato, que puede producirse si no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción química o método. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, que carecen de la actividad óptica.

- 50 Obsérvese que, excepto como se trata más adelante para las formas tautómeras, específicamente excluidas del término "isómeros", como se usa en el presente documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que se diferencian en las conexiones entre átomos en vez de simplemente por la posición de átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH₂OH. Similarmente, una referencia al orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir bien formas estructuralmente isoméricas que se encuentran dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo C₁₋₇ incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

- 60 La exclusión anterior no se refiere a formas tautómeras, por ejemplo, formas ceto, enol y enolato, como en, por ejemplo, los siguientes pares tautómeros: ceto/enol (ilustrados más adelante), imina/enamina, amida/iminoalcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiolo, -nitroso/hidroxiazolo y nitro/aci-nitro.



El término "tautómero" o "forma tautómera" se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles mediante una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros de protones (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones mediante la migración de un protón, tales como isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos de los electrones de enlace.

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

Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como, pero no se limitan a ^2H (deuterio, D), ^3H (tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl y ^{125}I . Diversos compuestos isotópicamente marcados de la presente invención, por ejemplo, aquellos en los que los isótopos radiactivos tales como ^3H , ^{13}C y ^{14}C se incorporan. Tales compuestos isotópicamente marcados pueden ser útiles en estudios metabólicos, estudios de cinética de reacción, técnicas de detección u obtención de imágenes, tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT) que incluyen ensayos de distribución en tejido de fármaco o sustrato, o en el tratamiento radiactivo de pacientes. Los compuestos terapéuticos marcados o sustituidos con deuterio de la invención pueden tener propiedades de DMPK mejoradas (metabolismo y farmacocinética del fármaco), referentes a la distribución, metabolismo y secreción (ADME). La sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, elevada semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos. Un compuesto marcado con ^{18}F puede ser útil para estudios de PET o SPECT. Los compuestos isotópicamente marcados de la presente invención y profármacos de los mismos pueden prepararse generalmente llevando a cabo los procedimientos desvelados en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones descritos más adelante sustituyendo un reactivo no isotópicamente marcado por un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible. Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, 2H o D), puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, elevada semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera un sustituyente. La concentración de un isótopo más pesado tal, específicamente deuterio, puede definirse por un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de la presente invención, cualquier átomo no específicamente designado como un isótopo particular se indica que representa cualquier isótopo estable de ese átomo.

A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto particular incluye todas aquellas formas isoméricas, que incluyen mezclas (completa o parcialmente) racémicas y otras mezclas de las mismas. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isoméricas son tanto conocidos en la técnica como se obtienen fácilmente adaptando los métodos enseñados en el presente documento, o métodos conocidos, de una manera conocida.

Actividad biológica

Ensayos de proliferación celular *in vitro*

Generalmente, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) se mide: exponiendo las células de mamífero que tienen proteínas al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular; cultivar las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y medir la viabilidad celular. Los ensayos *in vitro* basados en células se usan para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad e inducción de apoptosis (activación por caspasas) de un ADC de la invención.

La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco puede medirse por un ensayo de proliferación celular. El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo[®] es un método de ensayo homogéneo comercialmente disponible (Promega Corp., Madison, WI) basado en la expresión recombinante de luciferasa de coleópteros (patentes de EE.UU. n^o 5583024; 5674713 y 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación de ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch y col. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; documento US 6602677). El CellTiter-Glo[®] se realiza en formato de 96 pocillos, haciéndolo susceptible a cribado de alta resolución automatizado (HTS) (Cree y col. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el único reactivo (reactivo

CellTiter-Glo[®]) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. No se requieren el lavado de células, eliminación de medio y múltiples etapas de pipeteado. El sistema detecta tan solo 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de añadir reactivo y mezclar. Las células pueden tratarse continuamente con ADC, o pueden tratarse y separarse de ADC. Generalmente, las células tratadas brevemente, es decir, 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células continuamente tratadas.

El formato “añadir-mezclar-medir” homogéneo produce la lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter-Glo[®] genera una señal luminiscente “de tipo brillo”, producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una semivida generalmente superior a cinco horas, dependiendo del tipo de célula y del medio usado. Las células viables se reflejan en unidades relativas de luminiscencia (URL). El sustrato, luciferina de escarabajo, se descarboxila oxidativamente por luciferasa de luciérnaga recombinante, con la conversión concomitante de ATP en AMP y generación de fotones.

La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco también puede medirse por un ensayo de citotoxicidad. Se lavan células adherentes cultivadas con PBS, se desprenden con tripsina, se diluyen en medio completo, que contiene 10 % de SBF, se centrifugan, se resuspenden en medio fresco y se cuentan con un hemocitómetro. Los cultivos en suspensión se cuentan directamente. Suspensiones monodispersas de células adecuadas para el recuento pueden requerir la agitación de la suspensión por aspiración repetida para romper los grupos de células.

La suspensión de células se diluye a la densidad de siembra deseada y se dispensa (100 µl por pocillo) en placas de 96 pocillos negras. Se incuban placas de líneas de células adherentes durante la noche para permitir la adherencia. Pueden usarse cultivos celulares en suspensión el día de la siembra.

Se prepara una solución madre (1 ml) de ADC (20 µg/ml) en el medio de cultivo celular apropiado. Se preparan diluciones de 10 veces en serie de ADC de solución madre en tubos de centrifuga de 15 ml transfiriendo en serie 100 µl a 900 µl de medio de cultivo celular.

Se dispensan cuatro pocillos por duplicado de cada dilución de ADC (100 µl) en placas de 96 pocillos negras, previamente sembradas con suspensión de células (100 µl), produciendo un volumen final de 200 µl. Los pocillos de control reciben medio de cultivo celular (100 µl).

Si el tiempo de duplicación de la línea celular es superior a 30 horas, la incubación de ADC es durante 5 días, si no se hace una incubación de cuatro días.

Al final del periodo de incubación, se evalúa la viabilidad celular con el ensayo de azul Alamar. Se dispensa azul Alamar (Invitrogen) sobre la placa completa (20 µl por pocillo) y se incuba durante 4 horas. Se mide la fluorescencia de azul Alamar a la excitación de 570 nm, emisión de 585 nm sobre el lector de placas Varioskan Flash. El porcentaje de supervivencia celular se calcula a partir de la fluorescencia media en los pocillos tratados con ADC en comparación con la fluorescencia media en los pocillos de control.

Uso

Los conjugados de la invención pueden usarse para proporcionar un compuesto de PBD en una localización diana.

La localización diana es preferentemente una población de células proliferativas. El anticuerpo es un anticuerpo para un antígeno presente sobre una población de células proliferativas.

En una realización, el antígeno está ausente o presente a un nivel reducido en una población de células no proliferativas en comparación con la cantidad de antígeno presente en la población de células proliferativas, por ejemplo, una población de células tumorales.

En la localización diana, el conector puede escindirse de manera que libere un compuesto RelA, RelB, RelC, RelD o RelBRelE. Así, el conjugado puede usarse para proporcionar selectivamente un compuesto RelA, RelB, Rel C, RelD o RelBRelE a la localización diana.

El conector puede escindirse por una enzima presente en la localización diana.

La localización diana puede ser *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención incluyen aquellos con utilidad para actividad contra el cáncer. En particular, los compuestos incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, covalentemente unido por un conector, a un resto de fármaco de PBD, es decir, toxina. Si el fármaco no está conjugado a un anticuerpo, el fármaco de PBD tiene un efecto citotóxico. La actividad biológica del resto de fármaco de PBD se modula así por conjugación con un anticuerpo. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención administran selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico a tejido tumoral, por lo que puede conseguirse

mayor selectividad, es decir, una menor dosis eficaz.

Así, en un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de conjugado como se describe en el presente documento para su uso en terapia.

5 En otro aspecto también se proporciona un compuesto de conjugado como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. Un segundo aspecto de la presente invención proporciona el uso de un compuesto conjugado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

10 Un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente si un conjugado candidato trata o no una afección proliferativa para cualquier tipo de célula particular. Por ejemplo, ensayos que pueden usarse convenientemente para evaluar la actividad ofrecida por un compuesto particular se describen en los siguientes ejemplos.

15 El término "enfermedad proliferativa" se refiere a una proliferación celular no deseada o no controlada de células excesivas o anormales que es no deseada, tal como crecimiento neoplásico o hiperplásico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

20 Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, pero sin limitaciones, proliferación celular benigna, pre-maligna y maligna, que incluyen, pero sin limitaciones, neoplasias y tumores (por ejemplo, histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer del intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer cerebral, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), linfomas, leucemias, psoriasis, enfermedades de los huesos, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conjuntivos) y aterosclerosis. Cánceres de particular interés incluyen, pero sin limitaciones, leucemias y cánceres de ovario.

25 Puede tratarse cualquier tipo de célula, que incluye, pero no se limita a, pulmón, gastrointestinal (que incluye, por ejemplo, intestino, colon), mama (mamario), de ovario, próstata, hígado (hepático), riñón (renal), vejiga, páncreas, cerebro y piel.

Cánceres de interés concreto incluyen, entre otros, cánceres de mama, gástrico o de vejiga urinaria.

35 Se contempla que los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención pueden usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizados por la expresión en exceso de un antígeno de tumor. Afecciones o trastornos hiperproliferativos a modo de ejemplo incluyen tumores benignos o malignos; leucemia, tumores malignos hematológicos y linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteliales, del estroma, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, que incluyen autoinmunitarios.

40 Generalmente, la enfermedad o trastorno que va a tratarse es una enfermedad hiperproliferativa tal como cáncer. Ejemplos de cáncer que van a tratarse en el presente documento incluyen, pero sin limitaciones, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye 45 cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, 50 cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, además de cáncer de cabeza y cuello.

55 Enfermedades autoinmunitarias para las que los compuestos de ADC pueden usarse en el tratamiento incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tales como LES y nefritis lúpica, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artritis psoriásica), osteoartritis, trastornos autoinmunitarios gastrointestinales y del hígado (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y celiacía), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis asociada a ANCA, que incluye vasculitis de Churg- 60 Strauss, granulomatosis de Wegener y poliarteritis), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonio-mioclono, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, ronchas, pénfigo vulgar, pénfigoide buloso y lupus 65 eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura post-transfusión y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveítis,

enfermedades auditivas autoinmunitarias (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y sordera parcial), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la diabetes tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Tales enfermedades más preferidas incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, DMDI, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

Métodos de tratamiento

Los conjugados de la presente invención pueden usarse en un método de terapia.

La cantidad real administrada, y la tasa y tiempo-ciclo de administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que esté tratándose. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, está dentro de la responsabilidad de médicos generales y otros doctores médicos.

Un compuesto de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente como secuencialmente dependiendo de la afección que vaya a tratarse. Ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero sin limitaciones, quimioterapia (la administración de agentes activos, que incluyen, por ejemplo, fármacos, tales como quimioterapéuticos); cirugía; y radioterapia.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitaciones, agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de las plantas de venenos del huso, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de cinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en "terapia dirigida" y quimioterapia convencional.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS nº 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS nº 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS nº 15663-27-1), carboplatino (CAS nº 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS nº 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) y doxorubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD y rapamicina.

Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor Mek, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (sin Cremophor), formulaciones de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); alquil sulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas del nitrógeno tales como clorambucilo, clornafacina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma 11, caliqueamicina omega 11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, nemorubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-

flourouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitiostano, 5 testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio, hidroxifurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; 10 losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; 15 vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

20 También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico": (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la 25 producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDAX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; además de troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); (iv) inhibidores de proteínas cinasas tales como inhibidores de MEK (documento WO 2007/044515); (v) inhibidores de lípido cinasas; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que 30 inhiben la expresión de genes en rutas de señalización que participan en la proliferación celular anómala, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras, tales como oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; 35 PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de la topoisomerasa 1 tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico" anticuerpos terapéuticos tales como 40 alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), ofatumumab (ARZERRA®, GSK), pertuzumab (PERJETA®, OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa), y el conjugado de anticuerpo-fármaco gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth).

45 Anticuerpos monoclonales humanizados con potencial terapéutico como agentes quimioterapéuticos en combinación con los conjugados de la invención incluyen: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatumab mertansine, cantuzumab mertansine, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, 50 palivizumab, pascolizumab, pefusituzumab, pectuzumab, pertuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resivizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab, tucotuzumab celmoleucina, tucosituzumab, umavizumab, urtoxazumab y visilizumab.

55 Las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para su uso según la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, es decir, un compuesto de conjugado, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por 60 ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para administración por vía oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o 65 vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un

vehículo sólido tal como una gelatina.

Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos habituales en la materia son perfectamente capaces de preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera.

10 **Formulaciones**

Aunque es posible usar el compuesto de conjugado (por ejemplo, administrarse) solo, frecuentemente es preferible que esté presente como una composición o formulación.

15 En una realización, la composición es una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación, preparación, medicamento) que comprende un compuesto de conjugado, como se describe en el presente documento, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de conjugado, como se describe en el presente documento, junto con uno o varios de otros componentes farmacéuticamente aceptables muy conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, vehículos, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizadores, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascaradores, agentes colorantes, aromatizantes y edulcorantes farmacéuticamente aceptables.

25 En una realización, la composición comprende además otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

30 Vehículos, diluyentes, excipientes adecuados, etc., pueden encontrarse en textos farmacéuticos estándar. Véanse, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos de preparación de una composición farmacéutica que comprenden mezclar al menos un conjugado radiomarcado con [¹¹C] o compuesto similar a conjugado, como se define en el presente documento, junto con uno o varios de otros componentes farmacéuticamente aceptables muy conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, vehículos, diluyentes, excipientes, etc. Si se formulan como unidades discretas (por ejemplo, comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosificación) del compuesto activo.

40 El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, componentes, materiales, composiciones, formas de dosificación, etc., que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación de beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, diluyente, excipiente, etc., debe también ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación.

45 Las formulaciones pueden prepararse por cualquier método muy conocido en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el compuesto activo con un vehículo que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación el compuesto activo con vehículos (por ejemplo, vehículos líquidos, vehículo sólido finamente dividido, etc.), y luego moldear el producto, si fuera necesario.

50 La formulación puede prepararse para proporcionar liberación rápida o lenta; inmediata, retardada, controlada o liberación sostenida; o una combinación de las mismas.

55 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección) incluyen líquidos estériles, libres de pirógenos, isotónicos, acuosos o no acuosos (por ejemplo, disoluciones, suspensiones), en los que el principio activo se disuelve, suspende o proporciona de otro modo (por ejemplo, en un liposoma u otra micropartícula). Tales líquidos pueden contener adicionalmente otros componentes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizadores, bacteriostáticos, agentes de suspensión, espesantes y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre (u otro fluido corporal relevante) del receptor previsto. Ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para su uso en tales formulaciones incluyen inyección de cloruro sódico, solución de Ringer o inyección de Ringer con lactato. Normalmente, la concentración del principio activo en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de

aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes cerrados de dosis unitaria o multi-dosis, por ejemplo, ampollas y viales, y puede almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

Dosificación

Se apreciará por un experto en la materia que las dosificaciones apropiadas del compuesto de conjugado, y composiciones que comprenden el compuesto de conjugado, pueden variar de paciente a paciente. Determinar la dosificación óptima implicará generalmente equilibrar el nivel de beneficio terapéutico contra cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores que incluyen, pero sin limitaciones, la actividad del compuesto particular, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de eliminación del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, la gravedad de la afección, y la especie, sexo, edad, peso, afección, salud general e historia médica previa del paciente. La cantidad de compuesto y la vía de administración serán por último lugar a criterio del médico, veterinario o profesional clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para lograr concentraciones locales en el sitio de acción que consiguen el efecto deseado sin causar efectos secundarios nocivos o perjudiciales sustanciales.

La administración puede efectuarse en una dosis, continuamente o intermitentemente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos apropiados) durante el transcurso del tratamiento. Métodos de determinación de los medios más eficaces y de dosificación de la administración son muy conocidos para aquellos expertos en la materia y variarán con la formulación usada para la terapia, el fin de la terapia, la(s) célula(s) diana(s) que está(n) tratándose y el sujeto que está tratándose. Pueden llevarse a cabo administraciones individuales o múltiples con el nivel de dosis y patrón que se selecciona por el médico práctico, veterinario o profesional clínico.

En general, una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 25 mg (más normalmente aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg) por kilogramo de peso corporal del sujeto por día. Si el compuesto activo es una sal, un éster, una amida, un profármaco o similar, la cantidad administrada se calcula basándose en el compuesto parental y así el peso real que va a usarse se aumenta proporcionalmente.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 100 mg, 3 veces al día.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 150 mg, 2 veces al día.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 200 mg, 2 veces al día.

Sin embargo en una realización, el compuesto de conjugado se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 50 o aproximadamente 75 mg, 3 o 4 veces al día.

En una realización, el compuesto de conjugado se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 100 o aproximadamente 125 mg, 2 veces al día.

Las cantidades de dosificación descritas anteriormente pueden aplicarse al conjugado (incluyendo el resto de PBD y el conector al anticuerpo) o a la cantidad eficaz de compuesto de PBD proporcionada, por ejemplo, la cantidad de compuesto que es liberable después de la escisión del conector.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un ADC de la invención dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se ha definido anteriormente, la gravedad y transcurso de la enfermedad, si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. La molécula se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de molécula es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto, por ejemplo, por una como más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosificación a modo de ejemplo de ADC que va a administrarse a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende un ciclo de administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de dosis adicionales cada semana, dos semanas o tres semanas de un ADC. Pueden ser útiles otras pautas de

dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Tratamiento

5 El término "tratamiento", como se usa en el presente documento en el contexto de tratar una afección, se refiere generalmente a tratamiento y terapia, tanto de un ser humano como un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en el que se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la afección, e incluye una reducción en la tasa de progreso, una detención en la tasa de progreso, regresión de la afección, mejora de la afección y cura de la afección. También se incluye el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis, prevención).

15 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, proporcional a una relación de beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según una pauta de tratamiento deseada.

20 Similarmente, el término "cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir algún efecto profiláctico deseado, proporcional a una relación de beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según una pauta de tratamiento deseada.

Preparación de conjugados de fármaco

25 Los conjugados de anticuerpo-fármaco pueden prepararse por varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo o anticuerpo con un fármaco-reactivo de conector. Este método puede emplearse para preparar los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención.

30 Grupos nucleófilos sobre anticuerpos incluyen, pero sin limitaciones, grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína. Los grupos tiol son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos sobre restos de conector tales como aquellos de la presente invención. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de conector mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditioneitol) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz y col. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Cada puente de disulfuro de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), produciendo la conversión de una amina en un tiol.

El sujeto/paciente

40 El sujeto/paciente puede ser un animal, mamífero, un mamífero placentario, un marsupial (por ejemplo, canguro, tejón australiano), un monotremo (por ejemplo, ornitorrinco), un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), aviar (por ejemplo, un ave), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), porcino (por ejemplo, un cerdo), ovino (por ejemplo, una oveja), bovino (por ejemplo, una vaca), un primate, simio (por ejemplo, un simio inferior o simio superior), un simio inferior (por ejemplo, tití, babuino), un simio superior (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano.

50 Además, el sujeto/paciente puede estar en cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo, un feto. En una realización preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

Ejemplos

Métodos experimentales generales

55 Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se facilitan en g/100 ml. Los puntos de fusión se midieron usando un aparato de punto de fusión digital (electrotérmico). Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro de IR Spectrum 1000 FT de Perkin-Elmer. Los espectros de RMN ¹H y ¹³C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN de Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se informan con respecto a TEM ($\delta = 0,0$ ppm) y las señales se designan s (singlete), d (doblete), t (triplete), dt (triplete doble), dd (doblete de dobletes), ddd (doblete doble de dobletes) o m (multiplete), con las constantes de acoplamiento dadas en hercios (Hz). Se recogieron datos de espectroscopía de masas (EM) usando un instrumento Micromass ZQ de Waters acoplado a una HPLC 2695 de Waters con una PDA 2996 de Waters. Los parámetros de Micromass ZQ de Waters usados fueron: capilar (kV), 3,38; cono (V), 35; extractor (V), 3,0; temperatura de la fuente (°C), 100; temperatura de desolvatación (°C), 200; velocidad de flujo del cono (l/h), 50; velocidad de flujo de desolvatación (l/h), 250. Los datos de espectroscopía de

masas de alta resolución (HR-EM) se registraron en un Micromass QTOF Global de Waters en modo W positivo usando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas de metal para introducir las muestras en el instrumento. Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de aluminio de gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄), y la cromatografía ultrarrápida utilizó gel de sílice (Merck 60, 230-400 de malla ASTM). Excepto por el HOBt (NovaBiochem) y los reactivos soportados sobre sólido (Argonaut), todos los otros productos químicos y disolventes se compraron de Sigma-Aldrich y se usaron como se suministraron sin más purificación. Se prepararon disolventes anhidros mediante destilación bajo una atmósfera de nitrógeno seca en presencia de un agente secante apropiado, y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4A o alambre de sodio. Éter de petróleo se refiere a la fracción que hierve a 40-60 °C.

Condiciones generales de CL/EM:

Método 1 (método predeterminado, utilizado a menos que se indique lo contrario)

La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico 0,1 %) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composición inicial 5 % de B durante 1,0 min, a continuación 5 % de B a 95 % de B durante un periodo de 3 min. La composición se mantuvo durante 0,1 min al 95 % de B, y a continuación volvió a 5 % de B en 0,03 minutos y se mantuvo allí durante 0,87 min. El tiempo de ejecución total del gradiente es igual a 5 min.

Método 2

La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico 0,1 %) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composición inicial 5 % de B durante 1,0 min, a continuación 5 % de B a 95 % de B durante un periodo de 2.5 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min al 95 % de B, y a continuación volvió a 5 % de B en 0,1 minutos y se mantuvo allí durante 0,9 min. El tiempo de ejecución total del gradiente es igual a 5 min

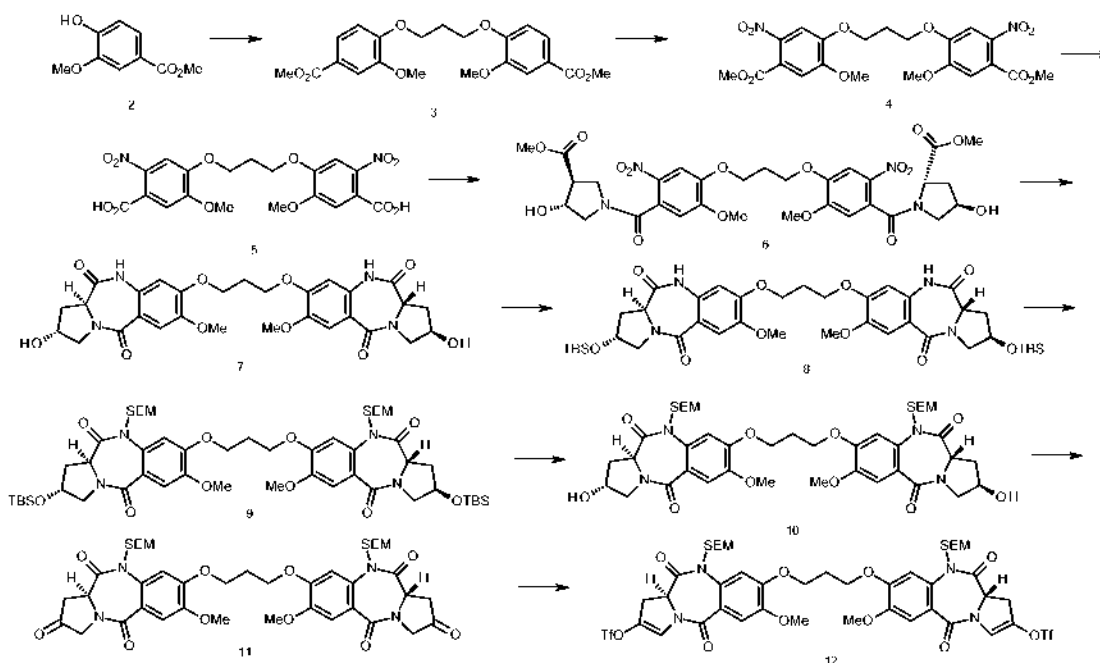
Para ambos métodos

Velocidad de flujo 3,0 ml/min, se fraccionaron 400 µl mediante una pieza en T de volumen muerto cero que pasa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de longitud de onda: 220 a 400 nm. Tipo de función: matriz de diodos (535 barridos). Columna: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm

Las condiciones de purificación ultrarrápida de fase inversa fueron las siguientes: Se llevó a cabo el sistema de purificación ultrarrápida (Varian 971-Fp) usando una fase móvil de agua (A) y acetonitrilo (B). Gradiente: composición inicial 5 % de B sobre 20 C.V. (Volumen de la columna) y luego 5 % de B a 70 % de B dentro de 60 C.V. La composición se mantuvo durante 15 °C. A 95 % de B, y luego se devolvió a 5 % de B en 5 C.V. y se mantuvo a 5 % de B durante 10 C.V. El tiempo de ejecución del gradiente total es igual a 120 C.V. Caudal 6,0 ml/min. Alcance de detección de longitud de onda: 254 nm. Columna: Agilent AX1372-1 SF10-5.5gC8.

HPCL preparativa: Se realizó cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (UPLC) en columnas Phenomenex Gemini NX 5µ C-18 de las siguientes dimensiones: 150 x 4,6 mm Para el análisis, y 150 x 21,20 mm para el trabajo preparatorio. Todos los experimentos de UPLC se realizaron con condiciones de gradiente. Los eluyentes usados fueron disolvente A (H₂O con ácido fórmico al 0,1 %) y disolvente B (CH₃CN con ácido fórmico al 0,1 %). Los caudales usados fueron de 1,0 ml/min para analítica y de 20,0 ml/min para HPLC preparativa. La detección estaba a 254 y 280 nm.

Síntesis del intermedio 12



(a) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxicarbonil)fenoxi]propano (**3**)

5 Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (71,3 ml, 73,2 g, 362 mmoles) gota a gota durante un periodo de 60 minutos a una solución agitada superior de vanilato de metilo **2** (60,0 g, 329 mmol) y Ph₃P (129,4 g, 494 mmol) en anhidro THF (800 ml) a 0-5 °C (hielo/acetona) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó agitar a 0-5 °C durante 1 hora adicional, después de lo cual se añadió gota a gota una solución de 1,3-propanodiol (11,4 ml, 12,0 g, 158 mmol) en THF (12 ml) durante un periodo de 20 minutos. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 5 días. El precipitado blanco resultante **3** se recogió mediante filtración a vacío, se lavó con THF y se secó en un desecador de vacío hasta peso constante. Rendimiento = 54,7 g (84 % basado en 1,3 -propanodiol). Pureza satisfactoria mediante LC/MS (3,20 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 427 ([M + Na]⁺, 10); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,64 (dd, 2H, *J* = 1,8, 8,3 Hz), 7,54 (d, 2H, *J* = 1,8 Hz), 6,93 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 4,30 (t, 4H, *J* = 6,1 Hz), 3,90 (s, 6H), 3,89 (s, 6H), 2,40 (p, 2H, *J* = 6,0 Hz).

15

(a) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxicarbonil)-5-nitrofenoxi]propano (**4**)

20 Se añadió Cu(NO₃)₂·3H₂O sólido (81,5 g, 337,5 mmol) lentamente a una suspensión agitada aérea del bis-éster **3** (54,7 g, 135 mmol) en anhídrido acético (650 ml) a 0-5 °C (hielo /acetona). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 1 hora a 0-5 °C y después se dejó calentar a temperatura ambiente. En esta etapa se observó una exotermia suave (aproximadamente 40-50 °C), acompañada por un espesamiento de la mezcla y evolución de NO₂. Se añadió anhídrido acético adicional (300 ml) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo (~ 1,5 l), se agitó y se dejó volver a temperatura ambiente. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración a vacío y se secó en un desecador para proporcionar el compuesto bis-nitro **4** deseado como un sólido amarillo. Rendimiento 66,7 g (100 %). Pureza satisfactoria mediante LC/MS (3,25 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 517 ([M + Na]⁺, 40); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,49 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 4,32 (t, 4H, *J* = 6,0 Hz), 3,95 (s, 6H), 3,90 (s, 6H), 2,45-2,40 (m, 2H).

25

(c) 1',3'-Bis[4-carboxi-2-metoxi-5-nitrofenoxi]propano (**5**)

30

Una suspensión del éster metílico **4** (66,7 g, 135 mmol) en THF (700 ml) se trató con NaOH 1 N (700 ml) y la mezcla de reacción se dejó agitar vigorosamente a temperatura ambiente. Después de 4 días de agitación, la suspensión se convirtió en una solución de color oscuro que se sometió a evaporación rotatoria a presión reducida para eliminar el THF. El residuo acuoso resultante se acidificó a pH 1 con HCl concentrado y el precipitado incoloro **5** se recogió y se secó completamente en un horno de vacío (50 °C). Rendimiento 54,5 g (87 %). Pureza satisfactoria mediante LC/MS (2,65 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 489 ([M + Na]⁺, 30); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,62 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 4,29 (t, 4H, *J* = 6,0 Hz), 3,85 (s, 6H), 2,30 (s, 6H), -2,26-2,40 (m, 2H).

35

(d) 1,1'-[[[Propan-1,3-diol]bis[[5-metoxi-2-nitro-1,4-fenil]carbonil]]bis[(2*S*,4*R*)-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxilato]] (**6**)

40

Se añadió cloruro de oxalilo (24,5 ml, 35,6 g, 281 mmol) a una suspensión agitada del ácido nitrobenzoico **5** (43 g, 92,3 mmol) y DMF (6 ml) en DCM anhidro (600 ml). Después de la efervescencia inicial, la suspensión de reacción

se convirtió en una solución y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 horas. La conversión al cloruro de ácido se confirmó tratando una muestra de la mezcla de reacción con MeOH y se observó el éster bis-metilico resultante mediante CL/EM. La mayoría del disolvente se eliminó por evaporación a presión reducida; la solución concentrada resultante se redisolvió en una cantidad mínima de DCM seco y se trituró con éter dietílico. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración, se lavó con éter dietílico frío y se secó durante 1 hora en un horno de vacío a 40 °C. El cloruro de ácido sólido se añadió en porciones durante un periodo de 25 minutos a una suspensión agitada de clorhidrato de (2S, 4R) -metil-4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato (38,1 g, 210 mmol) y TEA (64,5 ml, g, 463 mmol) en DCM (400 ml) a -40 °C (hielo seco/CH₃CN). Inmediatamente, la reacción se completó, según se juzgó mediante CL/EM (2,47 min (ES +) m/z (intensidad relativa) 721 ([M + H]⁺, 100). La mezcla de reacción se diluyó con DCM (200 ml) y se lavó con HCl 1N (300 ml), NaHCO₃ saturado (300 ml), salmuera (400 ml), se secó (SO₄), se filtró y el disolvente se evaporó a vacío para dar el producto puro 6 en forma de sólido naranja (66,7 g, 100 %). $[\alpha]_D^{22} = -46,1^\circ$ (c = 0,47, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (rotamers) δ 7,63 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,79-4,72 (m, 2H), 4,49-4,28 (m, 6H), 3,96 (s, 6H), 3,79 (s, 6H), 3,46-3,38 (m, 2H), 3,02 (d, 2H, J = 11,1 Hz), 2,48-2,30 (m, 4H), 2,29-2,04 (m, 4H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) (rotamers) δ 172,4, 166,7, 154,6, 148,4, 137,2, 127,0, 109,7, 108,2, 69,7, 65,1, 57,4, 57,0, 56,7, 52,4, 37,8, 29,0; IR (ATR, CHCl₃) 3410 (br), 3010, 2953, 1741, 1622, 1577, 1519, 1455, 1429, 1334, 1274, 1211, 1177, 1072, 1050, 1008, 871 cm⁻¹; MS (ES+) m/z (intensidad relativa) 721 ([M + H]⁺, 47), 388 (80); HRMS [M + H]⁺ teórico C₃₁H₃₆N₄O₁₆ m/z 721,2199, hallado (ES+) m/z 721,2227.

(e) 1, 1'-[[[(Propan-1,3-diol)dioxi]bis(11aS,2R)-2-(hidroxi)-7-metoxi-1, 2, 3, 10, 11, 11a-hexahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (7)

Método A: Se añadió una solución del nitroéster 6 (44 g, 61,1 mmol) en MeOH (2,8 l) al níquel Raney® recién comprado (~ 50 g de una suspensión al 50 % en H₂O) y a los gránulos anti-golpeo en un matraz de 5 litros de fondo redondo de 3 bocas. La mezcla se calentó a reflujo y después se trató gota a gota con una solución de hidrato de hidrazina (21,6 ml, 22,2 g, 693 mmol) en MeOH (200 ml), en cuyo punto se observó una efervescencia vigorosa. Cuando se completó la adición (~ 45 min), se añadió níquel Raney® adicional cuidadosamente hasta que cesó la efervescencia y se descargó el color amarillo inicial de la mezcla de reacción. La mezcla se calentó a reflujo durante otros 5 minutos, momento en el que se consideró que la reacción se había completado por TLC (90:10 v/v CHCl₃/MeOH) y LC/MS (2.12 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 597 ([M + H]⁺, 100)). La mezcla de reacción se filtró en caliente inmediatamente a través de un embudo sinterizado que contenía celite con succión al vacío. El filtrado se redujo en volumen por evaporación al vacío, momento en el que se formó un precipitado incoloro que se recogió por filtración y se secó en un desecador de vacío para proporcionar 7 (31 g, 85 %). $[\alpha]_D^{27} = +404^\circ$ (c = 0.10, DMF); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.2 (s, 2H, NH), 7.26 (s, 2H), 6.73 (s, 2H), 5.11 (d, 2H, J = 3.98 Hz, OH), 4.32-4.27 (m, 2H), 4.19-4.07 (m, 6H), 3.78 (s, 6H), 3.62 (dd, 2H, J = 12.1, 3.60 Hz), 3.43 (dd, 2H, J = 12.0, 4.72 Hz), 2.67-2.57 (m, 2H), 2.26 (p, 2H, J = 5.90 Hz), 1.99-1.89 (m, 2H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) b 169.1, 164.0, 149.9, 144.5, 129.8, 117.1, 111.3, 104.5, 54.8, 54.4, 53.1, 33.5, 27.5; IR (ATR, neto) 3438, 1680, 1654, 1610, 1605, 1516, 1490, 1434, 1379, 1263, 1234, 1216, 1177, 1156, 1115, 1089, 1038, 1018, 952, 870 cm⁻¹; MS (ES+) m/z (intensidad relativa) 619 ([M + Na]⁺, 10), 597 ([M + H]⁺, 52), 445 (12), 326 (11); HRMS [M + H]⁺ teórico C₂₉H₃₂N₄O₁₀ m/z 597.2191, hallado (ES+) m/z 597.2205.

Método B: Se añadió una suspensión de Pd al 10 % (7,5 g, 10 % p/p) en DMF (40 ml) a una solución del nitrómero 6 (75 g, 104 mmol) en DMF (360 ml). La suspensión se hidrogenó en un aparato de hidrogenación Parr durante 8 horas. El progreso de la reacción se controló mediante CL/EM después de que se hubo detenido la absorción de hidrógeno. El Pd/C sólido se eliminó por filtración y el filtrado se concentró por evaporación rotativa al vacío (por debajo de 10 mbar) a 40 °C para proporcionar un aceite oscuro que contenía trazas de DMF y carbón residual. El residuo se digirió en EtOH (500 ml) a 40 °C en un baño de agua (baño de evaporador rotatorio) y la suspensión resultante se filtró a través de celite y se lavó con etanol (500 ml) para dar un filtrado claro. Se añadió hidrato de hidrazina (10 ml, 321 mmol) a la solución y la mezcla de reacción se calentó a reflujo. Después de 20 minutos se observó la formación de un precipitado blanco y se dejó continuar el reflujo durante otros 30 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y el precipitado se recuperó por filtración, se lavó con éter dietílico (volumen 2: 1 de precipitado) y se secó en un desecador de vacío para proporcionar 7 (50 g, 81 %). Datos analíticos para el método B: Idénticos a los obtenidos para el Método A (rotación óptica, ¹H NMR, LC/MS y TLC).

(f) 1, 1, 1'-[[[(Propan-1,3-diol)dioxi]bis(11aS,2R)-2-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-11,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (8)

Se añadieron TBSCl (27,6 g, 182,9 mmol) e imidazol (29,9 g, 438,8 mmol) a una solución turbia del tetra-lactama 7 (21,8 g, 36,6 mmol) en DMF anhidro (400 ml) a 0 °C (hielo/acetona). La mezcla se dejó agitar bajo una atmósfera de nitrógeno durante 3 horas después de lo cual la reacción se consideró completa según se juzgó por CL/EM (3,90 min (ES +) m/z (intensidad relativa) 825 ([M + H]⁺, 100). La mezcla de reacción se vertió sobre hielo (~1,75 l) y se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación. El precipitado blanco resultante se recogió por filtración al vacío, se lavó con H₂O, éter dietílico y se secó en el desecador al vacío para proporcionar 8 (30,1 g, 99 %). $[\alpha]_D^{23} = +234^\circ$ (c = 0,41, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,65 (s, 2H, NH), 7,44 (s, 2H), 6,54 (s, 2H), 4,50 (p, 2H, J = 5,38 Hz), 4,21-4,10 (m, 6H), 3,87 (s, 6H), 3,73-3,63 (m, 4H), 2,85-2,79 (m, 2H), 2,36-2,29 (m, 2H), 2,07-1,99 (m, 2H), 0,86 (s, 18H), 0,08 (s, 12H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170,4, 165,7, 151,4, 146,6, 129,7, 118,9, 112,8, 105,3, 69,2, 65,4, 56,3, 55,7, 54,2, 35,2, 28,7, 25,7, 18,0, -4,82 and -4,86; IR (ATR, CHCl₃) 3235, 2955, 2926, 2855, 1698, 1695, 1603,

1518, 1491, 1446, 1380, 1356, 1251, 1220, 1120, 1099, 1033 cm^{-1} ; MS (ES+) m/z (intensidad relativa) 825 ([M + H]⁺, 62), 721 (14), 440 (38); HRMS [M + H]⁺, teórico C₄₁H₆₀N₄O₁₀Si₂ m/z 825,3921, hallado (ES+) m/z 825,3948.

5 (g) 1,1'-[[*(Propan-1,3-diol)dioxi*]bis(11aS,2R)-2-(*terc-butildimetilsililo*xi)-7-metoxi-10-((2-(*trimetilsilil*)etoxi)meti)-1,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-pirrolol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (9)

10 Se añadió gota a gota una solución de n-BuLi (68,3 ml de una solución 1,6 M en hexano, 109 mmoles) a una suspensión agitada de la tetralactama **8** (30,08 g, 36,4 mmol) en THF anhidro (600 ml) a -30 °C (hielo seco/etilenglicol) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó agitar a esta temperatura durante
1 hora (ahora un color naranja rojizo), punto en el que se añadió gota a gota una solución de SEMCl (19,3 ml, 18,2 g, 109 mmol) en THF anhidro (120 ml). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se consideró completa, según se juzgó mediante TLC (EtOAc) (4,77 min (ES +) m/z (intensidad relativa) 1085 ([M + H]⁺, 100). El THF se eliminó por evaporación al vacío y el residuo resultante se disolvió en EtOAc (750 ml), se lavó con H₂O (250 ml), salmuera (250 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a vacío para proporcionar la tetralactama cruda protegida con N10-SEM
15 **9** como un aceite (max^m 39,5 g, 100 %). El producto se llevó a la siguiente etapa sin purificación. $[\alpha]_D^{23} = +163^\circ$ (c = 0,41, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 (s, 2H), 7,22 (s, 2H), 5,47 (d, 2H, J = 9,98 Hz), 4,68 (d, 2H, J = 9,99 Hz), 4,57 (p, 2H, J = 5,77 Hz), 4,29-4,19 (m, 6H), 3,89 (s, 6H), 3,79-3,51 (m, 8H), 2,87-2,81 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, J = 5,81 Hz), 2,03-1,90 (m, 2H), 1,02-0,81 (m, 22H), 0,09 (s, 12H), 0,01 (s, 18H); RMN RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170,0, 165,7, 151,2, 147,5, 133,8, 121,8, 111,6, 106,9, 78,1, 69,6, 67,1, 65,5, 56,6, 56,3, 53,7, 35,6, 30,0, 25,8, 18,4, 18,1, -1,24, -4,73; IR (ATR, CHCl₃) 2951, 1685, 1640, 1606, 1517, 1462, 1433, 1360, 1247, 1127, 1065 cm^{-1} ; MS (ES+) m/z (intensidad relativa) 1113 ([M + Na]⁺, 48), 1085 ([M + H]⁺, 100), 1009 (5), 813 (6); HRMS [M + H]⁺ teórico C₅₃H₈₈N₄O₁₂Si₄ m/z 1085,5548, hallado (ES+) m/z 1085,5542.

25 (h) 1,1,1'-[[*(Propan-1,3-diol)dioxi*]bis(11aS,2R)-2-hidroxi-7-metoxi-10-((2-(*trimetilsilil*)etoxi)meti)-1,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-pirrolol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (10)

30 Se añadió una solución de TBAF (150 ml de una solución 1,0 M en THF, 150 mmol) a una solución agitada del éter bis-silílico crudo **9** [84,0 g (max^m 56,8 g), 52,4 mmol] en THF (800 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 1 hora, el análisis de la mezcla de reacción por TLC (95:5 v/v CHCl₃/MeOH) reveló la finalización de la reacción. El THF se eliminó por evaporación a presión reducida a temperatura ambiente y el residuo resultante se disolvió en EtOAc (500 ml) y se lavó con NH₄Cl (300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (60 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: 100 % CHCl₃ a 96:4 v/v CHCl₃/MeOH) dio la tetralactama pura **10** como una espuma blanca (36,0 g, 79 %). LC/MS 3,33 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 879 ([M + Na]⁺, 100), 857 ([M + H]⁺, 40); $[\alpha]_D^{23} = +202^\circ$ (c = 0,34, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,28 (s, 2H), 7,20 (s, 2H), 5,44 (d, 2H, J = 10,0 Hz), 4,72 (d, 2H, J = 10,0 Hz), 4,61-4,58 (m, 2H), 4,25 (t, 4H, J = 5,83 Hz), 4,20-4,16 (m, 2H), 3,91-3,85 (m, 8H), 3,77-3,54 (m, 6H), 3,01 (br s, 2H, OH), 2,96-2,90 (m, 2H), 2,38 (p, 2H, J = 5,77 Hz), 2,11-2,05 (m, 2H), 1,00-0,91 (m, 4H), 0,00 (s, 18H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 169,5, 165,9, 151,3, 147,4, 133,7, 121,5, 111,6, 106,9, 79,4, 69,3, 67,2, 65,2, 56,5, 56,2, 54,1, 35,2, 29,1, 18,4, -1,23; IR (ATR, CHCl₃) 2956, 1684, 1625, 1604, 1518, 1464, 1434, 1361, 1238, 1058, 1021 cm^{-1} ; MS (ES+) m/z (intensidad relativa) 885 ([M+29]⁺, 70), 857 ([M + H]⁺, 100), 711 (8), 448 (17); HRMS [M + H]⁺, teórico C₄₁H₆₀N₄O₁₂Si₂ m/z 857,3819, hallado (ES+) m/z 857,3826.

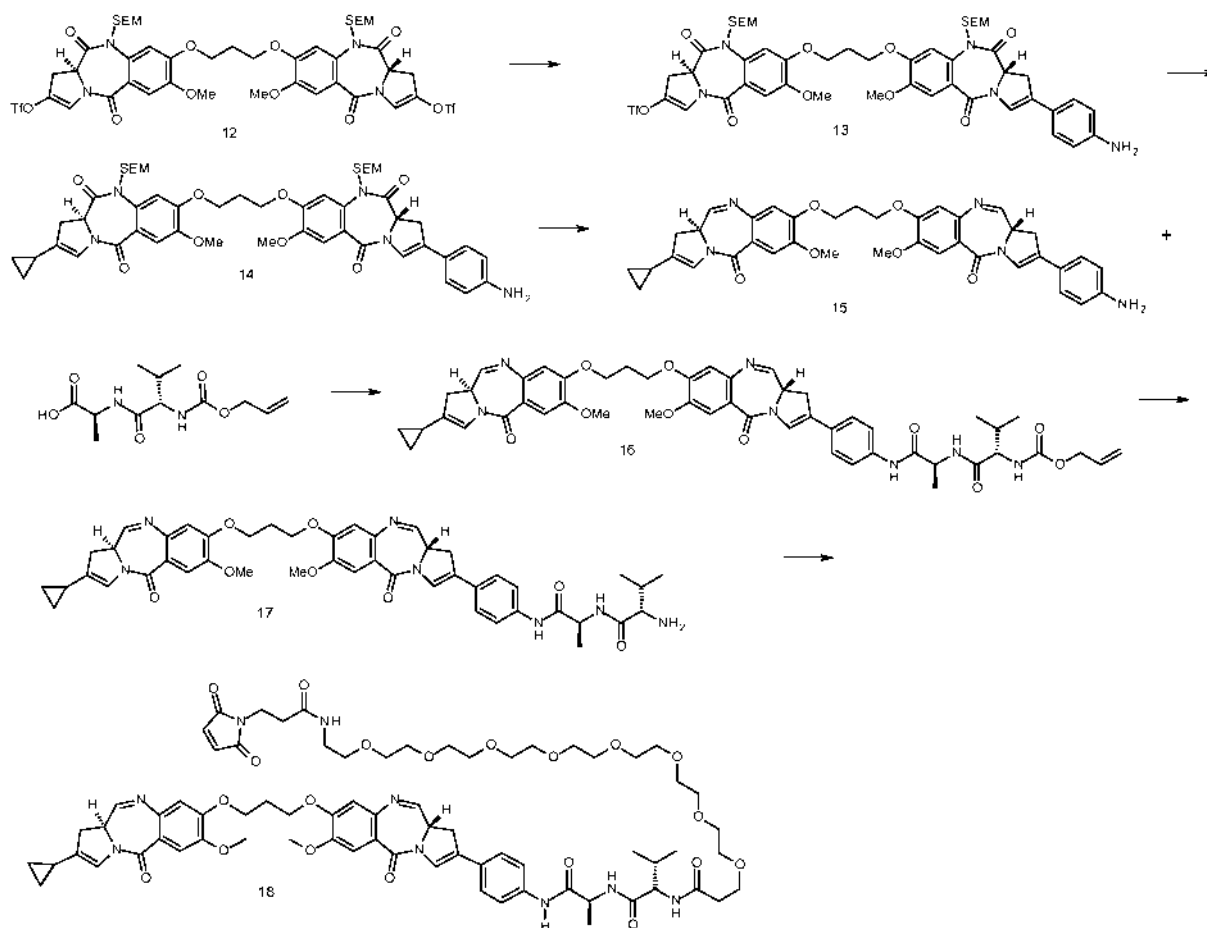
45 (i) 1,1,1'-[[*(Propan-1,3-diol)dioxi*]bis(11aS)-7-metoxi-2-oxo-10-((2-(*trimetilsilil*)etoxi)metil)-1,2,3,10,11,11a-hexahidro-5H-pirrolol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (11)

50 Se disolvieron diol **10** (25,6 g, 30 mmol, 1 eq.), NaOAc (6,9 g, 84 mmol, 2,8 eq.) y TEMPO (188 mg, 1,2 mmol, 0,04 eq.) en DCM (326 ml) en Ar. Esto se enfrió a -8 °C (temperatura interna) y se añadió TCCA (9,7 g, 42 mmol, 1,4 eq.) en porciones durante 15 minutos. TLC (EtOAc) y LC/MS [3.60 min. (ES+) m/z (intensidad relativa) 854.21 ([M + H]⁺, 40), (ES-) m/z (intensidad relativa) 887,07 ([M - H + Cl]⁻, 10)] tras 30 minutos indicó que la reacción se había completado. Se añadió DCM frío (200 ml) y la mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite antes de lavar con una solución de bicarbonato sódico saturado/tiosulfato sódico (1: 1 v/v, 200 ml x 2). La capa orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío para producir una esponja amarilla/naranja. LC/MS [3.60 min. (ES+) m/z (intensidad relativa) 854,21 ([M + H]⁺, 40); $[\alpha]_D^{20} = +291^\circ$ (c = 0,26, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,32 (s, 2H), 7,25 (s, 2H), 5,50 (d, 2H, J = 10,1 Hz), 4,75 (d, 2H, J = 10,1 Hz), 4,60 (dd, 2H, J = 9,85, 3,07 Hz), 4,31-4,18 (m, 6H), 3,89-3,84 (m, 8H), 3,78-3,62 (m, 4H), 3,55 (dd, 2H, J = 19,2, 2,85 Hz), 2,76 (dd, 2H, J = 19,2, 9,90 Hz), 2,42 (p, 2H, J = 5,77 Hz), 0,98-0,91 (m, 4H), 0,00 (s, 18H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 206,8, 168,8, 165,9, 151,8, 148,0, 133,9, 120,9, 111,6, 107,2, 78,2, 67,3, 65,6, 56,3, 54,9, 52,4, 37,4, 29,0, 18,4, -1,24; IR (ATR, CHCl₃) 2957, 1763, 1685, 1644, 1606, 1516, 1457, 1434, 1360, 1247, 1209, 1098, 1066, 1023 cm^{-1} ; MS (ES+) m/z (intensidad relativa) 881 ([M + 29]⁺, 38), 853 ([M + H]⁺, 100), 707 (8), 542 (12); HRMS [M + H]⁺ teórica C₄₁H₅₆N₄O₁₂Si₂ m/z 853,3506, hallado (ES⁺) m/z 853,3502.

65 (j) 1,1,1'-[[*(Propan-1,3-diol)dioxi*]bis(11aS)-7-metoxi-2-[[*(trifluorometil)sulfonil*]oxi]-10-((2-(*trimetilsilil*)etoxi)metil)-1,10,3,10,11,11a-tetrahidro-5H-pirrolol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (12)

Se inyectó 2,6 -lutidina anhidra (5,15 ml, 4,74 g, 44,2 mmol) en una porción a una solución vigorosamente agitada de bis-cetona **11** (6,08 g, 7,1 mmol) en DCM seco (180 ml) a -45 °C (hielo seco/acetonitrilo) en atmósfera de nitrógeno. Se inyectó rápidamente gota a gota anhídrido trifílico anhidro, tomado de una ampolla recién abierta (7,2 ml, 12,08 g, 42,8 mmol), mientras se mantenía la temperatura a -40 °C o menos. La mezcla de reacción se dejó agitar a -45 °C durante 1 hora, punto en el que la TLC (50/50 v/v de n-hexano/EtOAc) reveló el consumo completo de material de partida. La mezcla de reacción fría se diluyó inmediatamente con DCM (200 ml) y, con agitación vigorosa, se lavó con agua (1 x 100 ml), solución de ácido cítrico al 5 % (1 x 200 ml), NaHCO₃ saturado (200 ml), salmuera (100 ml) y se secó (MgSO₄). La filtración y evaporación del disolvente a presión reducida proporcionó el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (gradiente de elución: 90:10 v/v n-hexano/EtOAc to 70:30 v/v n-hexano/EtOAc) para dar bis-enol triflato **12** como una espuma amarilla (5,5 g, 70 %). LC/MS 4.32 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1139 ([M + Na]⁺, 20); [α]_D²⁴ = +271° (c = 0,18, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 (s, 2H), 7,26 (s, 2H), 7,14 (t, 2H, *J* = 1,97 Hz), 5,51 (d, 2H, *J* = 10,1 Hz), 4,76 (d, 2H, *J* = 10,1 Hz), 4,62 (dd, 2H, *J* = 11,0, 3,69 Hz), 4,32-4,23 (m, 4H), 3,94-3,90 (m, 8H), 3,81-3,64 (m, 4H), 3,16 (ddd, 2H, *J* = 16,3, 11,0, 2,36 Hz), 2,43 (p, 2H, *J* = 5,85 Hz), 1,23-0,92 (m, 4H), 0,02 (s, 18H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 167,1, 162,7, 151,9, 148,0, 138,4, 133,6, 120,2, 118,8, 111,9, 107,4, 78,6, 67,5, 65,6, 56,7, 56,3, 30,8, 29,0, 18,4, -1,25; IR (ATR, CHCl₃) 2958, 1690, 1646, 1605, 1517, 1456, 1428, 1360, 1327, 1207, 1136, 1096, 1060, 1022, 938, 913 cm⁻¹; MS (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1144 ([M + 28]⁺, 100), 1117 ([M + H]⁺, 48), 1041 (40), 578 (8); H RMS [M + H]⁺, teórico C₄₃H₅₄N₄O₁₆Si₂S₂F₆ *m/z* 1117,2491, hallado (ES+) *m/z* 1117,2465.

20 Ejemplo 1



(a) Trifluorometanosulfonato de (S)-8-(3-(((S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-ilo (13)

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (116,9 mg, 0,101 mmol) a una mezcla agitada de bis-enol triflato **12** (5,65 g, 5,06 mmoles), éster de pinacol de ácido 4-aminofenilborónico (1 g, 4,56 mmoles) Na₂CO₃ (2,46 g, 23,2 mmol), MeOH (37 ml), tolueno (74 ml) y agua (37 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar a 30 °C en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas, después de lo cual se ha consumido todo el éster borónico. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad antes de que el residuo se recogiera en EtOAc (150 ml) y se lavó con H₂O (2 x 100ml), salmuera (150 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto bruto. La purificación por

5 cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: 80:20 v/v Hexano/EtOAc a 60:40 v/v Hexano/EtOAc) proporcionó el producto **13** como una espuma amarillenta (2,4 g, 45 %). LC/MS 4,02 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1060,21 ($[M+H]^+$, 100); $^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,40 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,27 (bs, 3H), 7,24 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,15 (t, 1H, $J = 2,0$ Hz), 6,66 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 5,52 (d, 2H, $J = 10,0$ Hz), 4,77 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz), 4,76 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz), 4,62 (dd, 1H, $J = 3,7, 11,0$ Hz), 4,58 (dd, 1H, $J = 3,4, 10,6$ Hz), 4,29 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz), 4,00-3,85 (m, 8H), 3,80 - 3,60 (m, 4H), 3,16 (ddd, 1H, $J = 2,4, 11,0, 16,3$ Hz), 3,11 (ddd, 1H, $J = 2,2, 10,5, 16,1$ Hz), 2,43 (p, 2H, $J = 5,9$ Hz), 1,1-0,9 (m, 4H), 0,2 (s, 18H). $^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 100 MHz) δ 169,8, 168,3, 164,0, 162,7, 153,3, 152,6, 149,28, 149,0, 147,6, 139,6, 134,8, 134,5, 127,9, 127,5, 125,1, 123,21, 121,5, 120,5, 120,1, 116,4, 113,2, 108,7, 79,8, 79,6, 68,7, 68,5, 67,0, 66,8, 58,8, 58,0, 57,6, 32,8, 32,0, 30,3, 19,7, 0,25.

10 (b) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepine-5,11(10H,11aH)-diona (**14**)

15 Se disolvieron trifenilarsina (0,24 g, 0,8 mmol), óxido de plata (I) (1,02 g, 4,4 mmol), ácido ciclopropilborónico (0,47 g, 5,5 mmol) y material de partida **13** (1,15 g, 1,1 mmol) en dioxano (30 ml) en una atmósfera de argón. El fosfato de potasio tribásico (2,8 g, 13,2 mmol) se trituró con un mortero y se añadió rápidamente a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se evacuó y se enjuagó con argón 3 veces y se calentó a 71 °C. Se añadió paladio (II) bis (cloruro de benzonitrilo) (84 mg, 0,22 mmol) y el recipiente de reacción se evacuó y se enjuagó con argón 3 veces.

20 Después de 10 minutos se tomó una pequeña muestra para análisis por TLC (80:20 v/v de acetato de etilo/hexano) y CL/EM. Después de 30 minutos, la reacción había terminado (el análisis CL/EM indicó un consumo completo de material de partida) y la reacción se filtró a través de celite y la almohadilla de filtro se lavó con acetato de etilo (400 ml). El filtrado se lavó con agua (2 x 200 ml) y salmuera (2 x 200 ml). La capa orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano/acetato de etilo 30:70 v/v) proporcionó el producto **14** en forma de un sólido naranja/amarillo (0,66 g, 63 %). Método 1, LC/MS (3,85 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 952,17 ($[M+H]^+$, 100). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,36 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 7,30 (s, 1H), 7,25 -7,19 (m, 4H), 6,68 (s, 1H), 6,62 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 5,49 (dd, 2H, $J = 5,6, 10,0$ Hz), 4,73 (app, t, 2H, $J = 10,8$ Hz), 4,54 (dd, 1H, $J = 3,2, 10,4$ Hz), 4,40 (dd, 1H, $J = 3,2, 10,4$ Hz), 4,29 -4,23 (m, 4H), 3,91 - 3,85 (m, 7H), 3,80 -3,71 (m, 2H), 3,70 -3,61 (m, 2H), 3,38 -3,32 (m, 1H), 3,12 -3,01 (m, 1H), 2,50 -2,69 (m, 1H), 2,40 (q, 2H, $J = 5,6$ Hz), 1,50 -1,43 (m, 1H), 0,99 -0,71 (m, 6H), 0,54 -0,59 (m, 2H), 0,00 (s, 18H) ppm.

25 (c) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]di-azepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona (**15**)

35 Se disolvió SEM dilactam **14** (0,66 g, 0,69 mmol) en THF (23 ml) y se enfrió a -78 °C en atmósfera de argón. Se añadió gota a gota solución Super-Hydride® (1,7 ml, 1 M en THF) durante 5 minutos mientras se monitorizaba la temperatura. Después de 20 minutos se tomó una pequeña muestra y se lavó con agua para análisis de CL/EM. Se añadió agua (50 ml) y se retiró el baño frío. La capa orgánica se extrajo y se lavó con salmuera (60 ml). Las capas acuosas combinadas se lavaron con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10 v/v) (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron con MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se eliminó a vacío. El producto bruto se disolvió en MeOH (48 ml CH_2Cl_2 (18 ml) y agua (6 ml) y se añadió suficiente gel de sílice para proporcionar una suspensión espesa. Después de 5 días de agitación, la suspensión se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) (~ 200 ml) hasta que el producto dejó de eluir. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 70 ml), se secó con MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (100 % CHCl_3 to 96/4 v/v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) proporcionó el producto **15** en forma de un sólido amarillo (302 mg, 66 %). Método 1, LC/MS (2,42 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 660,74 ($[M+H]^+$, 30). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,86 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 7,78 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz), 7,58 -7,44 (m, 3H), 7,34 -7,20 (m, 3H), 6,88 -6,66 (m, 4H), 4,35 -4,15 (m, 6H), 3,95 -3,75 (m, 7H), 3,39 -3,22 (m, 1H), 3,14 -3,04 (m, 1H), 2,93 -2,85 (m, 1H), 2,46 -2,36 (m, 2H), 1,49 -1,41 (m, 1H), 0,80 -0,72 (m, 2H), 0,58 -0,51 (app, s, 2H) ppm.

40 (d) ((2S)-1-(((2S)-1-((4-(B-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]di-azepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (**16**)

55 En un matraz de fondo redondo desgasificado lleno con argón, se disolvieron HO-Ala-Val-alloc (149,6 mg, 0,549 mmol) y EEDQ (135,8 mg, 0,549 mmol) en una mezcla 9: 1 de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ seco (5 ml). El matraz se envolvió en papel de aluminio y la mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora antes de añadir el material de partida **15** (302 mg, 0,457 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar durante otras 40 horas a temperatura ambiente antes de separar los volátiles mediante evaporación rotativa bajo presión reducida (a la reacción le siguió CL/EM, material de partida TA 2,32 min, (ES+ 660,29 ($[M+H]^+$,100)). El producto en bruto se purificó directamente mediante una columna de cromatografía en gel de sílice (100 % de CHCl_3 a 90/10 v/v de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) para proporcionar el producto puro (**16**) con un rendimiento del 42 % (174 mg). Método 2, LC/MS (2,70 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 914,73 ($[M+H]^+$, 60), 660,43 (60), 184,31 (100)).

65 (e) (2S)-2-amino-N-((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]di-azepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-

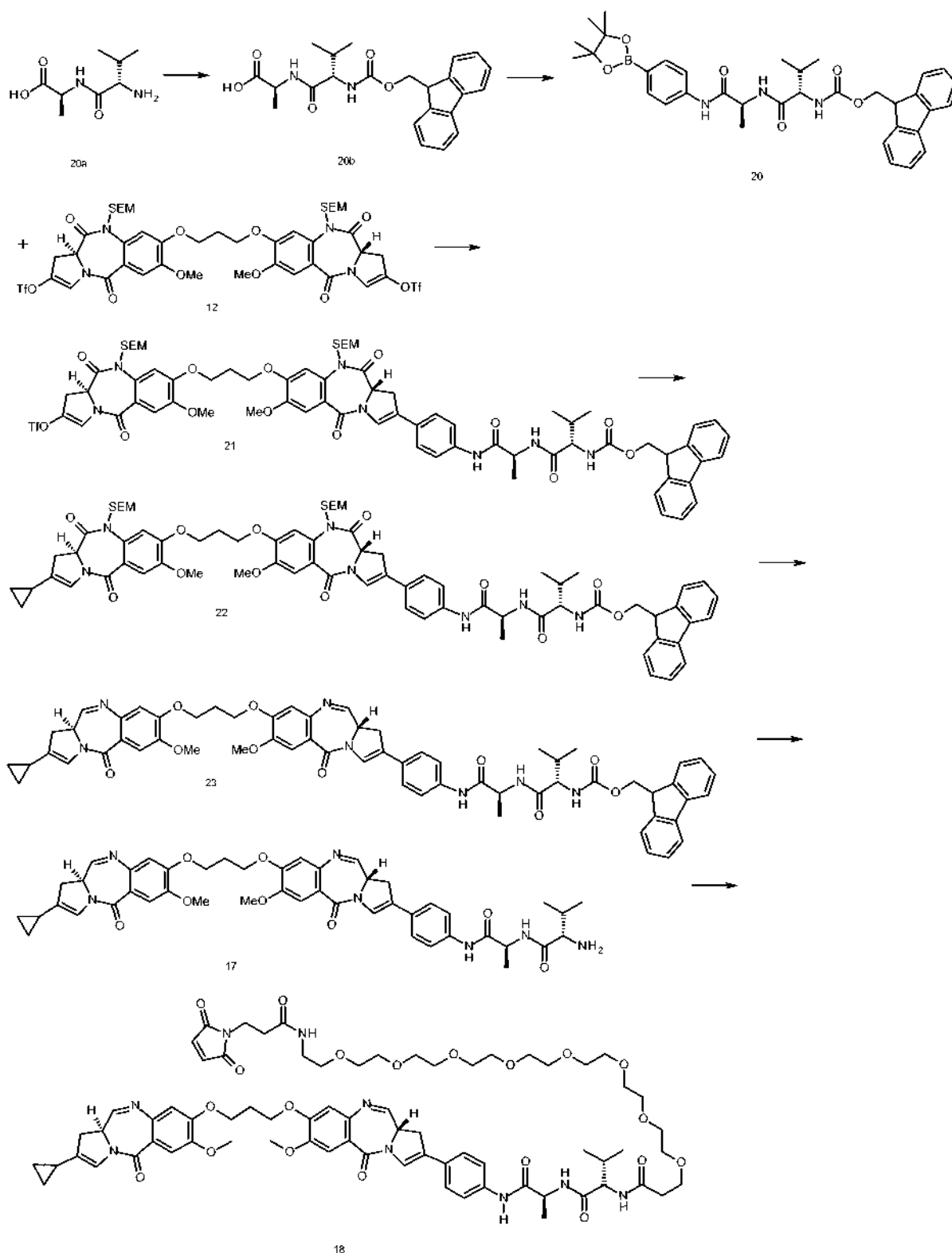
oxopropan-2-il)amino)-3-metilbutanamida (17)

El material de partida **16** (170 mg, 0,185 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (5 ml) en un matraz de fondo redondo llenado con argón, antes de añadir pirrolidina (41 µl, 0,21 mmol). El matraz se purgó/rellenó tres veces con argón antes de que se añadiera Pd(PPh₃)₄ (14 mg, 0,084 mmol) y se repitió la operación de lavado. Después de 1 hora, se observó el consumo completo de material de partida (a la reacción le siguió CL/EM) y se añadió Et₂O (50 ml) a la mezcla de reacción que se dejó agitar hasta que todo el producto se había estrellado de la solución. El sólido se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó dos veces con Et₂O (2 x 25 ml). El matraz colector se reemplazó y el sólido aislado se disolvió en CHCl₃ ((100 ml o hasta que todo el producto había pasado a través del embudo sinterizado). Los volátiles se eliminaron luego por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto bruto **17** que se usó directamente en la siguiente etapa (168 mg). Método 2, LC/MS (2,70 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 830,27 ([M+H]⁺, 50), 660,13 (80), 171,15 (100)).

(f) *N-((R)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-amida (18)*

El material de partida **17** (154 mg, 0,185 mmol) y EDCI.HCl (110 mg, 0,185 mmol) se solubilizaron en CH₂Cl₂ seco (5 ml) en un matraz de fondo redondo purgado y se llenó con argón. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora antes de añadir PEG8-maleimida (35,6 mg, 0,185 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas más (o hasta que la reacción se completó, controlada mediante CL/EM). La solución de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml) y las fases orgánicas se lavaron con H₂O (50 ml) y salmuera (50 ml) antes de secar con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se separó por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto bruto. La purificación en cromatografía en columna de gel de sílice (100 % de CHCl₃ a 85/15 v/v de CHCl₃/MeOH) dio el producto deseado (135 mg), pero se observaron vestigios restantes de PEG₈-maleimida sin reaccionar (por CL/EM, 2,21 min, método 2). La cromatografía de gel de sílice de fase inversa (H₂O/CH₃CN) (ver información general sobre las condiciones) eliminó exitosamente la impureza, dando el producto final puro (**18**, 37 mg de producto puro a partir de 110 mg, 33 %). Rendimiento total = 17 %. Método 2, LC/MS (2,58 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1404,03 ([M+H]⁺, 20), 702,63 (100)). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 8,7 Hz, 1 H), 7,54 -7,50 (m, 2H), 7,45 (s, 1 H), 7,39 -7,31 (m, 2H), 6,87 (d, *J* = 10,5 Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,72 -6,68 (m, 2H), 4,74 -4,62 (m, 1H), 4,45 -4,17 (m, 7H), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,67 -3,58 (m, 34H), 3,54 (m, 2H), 3,42 (dd, *J* = 10,2, 5,2 Hz, 2H), 3,16 -3,07 (m, 1H), 2,92 (dd, *J* = 16,1,4,1 Hz, 1H), 2,62 -2,49 (m, 4H), 2,48 -2,39 (m, 2H), 2,37 -2,25 (m, 1H), 1,92 (s, 1H), 1,52 -1,44 (m, 3H), 1,10 -0,93 (m, 6H), 0,79 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), 0,57 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), NH no se observaron.

Ejemplo 2



(a) Ácido (R)-2-((R)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido) propanoico (**20b**)

- 5 Se disolvieron HO-Ala-Val-H **20a** (350 mg, 1,86 mmol) y Na₂CO₃ (493 mg, 4,65 mmol) en H₂O destilada (15 ml) y la mezcla se enfrió a 0 °C antes de añadir dioxano (15 ml) (precipitación parcial de la sal de aminoácido). Se añadió gota a gota una solución de Fmoc-Cl (504 mg, 1,95 mmol) en dioxano (15 ml) con agitación vigorosa durante 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 2 horas antes de retirar el baño de hielo y se mantuvo la agitación durante 16 horas. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida y el residuo se disolvió en agua (150 ml). El pH se ajustó de 9 a 2 con HCl 1 N y la capa acuosa se extrajo posteriormente con
- 10

EtOAc (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron con MgSO₄, se filtraron y se eliminaron los volátiles por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar HO-Ala-Val-Fmoc **20b** (746 mg, 97 % de rendimiento). LC/MS 2.85 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 410,60; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (d, J=7,77 Hz, 2H), 7,60(d, J=7,77 Hz, 2H), 7,43(d, J=7,5 Hz, 2H), 7,34 (d, J=7,5 Hz, 2H), 6,30 (bs, 1H), 5,30 (bs, 1H), 4,71-7,56 (m, 1H), 4,54-4,36 (m, 2H), 4,08-3,91 (m, 1H), 2,21-2,07 (m, 1H), 1,50 (d, J=7,1 Hz, 3H), 1,06-0,90 (m, 6H).

(b) (9H-fluoren-9-il)metil ((S)-3-metil-1-oxo-1-(((S)-1-oxo-1-((4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)amino)propan-2-il)amino)butan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**20**)

Se añadió éster de pinacol de ácido 4 -aminofenilborónico (146,9 mg, 0,67 mmol) a una solución HO-Ala-Val-Fmoc **20b** (330 mg, 0,8 mmol), DCC (166 mg, 0,8 mmol) y DMAP (5 mg, cat.) en DCM seco (8 ml) previamente agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente en un matraz enjuagado con argón. Después, la mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. A la reacción le siguió LCMS y TLC. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y las capas orgánicas se lavaron con H₂O y salmuera antes de secarse con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto bruto se cargó en seco sobre una columna de cromatografía de gel de sílice (Hexano/EtOAc, 6: 4) y el producto **20** puro se aisló como un sólido blanco con un rendimiento del 8 8 % (360 mg).

(c) Trifluorometanesulfonato de 8-(3-((2-(4-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)fenil)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-ilo (**21**)

Se disolvieron bis-triflato **12** (2,03 g, 1,81 mmol), éster de pinacol borónico (1 g, 1,63 mmol) y Na₂CO₃ ((881 mg, 8,31 mmol) en una mezcla de tolueno/MeOH/H₂O, 2:1:1 (40 ml). El matraz de reacción se purgó y se llenó con argón tres veces antes de añadir 41 mg (0,035 mmoles) de tetrafa (trifenilfosfina) paladio (0) y la mezcla de reacción se calentó a 30 °C durante la noche. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se suspendió en H₂O (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron con MgSO₄, se filtraron y se eliminaron los volátiles por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante columna de cromatografía en gel de sílice (Hexano/EtOAc, 8: 2 a 25:75) para dar **21** puro con un rendimiento del 33 % (885 mg). LC/MS 3,85 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1452,90; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,78 -7,16 (m, 17H), 7,13 (s, 1H), 6,51 -6,24 (m, 1 H), 5,51 (dd, J = 10,0, 5,1 Hz, 2H), 5,36 -5,11 (m, 1H), 4,74 (dd, J = 10,1,4,4 Hz, 2H), 4,70 -4,53 (m, 2H), 4,47 (d, J = 6,4 Hz, 1 H), 4,37 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,27 (m, 4H), 4,20 -4,14 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,77 (ddd, J = 16,7, 9,0, 6,4 Hz, 3H), 3,71 -3,61 (m, 2H), 3,24 -2,91 (m, 3H), 2,55 -2,33 (m, 2H), 2,22 -2,07 (m, 1H), 1,52 -1,37 (m, 3H), 1,04 -0,86 (m, 10H), 0,00 (s, 18H).

(d) (9H-fluoren-9-il)metil((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (**22**)

Se añadió trifenilarsina (42 mg, 0,137 mmol) a una mezcla de PBF-triflato **21** (250 mg, 0,172 mmol), ácido ciclopropilborónico (73,9 mg, 0,86 mmol), óxido de plata (159 mg, 0,688 mmol) y fosfato de potasio tribásico (438 mg, 2,06 mmol) en dioxano seco (10 ml) en atmósfera de argón. La reacción se purgó con argón 3 veces y se añadió cloruro de bis (benzonitrilo) paladio (N) (13,2 mg, 0,034 mmol). La reacción se purgó con argón 3 veces más antes de calentarse a 75 °C y se agitó durante 10 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través de una lámina de celite, que después se aclaró con acetato de etilo. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía rápida en columna (gel de sílice, metanol al 1 %/cloroformo). Se recogieron las fracciones puras y se combinaron, y el eluyente en exceso se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida para producir el producto **22** deseado (132 mg, 50 % de rendimiento). LC/MS 3,83 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1345,91; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,88 -7,14 (m, 17H), 6,69 (s, 1H), 6,45 -6,25 (m, 1H), 5,57 -5,41 (m, 2H), 5,34 -5,14 (m, 1H), 4,78 -4,67 (m, 2H), 4,62 -4,55 (m, 1H), 4,50 -4,45 (m, 2H), 4,51 -4,44 (m, 1 H), 4,31 -4,21 (m, 4H), 4,16 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 3,82 -3,71 (m, 2H), 3,66 (m, 3H), 3,40 -3,28 (m, 1H), 3,07 (m, 1H), 2,70 -2,57 (m, 1H), 2,47 -2,36 (m, 2H), 2,15 (m, 1 H), 1,51 -1,40 (m, 3H), 1,03 -0,87 (m, 11H), 0,77 -0,71 (m, 2H), 0,60 -0,54 (m, 2H), 0,00 (t, J = 3,0 Hz, 18H).

(e) (9H-fluoren-9-il)metil((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)phenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (**23**)

Se añadió gota a gota una solución de Super-Hydride® (0,5 ml, 1M en THF) a una solución de SEM dilactama **22** (265 mg g, 0,19 mmol) en THF (10 ml) a -78° C en atmósfera de argón. La adición se completó durante 5 minutos con el fin de mantener constante la temperatura interna de la mezcla de reacción. Después de 20 minutos, se extinguió una alícuota con agua para análisis de CL/EM, lo que reveló que la reacción estaba completa. Se añadió agua (20 ml) a la mezcla de reacción y se retiró el baño frío. La capa orgánica se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml) y los

extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto bruto se disolvió en MeOH (12 ml), CH₂Cl₂ (6 ml) y agua (2 ml) y se añadió suficiente gel de sílice para formar una suspensión espesa en agitación. Después de 5 días, la suspensión se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (200 ml) hasta que se hubo completado la elución del producto. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 70 ml), se secó con MgSO₄, se filtró y se eliminó el disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (100 % CHCl₃ a 96 % de CHCl₃/ 4 % de MeOH) proporcionó el producto **23** en forma de un sólido amarillo (162 mg, 78 %). LC/MS 3,02 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1052,37.

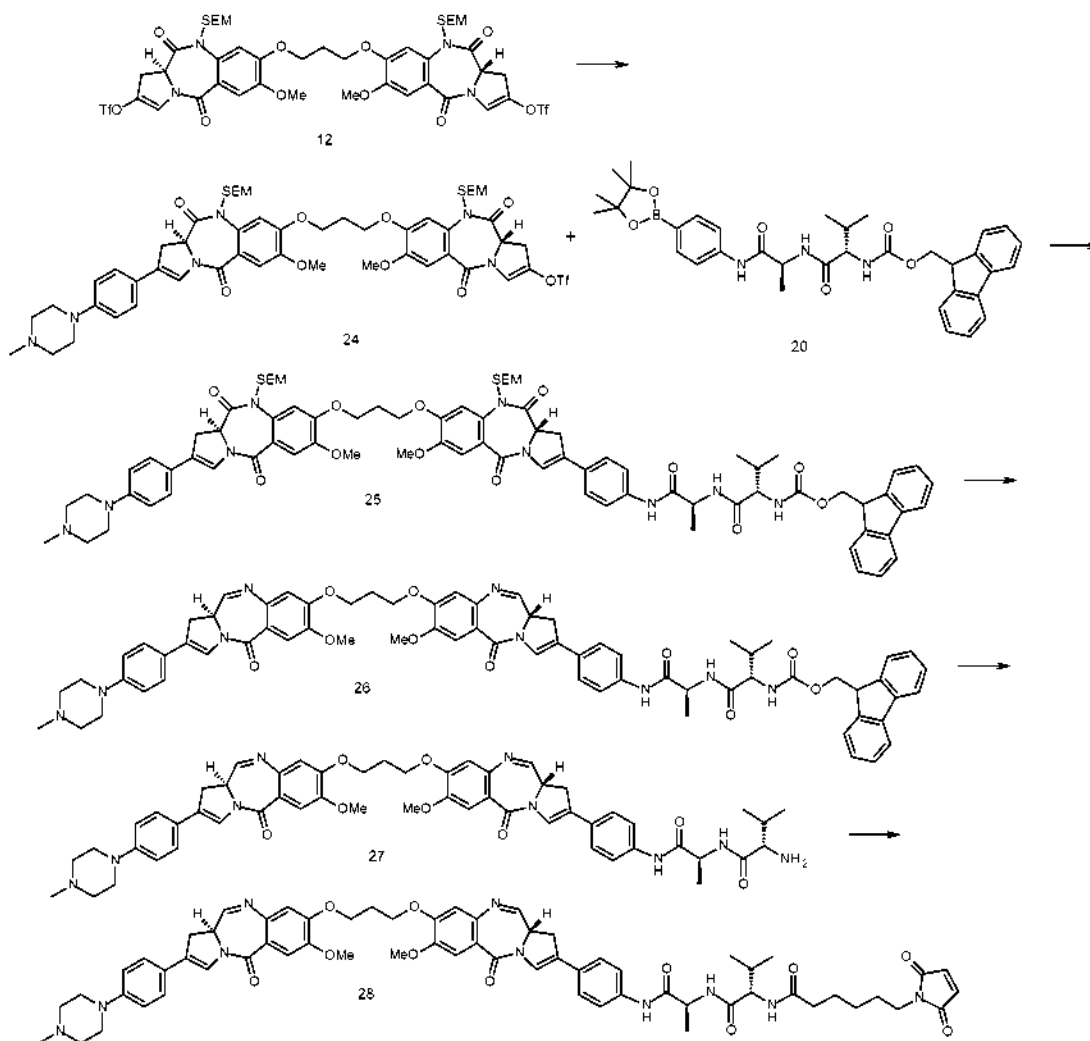
10 (f) (2S)-2-amino-N-((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metilbutanamida (**17**)

15 Se añadió piperidina en exceso (0,2 ml, 2 mmol) a una solución de SEM-dilactama **23** (76 mg, 0,073 mmol) en DMF (1 ml). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, momento en el que la reacción había terminado (según se observó mediante CL/EM). La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (75 ml) y la fase orgánica se lavó con H₂O (3x75 ml) hasta la eliminación completa de piperidina. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se eliminó el exceso de disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida para producir el producto bruto **17** que se usó como tal en la siguiente etapa. LC/MS 2,32 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 830,00.

20 (g) N-((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaohaheptacosan-27-amida (**18**)

25 Se añadió clorhidrato de EDCI (14 mg, 0,0732 mmol) a una suspensión de maleimida-PEG₈-ácido (43,4 mg, 0,0732 mmol) en CH₂Cl₂ seco (5 ml) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir PBD **17** (60,7 mg, 0,0732 mmol). Se mantuvo la agitación hasta que se completó la reacción (normalmente 5 horas). La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y la fase orgánica se lavó con H₂O y salmuera antes de secarse con MgSO₄, se filtró y el disolvente en exceso se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía cuidadosa en gel de sílice (elución lenta comenzando con CHCl₃ al 100 % hasta CHCl₃/MeOH9:1), seguido de cromatografía de fase inversa para eliminar el ácido maleimida-PEG₈ sin reaccionar. El producto **18** se aisló en 17,6 % (21,8 mg). LC/MS 2,57 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1405,30; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,54 -7,50 (m, 2H), 7,45 (s, 1 H), 7,39 -7,31 (m, 2H), 6,87 (d, *J* = 10,5 Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,72 -6,68 (m, 2H), 4,74 -4,62 (m, 1H), 4,45 -4,17 (m, 7H), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,67 -3,58 (m, 34H), 3,54 (m, 2H), 3,42 (dd, *J* = 10,2, 5,2 Hz, 2H), 3,16 -3,07 (m, 1H), 2,92 (dd, *J* = 16,1,4,1 Hz, 1H), 2,62 -2,49 (m, 4H), 2,48 -2,39 (m, 2H), 2,37 -2,25 (m, 1 H), 1,92 (s, 1H), 1,52 -1,44 (m, 3H), 1,10 -0,93 (m, 6H), 0,79 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), 0,57 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), NH no se observaron.

40 Ejemplo 3



(a) Trifluorometanosulfonato de (S)-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-ilo (**24**)

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (20,6 mg, 0,018 mmol) a una mezcla agitada de bis-enol triflato **12** (500 mg, 0,44 mmoles), éster borónico de N-metilpiperazina (100 mg, 0,4 mmoles) Na₂CO₃ (218 mg, 2,05 mmol), MeOH (2,5 ml), tolueno (5 ml) y agua (2,5 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar a 30 °C en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas, después de lo cual se ha consumido todo el éster borónico. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad antes de que el residuo se recogiera en EtOAc (100 ml) y se lavó con H₂O (2 x 50ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: 80:20 v/v Hexano/EtOAc a 60:40 v/v Hexano/EtOAc) proporcionó el producto **24** como una espuma amarillenta (122,6 mg, 25 %).

LC/MS 3,15 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1144 ([M+ H]⁺, 20 %).

(b) ((S)-1-(((S)-1-((4-(((S)-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (**25**)

Se disolvieron PBD-triflato **24** (359 mg, 0,314 mmol), éster de pinacol borónico **20** (250 mg, 0,408 mmol) y trietilamina (0,35 ml, 2,1 mmol) en una mezcla de tolueno/MeOH/H₂O, 2:1:1 (3 ml). El vaso de microondas se purgó y se llenó con argón tres veces antes de añadir 21,7 mg (0,018 mmoles) de tetrafa (trifenilfosfina) paladio (0) y la mezcla de reacción se colocaron en el microondas a 80 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió CH₂Cl₂ (100 ml) y las capas orgánicas se lavaron con agua (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml) antes de secar con MgSO₄, se filtraron y se eliminaron los volátiles mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante columna de cromatografía en gel de sílice (CHCl₃/MeOH, 100 % a 9:1) para dar **25** puro (200 mg,

rendimiento del 43 %). LC/MS 3,27 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1478 ($[M+H]^+$, 100 %).

(c) (9H-fluoren-9-il)metil((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (**26**)

Se añadió gota a gota una solución de Super-Hydrate® (0,34 ml, 1M en THF) a una solución de SEM dilactama 25 (200 mg g, 0,135 mmol) en THF (5 ml) a -78 °C en atmósfera de argón. La adición se completó durante 5 minutos con el fin de mantener constante la temperatura interna de la mezcla de reacción. Después de 20 minutos, se extinguió una alícuota con agua para análisis de CL/EM, lo que reveló que la reacción estaba completa. Se añadió agua (20 ml) a la mezcla de reacción y se retiró el baño frío. La capa orgánica se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron con MgSO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto bruto se disolvió en MeOH (6 ml), CH₂Cl₂ (3 ml) y agua (1 ml) y se añadió suficiente gel de sílice para formar una suspensión espesa en agitación. Después de 5 días, la suspensión se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (100 ml) hasta que se hubo completado la elución del producto. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 50 ml), se secó con MgSO₄, se filtró y se eliminó el disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (100 % CHCl₃ a 96 % de CHCl₃/ 4 % de MeOH) proporcionó el producto **26** en forma de un sólido amarillo (100 mg, 63 %). LC/MS 2,67 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1186 ($[M+H]^+$, 5 %).

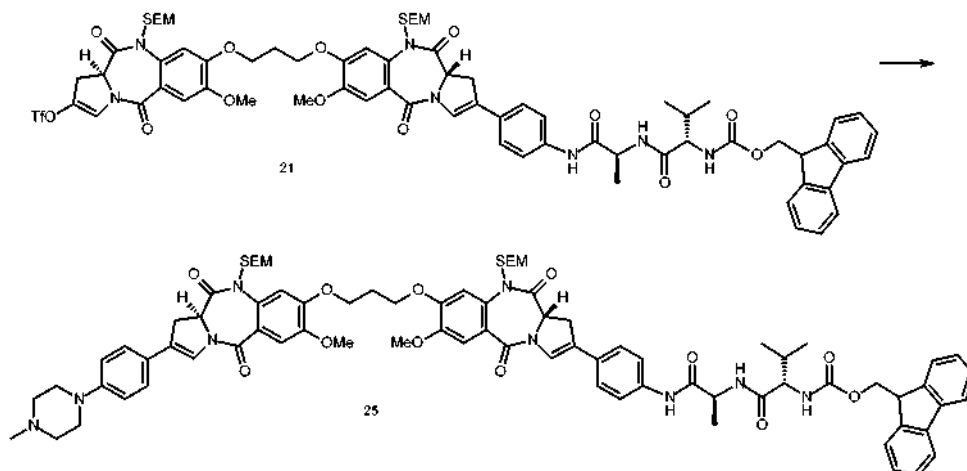
(d) (S)-2-amino-N-(((S)-1-((4-((R)-7-metoxi-8-(3-(((R)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**27**)

Se añadió piperidina en exceso (0,1 ml, 1 mmol) a una solución de PBD **26** (36,4 mg, 0,03 mmol) en DMF (0,9 ml). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos, momento en el que la reacción había terminado (según se observó mediante CL/EM). La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml) y la fase orgánica se lavó con H₂O (3 x 50 ml) hasta la eliminación completa de piperidina. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se eliminó el exceso de disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida para producir el producto bruto **27** que se usó como tal en la siguiente etapa. LC/MS 2,20 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 964 ($[M+H]^+$, 5 %).

(e) 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)oxi)propoxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (**28**)

Se añadió clorhidrato de EDCI (4,7 mg, 0,03 mmol) a una suspensión de ácido 6-maleimidohexanoico (6,5 mg, 0,03 mmol) en CH₂Cl₂ seco (3 ml) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir PBD **27** (34 mg, en bruto). Se mantuvo la agitación hasta que se completó la reacción (6 horas). La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y la fase orgánica se lavó con H₂O y salmuera antes de secarse con MgSO₄, se filtró y el disolvente en exceso se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía cuidadosa en gel de sílice (elución lenta comenzando con CHCl₃ al 100 % hasta CHCl₃/MeOH 9:1), seguido de cromatografía de fase inversa para eliminar el ácido maleimidohexanoico sin reaccionar. El producto **28** se aisló en 41 % en dos etapas (14,6 mg). LC/MS 2,40 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1157 ($[M+H]^+$, 5 %).

Ejemplo 4 Síntesis alternativa del compuesto 25

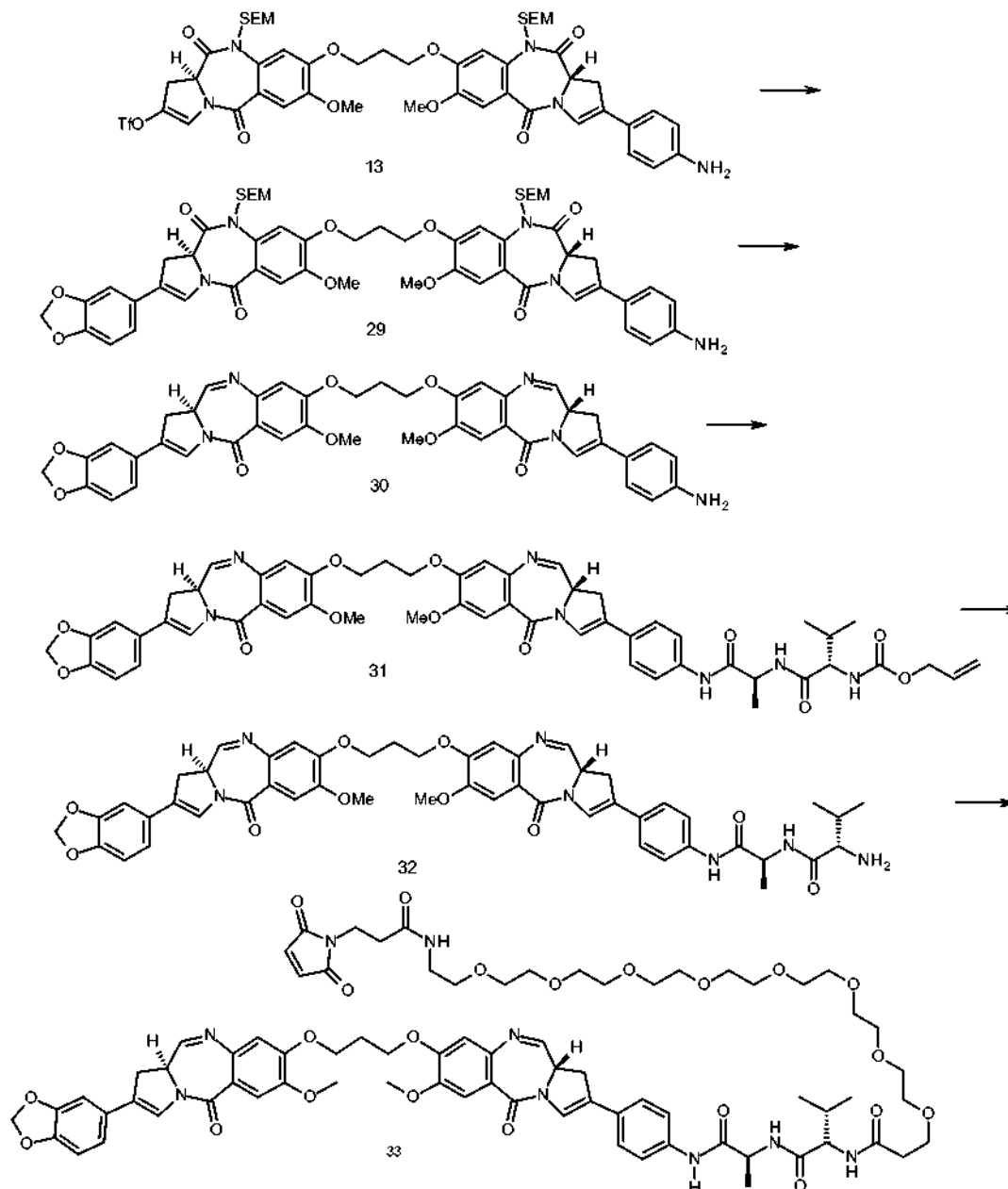


50

Se disolvieron PBD-triflato **21** (469 mg, 0,323 mmol), éster de pinacol borónico (146,5 mg, 0,484 mmol) y Na_2CO_3 (157 mg, 1,48 mmol) en una mezcla de tolueno/MeOH/ H_2O , 2:1:1 (10 ml). El matraz de reacción se purgó y se llenó con argón tres veces antes

de añadir tetraquis(trifenilfosfona)paladio (0) (7,41 mg, 0,0064 mmoles) y la mezcla de reacción se calentó a 30 °C durante la noche. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se suspendió en H_2O (500 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron con MgSO_4 , se filtraron y se eliminaron los volátiles por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (CHCl_3 100 % a $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95 %:5 %) para dar **25** puro con un rendimiento del 33 % (885 mg). LC/MS 3,27 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1478 ($[M+H]^+$, 100 %).

Ejemplo 5



- 15 (a) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5,11(10H,11aH)-diona (**29**)

20 Se disolvieron ácido 3,4-(metilendioxi)fenil borónico (356 mg, 2,1 mmol, 1,3 equivalentes), TEA (1,8 ml, 12,9 mmol, 8 equ.) y triflato/anilina **13** (1,75 g, 1,7 mmol, 1 eq.) en una mezcla de etanol (7 ml), tolueno (13 ml) y agua (2 ml) en una atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se evacuó y se lavó con Ar 3 veces, antes de la adición de tetrakis

(trifenilfosfina) paladio (0) (114 mg, 0,1 mmol, 0,06 equiv.). El matraz se evacuó de nuevo y se lavó con Ar 3 veces y se calentó en un microondas a 80 °C durante 8 minutos con 30 segundos de tiempo de preagitación. El análisis mediante TLC (acetato de etilo/hexano 80:20 v/v) indicó un consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (50 ml) y se lavó con agua (50 ml). La capa orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano/acetato de etilo 60:40 a 20:80 v/v) proporcionó el producto **29** en forma de un sólido amarillo (1,21 g, 71 %). LC/MS 3,92 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1032,44 ($[M+H]^+$, 100).

(b) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-1H-pirrol-2,1-c[1,4]benzodiazepin-5(11aH)-ona (**30**)

Se disolvió SEM dilactam **29** (0,25 g, 0,24 mmol, 1 equiv.) en THF (8 ml) y se enfrió a -78 °C en atmósfera de argón. Se añadió gota a gota solución Super-Hydride® (0,6 ml, 1 M en THF, 2,5 equiv.) durante 5 minutos mientras se monitorizaba la temperatura. Tras 20 minutos se extrajo una muestra pequeña y se procesó para análisis LCMS. Se añadió agua (50 ml), el baño frío se retiró y la solución se lavó con acetato de etilo (50 ml). La capa orgánica se extrajo y se lavó con salmuera (60 x 70 ml), se secó con MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó al vacío. El producto bruto se disolvió en EtOH (15 ml), CH₂Cl₂ (7.5 ml) y agua (2,5 ml) y se añadió suficiente gel de sílice hasta obtener una suspensión espesa. Después de 5 días de agitación, se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (100 ml) hasta que el producto dejó de eluir. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 50 ml), se secó con MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃ con un gradiente de 1 % a 4 % de MeOH) proporcionó el producto **30** en forma de un sólido amarillo (94 mg, 53 %). LC/MS (2,53 min (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 739,64 ($[M]^+$, 70).

(c) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (**31**)

En atmósfera de Ar, se agitó Alanina-Valina-Alloc (180 mg, 0,66 mmol, 1,2 equiv.) con EEDQ (163 mg, 0,66 mmol, 1,2 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (21 ml) y metanol (1 ml) durante 1 hora. El PBD **30** (407 mg, 0,55 mmol, 1 equiv.) se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (21 ml) y metanol (1 ml) y se añadió a la reacción. La CL/EM después de 5 días de agitación a temperatura ambiente mostró la formación del producto mayoritario. El disolvente se eliminó al vacío antes de purificar mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂ con gradiente de MeOH al 1 % a 6 %) para dar el producto **31** como un sólido amarillo (184 mg, 34 %). LC/MS (2,95 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 994,95 ($[M+H]^+$, 60).

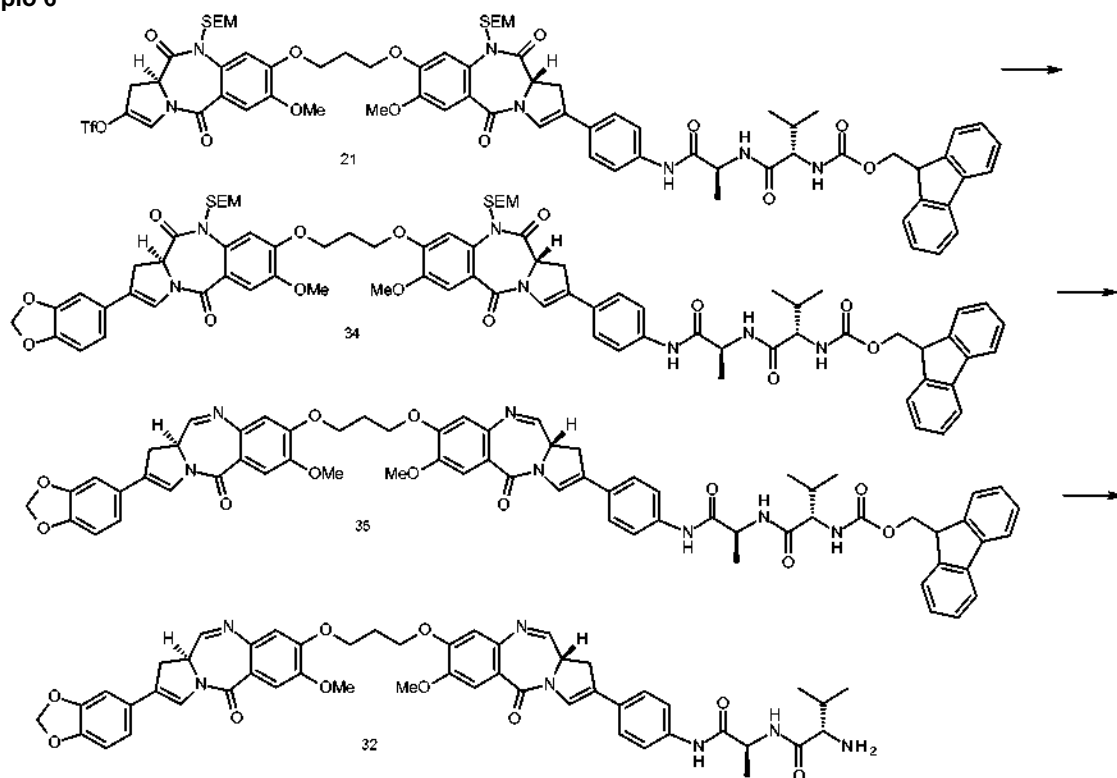
(d) (S)-2-Amino-N-((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (**32**)

Se disolvió la imina **31** (100 mg, 0,1 mmol, 1 equiv.) en DCM anhidro (10 ml) (con la ayuda de una gota de metanol para ayudar a la disolución) en atmósfera de Ar. Se añadió pirrolidina (30 µl, 0,15 mmol, 1,5 equiv.) gota a gota antes de evacuar el matraz y se aclaró con Ar tres veces. Se añadió Pd(PPh₃)₄ (7 mg, 6 µmol, 0,06 equiv.) y el matraz se evacuó y se aclaró con Ar tres veces. El análisis CL/EM después de 1 hora indicó la formación del producto y la pérdida completa del material de partida. Se añadió Et₂O (60 ml) a la mezcla de reacción y se dejó agitar hasta que todo el producto había precipitado en la solución. El precipitado se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó dos veces con Et₂O (2 x 20 ml). Se reemplazó el matraz de recogida y el sólido aislado se disolvió y se lavó a través del sinterizado con CHCl₃ (100 ml). El disolvente se eliminó al vacío para proporcionar el producto bruto **32** como un sólido amarillo que se usó directamente en la siguiente etapa. LC/MS (1,14 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 910,40 ($[M+H]^+$, 67).

(e) N-((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-amida (**33**)

Se disolvió la imina **32** (92 mg, 0,1 mmol, 1,1 equiv.) en CHCl₃ (6 ml) con una gota de MeOH anhidro para ayudar a la disolución. Se añadió maleimida-PEG₈-ácido (53 mg, 0,09 mmol, 1 equiv.) seguido de EEDQ (33 mg, 0,14 mmol, 1,5 equiv.). Se dejó agitar enérgicamente a temperatura ambiente en Ar durante 4 días hasta que el análisis CL/EM mostró una formación de producto mayoritario. El disolvente se eliminó al vacío y el producto bruto se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃ con gradiente de MeOH al 1 % a 10 %), lo que dio **33** (81 mg). El material se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa, dando **33** en forma de un sólido amarillo (26,3 mg, 18 %). Ciclo rápido con fórmico: LC/MS (1,39 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 1485,00 ($[M+H]^+$, 64).

Ejemplo 6



5 (a) *(9H-Fluoren-9-il)metil ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (34)*

10 Se disolvieron el triflato **21** (0,5 g, 0,35 mmol, 1 equiv.), ácido 3,4-(metilendioxi)fenilborónico (75 mg, 0,45 mmol, 1,3 equiv) Na_2CO_3 (0,17 g, 1,6 mmol, 4,5 equiv.) en tolueno (11 ml), EtOH (5,5 ml) y agua (5,5 ml) en atmósfera de Ar. El matraz se evacuó y se aclaró con Ar tres veces. Se añadió $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (24 mg, 0,02 mmol, 0,06 equiv.) y el matraz se evacuó de nuevo y se aclaró con Ar tres veces. Esto se calentó a 30 °C y se dejó agitando durante una noche. El análisis mediante CL/EM mostró pérdida completa del material de partida. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se disolvió en agua (60 ml) antes de lavar con acetato de etilo (60 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron con MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se eliminó al vacío. La purificación mediante cromatografía en columna (Hexano/acetato de etilo 50:50 a 25:75 v/v) proporcionó el producto **34** en forma de un sólido amarillo (310 mg, 64 %). LC/MS 1,44 min (ES) m/z (intensidad relativa) 1423,35 ($[M-H]^-$, 79).

20 (b) *(9H-Fluoren-9-il)metil ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (35)*

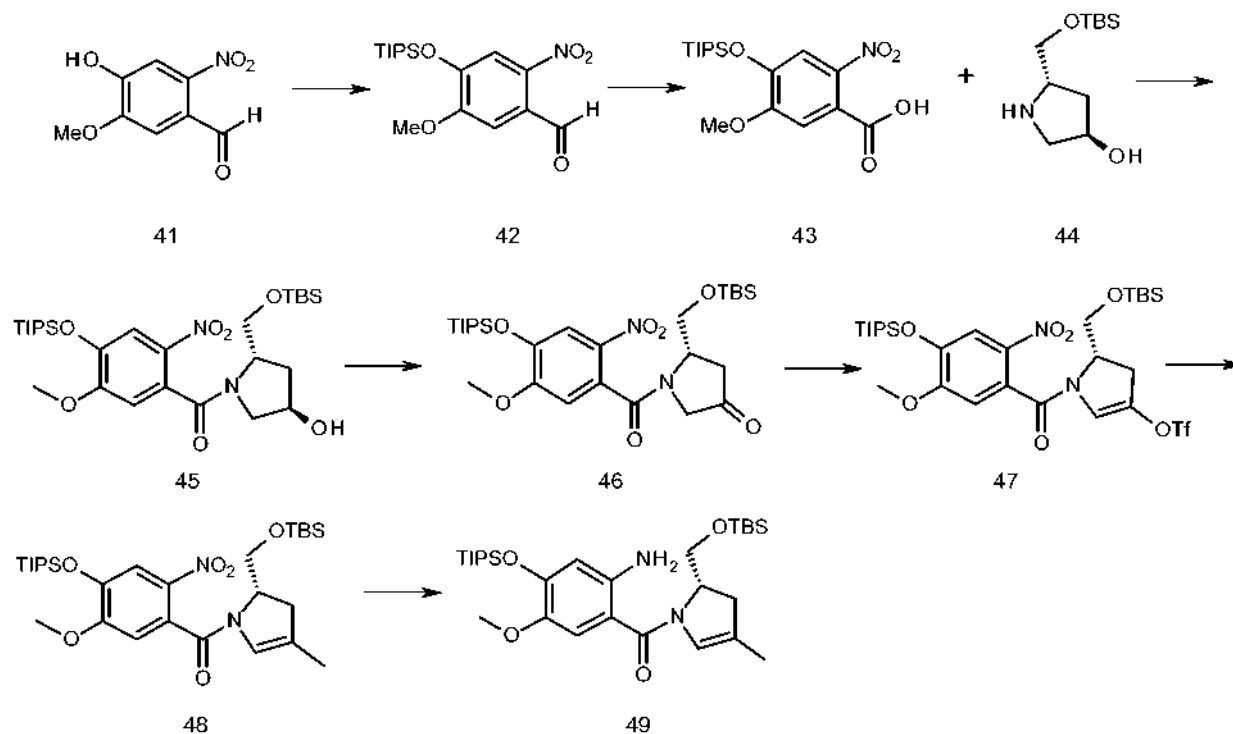
25 Se disolvió SEM dilactam **34** (0,31 g, 0,22 mmol, 1 equiv.) en THF (10 ml) y se enfrió a -78 °C en atmósfera de argón. Se añadió gota a gota solución Super-Hydrate® (0,5 ml, 1 M en THF, 2,5 equiv.) durante 5 minutos mientras se monitorizaba la temperatura. Tras 30 minutos se extrajo una muestra pequeña y se procesó para análisis LC/MS. Se añadió agua (50 ml), el baño frío se retiró y la solución se lavó con acetato de etilo (50 ml). La capa orgánica se extrajo y se lavó con salmuera (60 x 70 ml), se secó con MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó al vacío. El producto bruto se disolvió en EtOH (13,2 ml), CH_2Cl_2 (6,6 ml) y agua (2,2 ml) y se añadió suficiente gel de sílice hasta obtener una suspensión espesa. Después de 5 días de agitación, se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) (100 ml) hasta que el producto dejó de eluir. La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 50 ml), se secó con MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl_3 con un gradiente de 1 % a 4 % de MeOH) proporcionó el producto puro **35** en forma de un sólido amarillo (185 mg, 75 %). LC/MS (1,70 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1132,85 ($[M+H]^+$, 60).

35 (c) *(S)-2-Amino-N-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrololo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (32)*

Se disolvió la imina **35** (82 mg, 0,07 mmol, 1 equiv.) en DMF (1 ml) antes de añadir lentamente piperidina (0,2 ml, 2 mmol, exceso). Se dejó agitar esta solución a temperatura ambiente durante 20 minutos hasta que el análisis CL/EM mostró un consumo completo de material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml), se lavó con agua (50 ml x 4), se secó con MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó al vacío. El producto **33** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC/MS 1,15 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 910,60 ([*M*+H]⁺, 58).

Ejemplo 7

(i) (S)-(2-amino-5-metoxi-4-((triosopropilsilil)oxi)fenil)(2-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona (**49**)



(a) 5-metoxi-2-nitro-4-((triosopropilsilil)oxi)benzaldehído (**42**)

Se añadió cloruro de triosopropilsililo puro (56,4 ml, 262 mmoles) a una mezcla de imidazol (48,7 g, 715,23 mmoles) y 4-hidroxi-5-metoxi-2-nitrobenzaldehído **41** (47 g, 238 mmoles) (molidos juntos). La mezcla se calentó hasta que el fenol e imidazol se fundieron y se disolvieron (100 °C). La mezcla de reacción se dejó con agitación durante 15 minutos y a continuación se dejó enfriar, tras lo cual se observó que se formaba un sólido en el fondo del matraz (cloruro de imidazol). La mezcla de reacción se diluyó con 5 % de EtOAc/ hexanos y se cargó directamente sobre gel de sílice y la almohadilla se eluyó con 5 % de EtOAc/ hexanos, seguido de 10 % de EtOAc/hexanos (debido al bajo exceso, se encontró muy poco TIPSCl sin reaccionar en el producto). El producto deseado se eluyó con 5 % de acetato de etilo en hexano. El exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida, seguido de secado bajo alto vacío proporcionando un sólido cristalino sensible a la luz (74,4 g, 88 %). Pureza satisfactoria por EM/CL (4,22 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 353,88 ([*M*+H]⁺, 100)); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10,43 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,40 (s, 1 H), 3,96 (s, 3H), 1,35-1,24 (m, 3H), 1,10 (m, 18H).

(b) ácido 5-metoxi-2-nitro-4-((triosopropilsilil)oxi)benzoico (**43**)

Una solución de clorito de sodio (47,3 g, 523 mmoles, calidad técnica al 80 %) y dihidrogenofosfato de sodio monobásico (35,2 g, 293 mmoles) (NaH₂PO₄) en agua (800 ml) se añadió a una solución del compuesto **2** (74 g, 209 mmoles) en tetrahidrofurano (500 ml) a temperatura ambiente. Inmediatamente se añadió peróxido de hidrógeno (60 % de peso/peso, 140 ml, 2,93 moles) a la mezcla bifásica vigorosamente agitada. La mezcla de reacción desprendió gas (oxígeno), se disolvió el material de partida y la temperatura de la mezcla de reacción subió a 45 °C. Después de 30 minutos, la EM/CL reveló que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió ácido clorhídrico (1 M) para reducir el pH a 3 (esta etapa se encontró innecesaria en muchos casos, ya que el pH al final de la reacción es casi ácido; por favor, comprobar el pH antes de la extracción). A continuación, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (1 l) y las fases orgánicas se lavaron con salmuera (2 x 100 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio. La fase orgánica se filtró y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida proporcionando el producto **43** con rendimiento

cuantitativo como un sólido amarillo. EM/CL (3,93 min (ES-) m/z (intensidad relativa) 367,74 ($[M - H]^-$, 100)); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 1,34 -1,22 (m, 3H), 1,10 (m, 18H).

(c) *((2S,4R)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-hidroxi-pirrolidin-1-il)(5-metoxi-2-nitro-4-((triisopropilsilil)oxi)fenil)metanona (45)*

Se añadió DCC (29,2 g, 141 mmoles, 1,2 eq) a una solución del ácido **3** (43,5 g, 117,8 mmoles, 1 eq) e hidroxibenzotriazol hidratado (19,8 g, 129,6 mmoles, 1,1 eq) en diclorometano (200 ml) a 0 °C. Se retiró el baño frío y la reacción se dejó avanzar durante 30 min a temperatura ambiente, momento en el que se añadió rápidamente una solución de (2S,4R)-2-*t*-butildimetilsililoximetil-4-hidroxi-pirrolidina **44** (30 g, 129,6 mmoles, 1,1 eq) y trietilamina (24,66 ml, 176 mmoles, 1,5 eq) en diclorometano (100 ml) a -10 °C bajo argón (a gran escala, el tiempo de adición podría acortarse enfriando la mezcla de reacción incluso adicionalmente. La mezcla de reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 40 minutos a 1 hora y se monitorizó por EM/CL y CCF (EtOAc). Los sólidos se eliminaron por filtración sobre Celite y la fase orgánica se lavó con HCl 0,1 M acuoso frío hasta que el pH se midió a 4 o 5. A continuación, la fase orgánica se lavó con agua, seguido de bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el disolvente en exceso se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente 40/60 de acetato de etilo/hexano a 80/20 de acetato de etilo/hexano). El exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando el producto puro **45** (45,5 g de producto puro, 66 %, y 17 g de producto ligeramente impuro, el 90 % en total). EM/CL 4,43 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 582,92 ($[M + H]^+$, 100); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,66 (s, 1 H), 6,74 (s, 1 H), 4,54 (s, 1H), 4,40 (s, 1 H), 4,13 (s, 1 H), 3,86 (s, 3H), 3,77 (d, $J = 9,2$ Hz, 1 H), 3,36 (dd, $J = 11,3, 4,5$ Hz, 1 H), 3,14 -3,02 (m, 1 H), 2,38 -2,28 (m, 1 H), 2,10 (ddd, $J = 13,3, 8,4, 2,2$ Hz, 1 H), 1,36 -1,19 (m, 3H), 1,15 -1,05 (m, 18H), 0,91 (s, 9H), 0,17 -0,05 (m, 6H), (presencia de rotámeros).

(d) *(S)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-1-(5-metoxi-2-nitro-4-((triisopropilsilil)oxi)benzoil)pirrolidin-3-ona (46)*

Se añadió TCCA (8,82 g, 40 mmoles, 0,7 eq) a una solución con agitación de **45** (31,7 g, 54 mmoles, 1 eq) y TEMPO (0,85 g, 5,4 mmoles, 0,1 eq) en diclorometano seco (250 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 20 minutos, momento en el que la CCF (50/50 de acetato de etilo/hexano) reveló el consumo completo de material de partida. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite y el filtrado se lavó con bicarbonato sódico saturado acuoso (100 ml), tiosulfato de sodio (9 g en 300 ml), salmuera (100 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La evaporación rotatoria a presión reducida dio el producto **46** con rendimiento cuantitativo. EM/CL 4,52 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 581,08 ($[M + H]^+$, 100); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,78 -7,60 (m, 1H), 6,85 -6,62 (m, 1H), 4,94 (dd, $J = 30,8, 7,8$ Hz, 1 H), 4,50 -4,16 (m, 1 H), 3,99 -3,82 (m, 3H), 3,80 -3,34 (m, 3H), 2,92 -2,17 (m, 2H), 1,40 -1,18 (m, 3H), 1,11 (t, $J = 6,2$ Hz, 18H), 0,97 -0,75 (m, 9H), 0,15 --0,06 (m, 6H), (presencia de rotámeros).

(e) *trifluorometanosulfonato de (S)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-1-(5-metoxi-2-nitro-4-((triisopropilsilil)oxi)benzoil)-4,5-dihidro-1H-pirrol-3-ilo (47)*

Se inyectó anhídrido trifílico (27,7 ml, 46,4 g, 165 mmoles, 3 eq) (temperatura controlada) a una suspensión vigorosamente agitada de la cetona **46** (31,9 g, 55 mmoles, 1 eq) en diclorometano seco (900 ml) en presencia de 2,6-lutidina (25,6 ml, 23,5 g, 220 mmoles, 4 eq, secada sobre tamices) a -50 °C (baño de acetona/ nieve carbónica). La mezcla de reacción se dejó con agitación durante 1,5 horas cuando la EM/CL, tras un mini-procesamiento (agua/diclorometano), reveló que la reacción se había completado. Se añadió agua a la mezcla de reacción todavía fría y la fase orgánica se separó y se lavó con bicarbonato sódico saturado, salmuera y sulfato de magnesio. La fase orgánica se filtró y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 10/90 v/v de acetato de etilo/hexano), la eliminación del exceso de eluyente proporcionó el producto **47** (37,6 g, 96 %). EM/CL, método 2, 4,32 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 712,89 ($[M + H]^+$, 100); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,71 (s, 1 H), 6,75 (s, 1 H), 6,05 (d, $J = 1,8$ Hz, 1 H), 4,78 (dd, $J = 9,8, 5,5$ Hz, 1H), 4,15 -3,75 (m, 5H), 3,17 (ddd, $J = 16,2, 10,4, 2,3$ Hz, 1H), 2,99 (ddd, $J = 16,3, 4,0, 1,6$ Hz, 1 H), 1,45 -1,19 (m, 3H), 1,15 -1,08 (m, 18H), 1,05 (s, 6H), 0,95 -0,87 (m, 9H), 0,15 -0,08 (m, 6H).

(f) *(S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)(5-metoxi-2-nitro-4-((triisopropilsilil)oxi)fenil)metanona (48)*

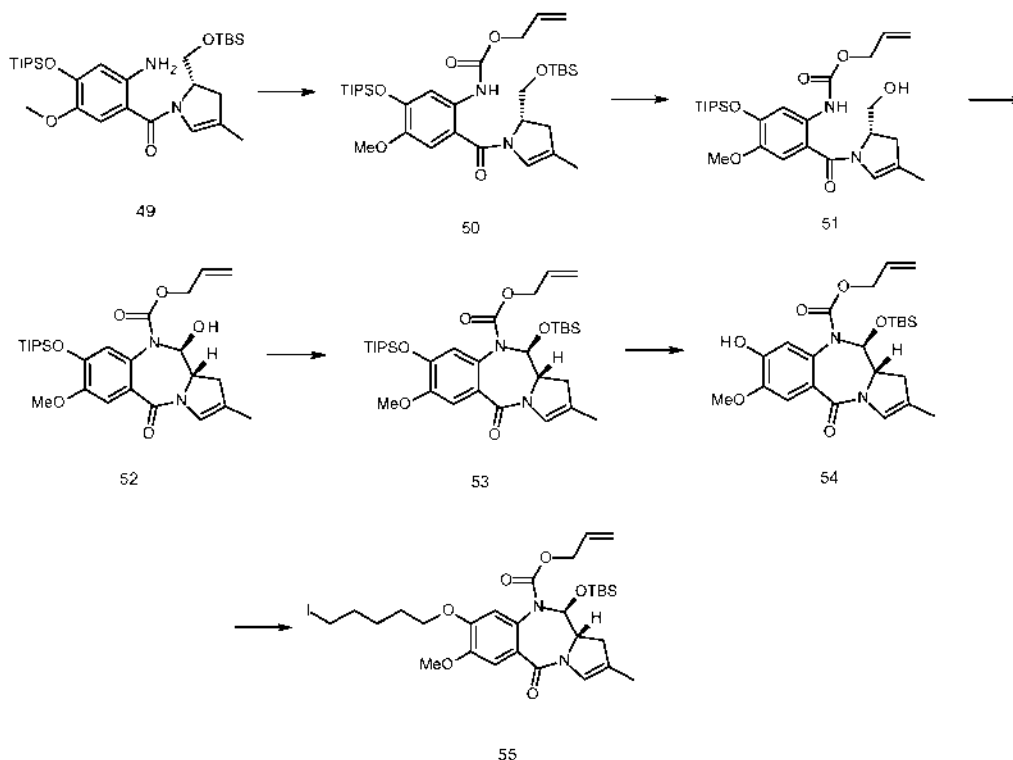
Se añadió trifenilarsina (1,71 g, 5,60 mmoles, 0,4 eq) a una mezcla de triflato **47** (10,00 g, 14 mmoles, 1 eq.), ácido metilborónico (2,94 g, 49,1 mmoles, 3,5 eq), óxido de plata (13 g, 56 mmoles, 4 eq) y fosfato de potasio tribásico (17,8 g, 84 mmoles, 6 eq) en dioxano seco (80 ml) bajo una atmósfera de argón. La reacción se lavó con argón 3 veces y se añadió cloruro de bis(benzonitrilo)paladio (II) (540 mg, 1,40 mmoles, 0,1 eq). La reacción se lavó con argón 3 veces más antes de calentarse instantáneamente a 110 °C (el bloque térmico Drysyn se calentó previamente a 110 °C antes de la adición del matraz). Después de 10 min, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de Celite. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 10 % de acetato de etilo/hexano). Se recogieron fracciones puras y se combinaron, y el exceso de eluyente se eliminó

mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando el producto **48** (4,5 g, 55 %). EM/CL, 4,27 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 579,18 ($[M + H]^+$, 100); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,70 (s, 1 H), 6,77 (s, 1 H), 5,51 (d, $J = 1,7$ Hz, 1 H), 4,77-4,59 (m, 1 H), 3,89 (s, 3H), 2,92-2,65 (m, 1H), 2,55 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H), 1,62 (d, $J = 1,1$ Hz, 3H), 1,40-1,18 (m, 3H), 1,11 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,11 (d, $J = 2,3$ Hz, 6H).

5 (g) (S)-(2-amino-5-metoxi-4-((triisopropilsilil)oxi)fenil)(2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona (**49**)

10 Se añadió polvo de cinc (28 g, 430 mmoles, 37 eq) a una solución del compuesto **48** (6,7 g, 11,58 mmoles) en 5 % de ácido fórmico en etanol v/v (70 ml) a aproximadamente 15 °C. La exotermia resultante se controló usando un baño de hielo para mantener la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 30 °C. Después de 30 minutos la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice; 10 % de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida proporcionando el producto **49** (5,1 g, 80 %). EM/CL, 4,23 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 550,21 ($[M + H]^+$, 100); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,28 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,19 (s, 1 H), 4,64-4,53 (m, $J = 4,1$ Hz, 1H), 4,17 (s, 1 H), 3,87 (s, 1 H), 3,77-3,69 (m, 1 H), 3,66 (s, 3H), 2,71-2,60 (m, 1 H), 2,53-2,43 (m, 1 H), 2,04-1,97 (m, $J = 11,9$ Hz, 1 H), 1,62 (s, 3H), 1,26-1,13 (m, 3H), 1,08-0,99 (m, 18H), 0,82 (s, 9H), 0,03--0,03 (m, $J = 6,2$ Hz, 6H).

25 (ii) 11-(((terc-butildimetilsilil)oxi)-8-((5-yodopentil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (1S,11aS)-alilo



30 (a) (2-(2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triisopropilsilil)oxi)fenil)carbamato de (S)-alilo (**50**)

35 Se añadió cloroformiato de alilo (0,30 ml, 3,00 mmoles, 1,1 eq) a una solución de amina **49** (1,5 g, 2,73 mmoles) en presencia de piridina seca (0,48 ml, 6,00 mmoles, 2,2 eq) en diclorometano seco (20 ml) a -78 °C (baño de acetona/nieve carbónica). Después de 30 minutos, se retiró el baño y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se añadió sulfato de cobre acuoso saturado. A continuación, la fase orgánica se lavó secuencialmente con bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida proporcionando el producto **50**, que se usó directamente en la siguiente reacción. EM/CL, 4,45 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 632,91 ($[M + H]^+$, 100)

(b) (2-(2-(hidroximetil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamato de (S)-alilo (**51**)

El producto en bruto **50** se disolvió en una mezcla 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetrahidrofurano/agua (28:4:4:8 ml) y se dejó con agitación a temperatura ambiente. Después de 3 horas, se observó la completa desaparición del material de partida por EM/CL. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó secuencialmente con agua (2 x 500 ml), bicarbonato sódico acuoso saturado (200 ml) y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 25 % de acetato de etilo en hexano). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida proporcionando el producto deseado **51** (1 g, 71 %). EM/CL, 3,70 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 519,13 ([M + H]⁺, 95); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,34 (s, 1 H), 7,69 (s, 1 H), 6,78 (s, 1 H), 6,15 (s, 1 H), 5,95 (ddt, *J* = 17,2, 10,5, 5,7 Hz, 1H), 5,33 (dq, *J* = 17,2, 1,5 Hz, 1H), 5,23 (ddd, *J* = 10,4, 2,6, 1,3 Hz, 1 H), 4,73 (tt, *J* = 7,8, 4,8 Hz, 1 H), 4,63 (dt, *J* = 5,7, 1,4 Hz, 2H), 4,54 (s, 1H), 3,89-3,70 (m, 5H), 2,87 (dd, *J* = 16,5, 10,5 Hz, 1 H), 2,19 (dd, *J* = 16,8, 4,6 Hz, 1 H), 1,70 (d, *J* = 1,3 Hz, 3H), 1,38-1,23 (m, 3H), 1,12 (s, 10H), 1,10 (s, 8H).

(c) 11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-((triospropilsilil)oxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (1S,11aS)-alilo (**52**)

Se añadió gota a gota sulfóxido de dimetilo (0,35 ml, 4,83 mmoles, 2,5 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (0,2 ml, 2,32 mmoles, 1,2 eq) en diclorometano seco (10 ml) a -78 °C (baño de nieve carbónica/acetona) bajo una atmósfera de argón. Después de 10 minutos se añadió lentamente una solución de **51** (1 g, 1,93 mmoles) en diclorometano seco (8 ml) con la temperatura todavía a -78 °C. Después de 15 min se añadió gota a gota trietilamina (1,35 ml, secada sobre tamices moleculares de 4A, 9,65 mmoles, 5 eq) y se retiró el baño de nieve carbónica/acetona. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se extrajo con ácido clorhídrico frío (0,1 M), bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de diclorometano se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida proporcionando el producto **52** (658 mg, 66 %). EM/CL, 3,52 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 517,14 ([M+ H]⁺, 100); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,20 (s, 1H), 6,75-6,63 (m, *J* = 8,8, 4,0 Hz, 2H), 5,89-5,64 (m, *J* = 9,6, 4,1 Hz, 2H), 5,23-5,03 (m, 2H), 4,68-4,38 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,83-3,77 (m, 1H), 3,40 (s, 1H), 3,05-2,83 (m, 1H), 2,59 (d, *J* = 17,1 Hz, 1H), 1,78 (d, *J* = 1,3 Hz, 3H), 1,33-1,16 (m, 3H), 1,09 (d, *J* = 2,2 Hz, 9H), 1,07 (d, *J* = 2,1 Hz, 9H).

(d) 11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-((triospropilsilil)oxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (1S,11aS)-alilo (**53**)

Se añadió triflato de terc-butildimetilsililo (0,70 ml, 3,00 mmoles, 3 eq) a una solución del compuesto **52** (520 mg, 1,00 mmol) y 2,6-lutidina (0,46 ml, 4,00 mmoles, 4 eq) en diclorometano seco (40 ml) a 0 °C bajo argón. Después de 10 min, se retiró el baño frío y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se extrajo con agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice; gradiente, 10 % de acetato de etilo en hexano a 20 % de acetato de etilo en hexano). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando el producto **53** (540 mg, 85 %). EM/CL, 4,42 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 653,14 ([M + Na]⁺, 100); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,20 (s, 1 H), 6,71-6,64 (m, *J* = 5,5 Hz, 2H), 5,83 (d, *J* = 9,0 Hz, 1 H), 5,80-5,68 (m, *J* = 5,9 Hz, 1H), 5,14-5,06 (m, 2H), 4,58 (dd, *J* = 13,2, 5,2 Hz, 1H), 4,36 (dd, *J* = 13,3, 5,5 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,71 (td, *J* = 10,1, 3,8 Hz, 1H), 2,91 (dd, *J* = 16,9, 10,3 Hz, 1H), 2,36 (d, *J* = 16,8 Hz, 1 H), 1,75 (s, 3H), 1,31-1,16 (m, 3H), 1,12-1,01 (m, *J* = 7,4, 2,1 Hz, 18H), 0,89-0,81 (m, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,19 (s, 3H).

(e) 11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (1S,11aS)-alilo (**54**)

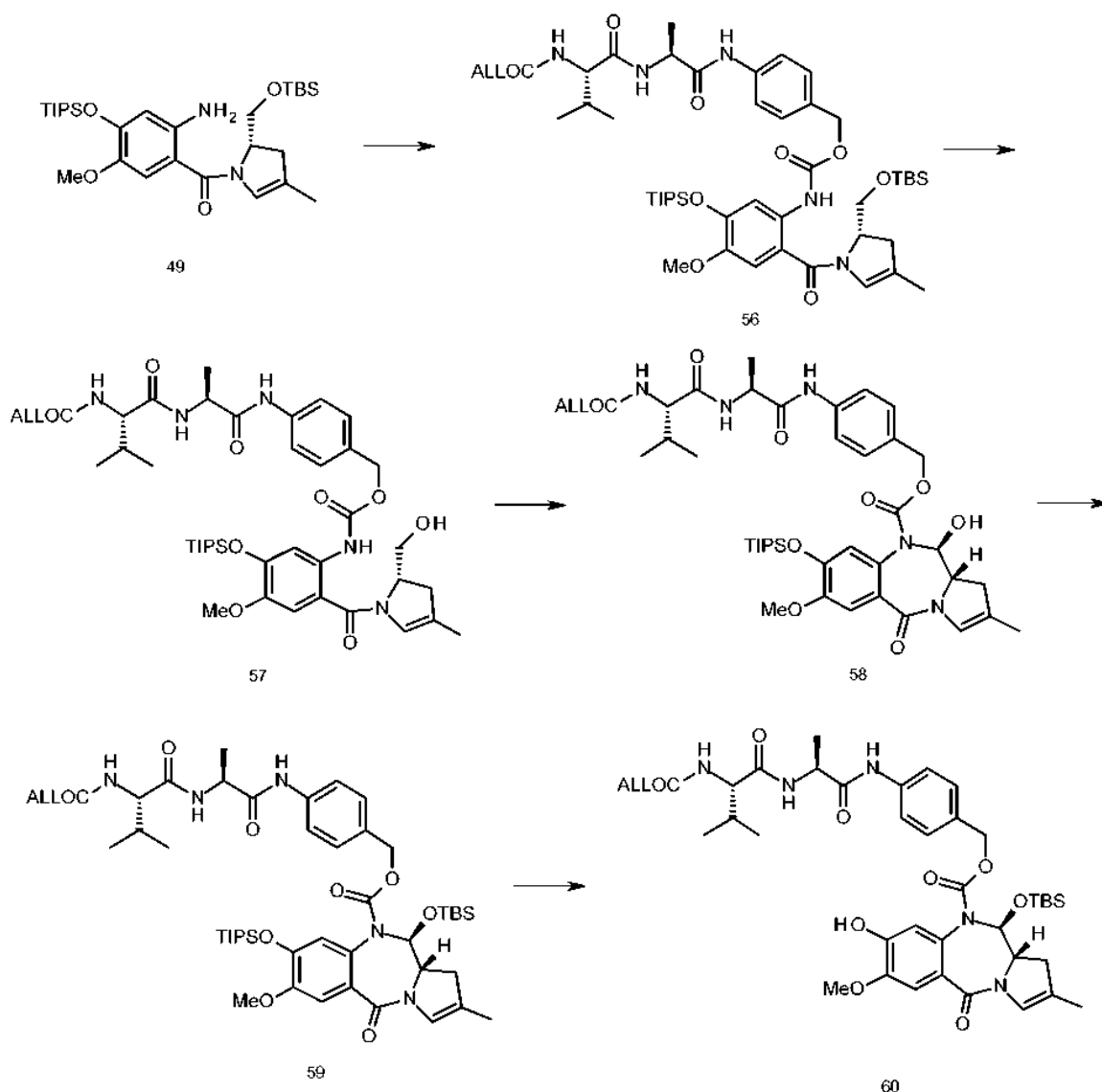
Se añadió acetato de litio (87 mg, 0,85 mmoles) a una solución del compuesto **53** (540 mg, 0,85 mmoles) en dimetilformamida húmeda (6 ml, 50:1 de DMF/agua). Después de 4 horas, la reacción se había completado y la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (25 ml) y se lavó con solución acuosa de ácido cítrico (pH ~ 3), agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice; gradiente, 25 % al 75 % de acetato de etilo en hexano). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando el producto **54** (400 mg, cuantitativo). EM/CL, (3,33 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 475,26 ([M+H]⁺, 100).

(f) 11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-8-((5-yodopentil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (1S,11aS)-alilo (**55**)

Se añadieron diyodopentano (0,63 ml, 4,21 mmoles, 5 eq) y carbonato de potasio (116 mg, 0,84 mmoles, 1 eq) a una solución del fenol **54** (400 mg, 0,84 mmoles) en acetona (4 ml, secada sobre tamices moleculares). A

continuación, la mezcla de reacción se calentó hasta 60 °C y se agitó durante 6 horas. Se eliminó la acetona mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice; 50/50, v/v, hexano/acetato de etilo). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó proporcionando **55** con el 90 % de rendimiento. EM/CL, 3,90 min (ES+) m/z (intensidad relativa)

- 5 670,91 ($[M]^+$, 100). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,23 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 6,60 (s, 1H), 5,87 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 5,83 -5,68 (m, $J = 5,6$ Hz, 1H), 5,15 -5,01 (m, 2H), 4,67 -4,58 (m, 1H), 4,45 -4,35 (m, 1H), 4,04 -3,93 (m, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,73 (td, $J = 10,0, 3,8$ Hz, 1H), 3,25 -3,14 (m, $J = 8,5, 7,0$ Hz, 2H), 2,92 (dd, $J = 16,8, 10,3$ Hz, 1H), 2,38 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 1,95 -1,81 (m, 4H), 1,77 (s, 3H), 1,64 -1,49 (m, 2H), 0,88 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,23 (s, 3H).
- 10 (iii) 11-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de ((1*S*,11*aS*)-4-(2-(1-(1-(aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encilo (**70**)



- 15 (a) 3-(2-(2-(4-(((2-((*S*)-2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((*triisopropilsilil)oxi)fenil)carbamoil)oxi)metil)fenil)hidrazinil)propanamido)-4-metil-2-oxopentanoato de alilo (**56**)*

Se añadió trietilamina (2,23 ml, 18,04 mmoles, 2,2 eq) a una solución con agitación de la amina **49** (4 g, 8,20 mmoles) y trifosgeno (778 mg, 2,95 mmoles, 0,36 eq) en tetrahidrofurano seco (40 ml) a 5 °C (baño de hielo). El progreso de la reacción del isocianato se monitorizó sacando periódicamente alícuotas de la mezcla de reacción y extinguiendo con metanol y realizando análisis de EM/CL. Una vez se había completado la formación de isocianato, se añadió rápidamente una solución de alloc-Val-Ala-PABOH (4,12 g, 12,30 mmoles, 1,5 eq) y trietilamina (1,52 ml, 12,30 mmoles, 1,5 eq) en tetrahidrofurano seco (40 ml) mediante inyección al isocianato recientemente preparado.

25 La mezcla de reacción se dejó con agitación a 40 °C durante 4 horas. Se eliminó el exceso de disolvente mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice;

gradiente, 1 % de metanol a 5 % de metanol en diclorometano) (también han sido satisfactorias condiciones alternativas de cromatografía usando EtOAc y hexano). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando el producto **56** (3,9 g, 50 %). EM/CL, 4,23 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 952,36 ($[M+H]^+$, 100); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,62 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,53 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,32 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,57 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,17 (s, 1H), 6,03-5,83 (m, 1H), 5,26 (dd, $J = 33,8, 13,5$ Hz, 3H), 5,10 (s, 2H), 4,70-4,60 (m, 2H), 4,58 (dd, $J = 5,7, 1,3$ Hz, 2H), 4,06-3,99 (m, 1H), 3,92 (s, 1H), 3,82-3,71 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,79-2,64 (m, 1H), 2,54 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), 2,16 (dq, $J = 13,5, 6,7$ Hz, 1H), 1,67 (s, 3H), 1,46 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,35-1,24 (m, 3H), 1,12 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,97 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,94 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,87 (s, 9H), 0,07--0,02 (m, 6H).

(b) 3-(2-(2-(4-(((2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamoil)oxi)metil)fenil)hidrazinil)propanamido)-4-metil-2-oxopentanoato de alilo (**57**)

Se disolvió el éter de TBS **56** (1,32 g, 1,38 mmoles) en una mezcla 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetrahidrofurano/agua (14:2:2:4 ml) y se dejó con agitación a temperatura ambiente. Después de 3 horas no se observó más material de partida por EM/CL. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (25 ml) y se lavó secuencialmente con agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 2 % de metanol en diclorometano). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida proporcionando el producto deseado **57** (920 mg, 80 %). EM/CL, 3,60 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 838,18 ($[M+H]^+$, 100). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,55 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,52 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,31 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,77 (s, 1H), 6,71 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,97-5,82 (m, $J = 5,7$ Hz, 1H), 5,41-5,15 (m, 3H), 5,10 (d, $J = 3,5$ Hz, 2H), 4,76-4,42 (m, 5H), 4,03 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 3,77 (s, 5H), 2,84 (dd, $J = 16,7, 10,4$ Hz, 1H), 2,26-2,08 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,44 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,30 (dt, $J = 14,7, 7,4$ Hz, 3H), 1,12 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,96 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,93 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H).

(c) 11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-((triospropilsilil)oxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encilo (**58**)

Se añadió gota a gota sulfóxido de dimetilo (0,2 ml, 2,75 mmoles, 2,5 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (0,11 ml, 1,32 mmoles, 1,2 eq) en diclorometano seco (7 ml) a -78 °C (baño de nieve carbónica/acetona) bajo una atmósfera de argón. Después de 10 minutos se añadió lentamente una solución de **57** (920 mg, 1,10 mmoles) en diclorometano seco (5 ml) con la temperatura todavía a -78 °C. Después de 15 min se añadió gota a gota trietilamina (0,77 ml, secada sobre tamices moleculares de 4A, 5,50 mmoles, 5 eq) y se retiró el baño de nieve carbónica/acetona. Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se extrajo con ácido clorhídrico frío (0,1 M), bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de diclorometano se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente 2 % de metanol a 5 % de metanol en diclorometano). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y la eliminación del exceso de eluyente mediante evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto **58** (550 mg, 60 %). EM/CL, 3,43 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 836,01 ($[M]^+$, 100). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,39 (s, 1H), 7,52-7,40 (m, 2H), 7,21-7,08 (m, $J = 11,5$ Hz, 2H), 6,67 (s, 1H), 6,60-6,47 (m, $J = 7,4$ Hz, 1H), 5,97-5,83 (m, 1H), 5,79-5,66 (m, 1H), 5,38-4,90 (m, 6H), 4,68-4,52 (m, $J = 18,4, 5,5$ Hz, 4H), 4,04-3,94 (m, $J = 6,5$ Hz, 1H), 3,87-3,76 (m, 5H), 3,00-2,88 (m, 1H), 2,66-2,49 (m, 2H), 2,21-2,08 (m, 2H), 1,76 (s, 3H), 1,45 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,09-0,98 (m, $J = 8,9$ Hz, 18H), 0,96 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H), 0,93 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H).

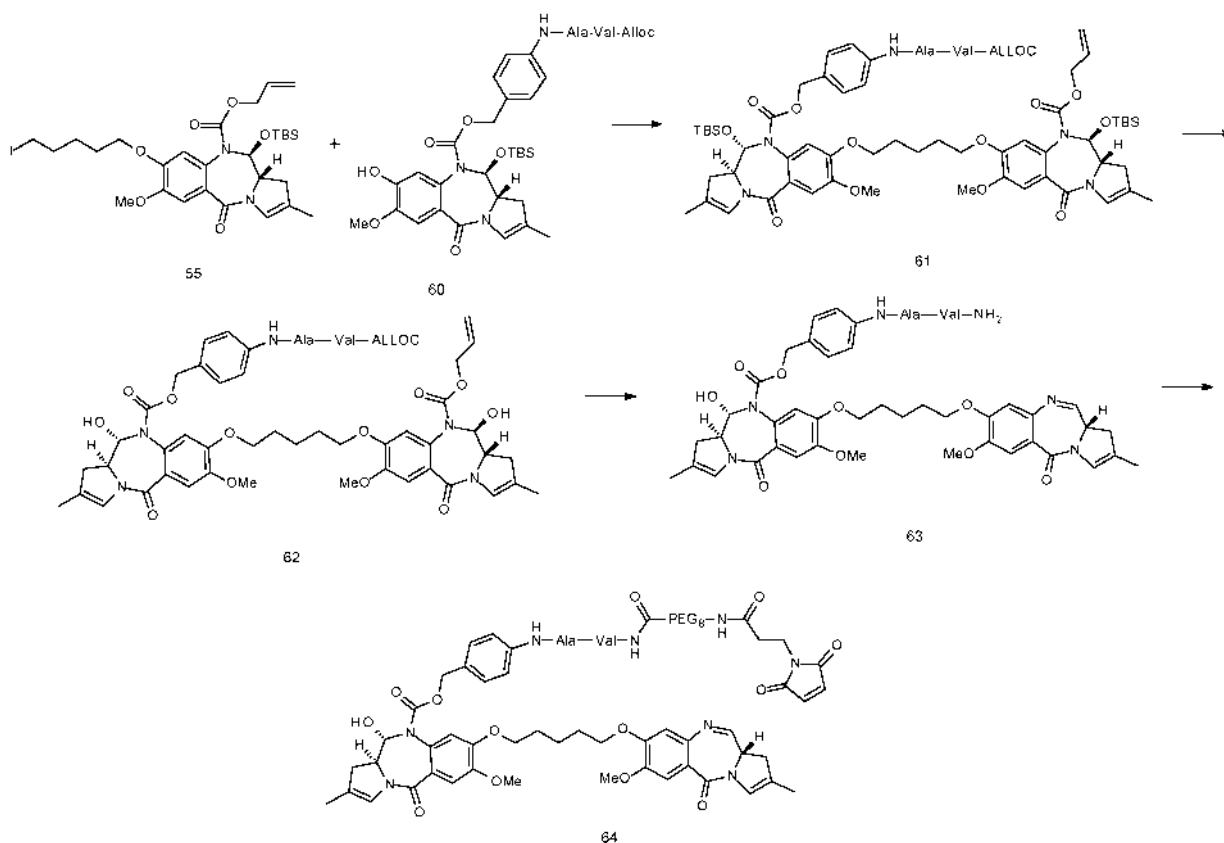
(d) 11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-((triospropilsilil)oxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)encilo (**59**)

Se añadió triflato de terc-butildimetilsililo (0,38 ml, 1,62 mmoles, 3 eq) a una solución del compuesto **58** (450 mg, 0,54 mmoles) y 2,6-lutidina (0,25 ml, 2,16 mmoles, 4 eq) en diclorometano seco (5 ml) a 0 °C bajo argón. Después de 10 min, se retiró el baño frío y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se extrajo con agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 50/50 v/v de hexano/acetato de etilo). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando el producto **59** (334 mg, 65 %). EM/CL, 4,18 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 950,50 ($[M]^+$, 100). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,53 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,44 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,08 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 6,72-6,61 (m, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,16 (s, 1H), 5,97-5,79 (m, $J = 24,4, 7,5$ Hz, 2H), 5,41-5,08 (m, 5H), 4,86 (d, $J = 12,5$ Hz, 1H), 4,69-4,60 (m, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,03 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,74 (td, $J = 9,6, 3,6$ Hz, 1H), 2,43-2,09 (m, $J = 34,8, 19,4, 11,7$ Hz, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,43 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 1,30-1,21 (m, 3H), 0,97 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H), 0,92 (t, $J = 8,4$ Hz, 3H), 0,84 (s, 9H), 0,23 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(e) 11-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11a*S*)-4-(2-(1-((1-(*alil*oxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)bencilo (**60**)

5 Se añadió acetato de litio (50 mg, 0,49 mmoles) a una solución del compuesto **59** (470 mg, 0,49 mmoles) en dimetilformamida húmeda (4 ml, 50:1 de DMF/agua). Después de 4 horas, la reacción se había completado y la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con ácido cítrico (pH ~ 3), agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente, 50/50 a 25/75 v/v de hexano/acetato de etilo). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando el producto **60** (400 mg, cuantitativo). EM/CL, 3,32 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 794,18 ([M+H]⁺, 100). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,53 (s, 1 H), 8,02 (s, 1 H), 7,44 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,08 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,72-6,61 (m, *J* = 8,9 Hz, 2H), 6,16 (s, 1H), 5,97-5,79 (m, *J* = 24,4, 7,5 Hz, 2H), 5,41-5,08 (m, 5H), 4,86 (d, *J* = 12,5 Hz, 1 H), 4,69-4,60 (m, 1H), 4,57 (s, 1 H), 4,03 (t, *J* = 6,7 Hz, 1 H), 3,87 (s, 3H), 3,74 (td, *J* = 9,6, 3,6 Hz, 1 H), 2,43-2,09 (m, *J* = 34,8, 19,4, 11,7 Hz, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,43 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 1,30-1,21 (m, 3H), 0,97 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 0,92 (t, *J* = 8,4 Hz, 3H), 0,84 (s, 9H), 0,23 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(iv) 11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-(((*S*)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11a*S*)-4-((2*S*,5*S*)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencilo (**64**)



(a) 8-((5-(((11*S*)-10-(((4-(2-(1-((1-(*alil*oxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)bencil)oxi)carbonil)-11-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*)-*alilo* (**61**)

Se añadió carbonato de potasio (70 mg, 0,504 mmoles, 1 eq) a una solución de **55** (370 mg, 0,552 mmoles, 1,2 eq) y fenol **60** (400 mg, 0,504 mmoles) en acetona seca (25 ml). La reacción se agitó 8 horas a 70 °C. La EM/CL mostró que todo el material de partida no se había consumido, de manera que la reacción se dejó con agitación durante la noche a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas adicionales al día siguiente. Se eliminó la acetona mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice; 80 % de acetato de etilo en hexano al 100 % de acetato de etilo). Se recogieron fracciones puras y se

combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando el producto **61** (385 mg, 57 %). EM/CL, 4,07 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1336,55 ($[M+H]^+$, 50).

(b) 8-((5-(((11S)-10-(((4-(2-(1-((1-(aliloxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S)-alilo (**62**)

Se añadió fluoruro de tetra-*n*-butilamonio (1 M, 0,34 ml, 0,34 mmoles, 2 eq) a una solución de **61** (230 mg, 0,172 mmoles) en tetrahidrofurano seco (3 ml). El material de partida se consumió totalmente después de 10 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (30 ml) y se lavó secuencialmente con agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de acetato de etilo se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante **62** se usó como una mezcla en bruto para la siguiente reacción. EM/CL, 2,87 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1108,11 ($[M+H]^+$; 100).

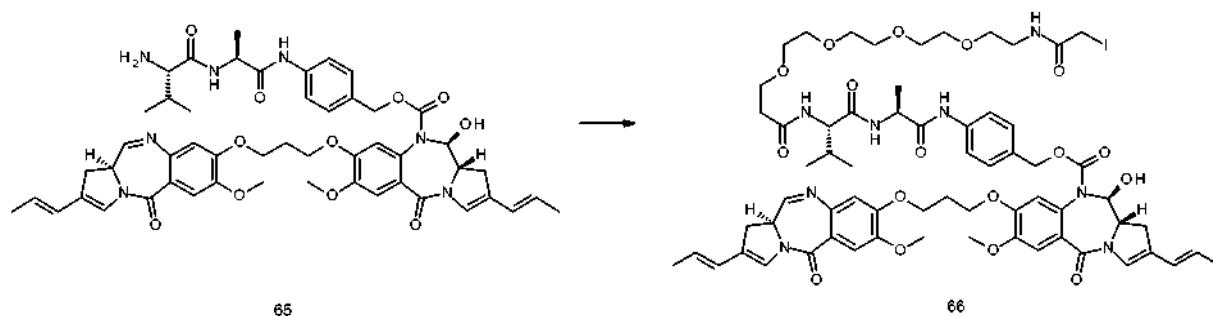
(c) 11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S)-4-(2-(1-((1-amino-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)bencilo (**63**)

Se añadió tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (12 mg, 0,01 mmoles, 0,06 eq) a una solución del producto en bruto **62** (0,172 mmoles) y pirrolidina (36 μ l, 0,43 mmoles, 2,5 eq) en diclorometano seco (10 ml). La mezcla de reacción se agitó 20 minutos y se diluyó con diclorometano y se lavó secuencialmente con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de diclorometano se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante **63** se usó como una mezcla en bruto para la siguiente reacción. EM/CL, 2,38 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 922,16 ($[M+H]^+$, 40).

(d) 11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencilo (**64**)

Se añadió 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI, 33 mg, 0,172 mmoles) a una solución del producto en bruto **63** (0,172 mmoles) y ácido Mal-(PEG)₈ (100 mg, 0,172 mmoles) en diclorometano seco (10 ml). La reacción se agitó durante 2 horas y la presencia de material de partida ya no se observó por EM/CL. La reacción se diluyó con diclorometano y se lavó secuencialmente con agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de diclorometano se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El resto resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gel de sílice; 100 % de cloroformo a 10 % de metanol en cloroformo). Se recogieron fracciones puras y se combinaron y el exceso de eluyente se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida dando **64 (E)** (60 mg, 25 % durante 3 etapas).

Ejemplo 8



El compuesto **65** es el compuesto **79** del documento WO 2011/130598

(11S)-4-(1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamid)bencil-11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato (**66**)

Se añadió N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 4,71 μ l, 0,0304 mmol) a una solución de la amina **65** (0,0276 mmol) y yodo-(PEG)₄-ácido (13,1 mg, 0,0304 mmol) en diclorometano seco (0,8 ml). La reacción se agitó durante 3 horas y la presencia de material de partida ya no se observó mediante CL/EM. La mezcla de reacción se cargó directamente sobre una placa de cromatografía en capa fina (TLC) y se purificó mediante TLC preparativa (metanol al 10 % en

cloroformo). Las bandas puras se rasparon de la placa de TLC, se suspendieron en metanol al 10 % en cloroformo, se filtraron y se eliminó el eluyente en exceso mediante evaporación rotatoria a presión reducida para dar **66** (D) (20,9 mg, 56 %). CL/EM, método 2, 3,08 min (ES +) m/z (intensidad relativa) 1361,16 ($[M+H]^+$, 100).

5 Métodos experimentales generales para el Ejemplo 9

Los datos de LCMS se obtuvieron usando una CL/EM de la serie Agilent 1200 con una MS de cuadrupolo Agilent 6110, con ionización por electropulverización. Fase móvil A -0,1 % de ácido acético en agua. Fase móvil B -0,1 % en acetonitrilo. Caudal de 1,00 ml/min. Gradiente de 5 % de B hasta 95 % de B durante 3 minutos, permaneciendo a 95 % de B durante 1 minuto y, después, a 5 % de B durante 6 segundos. El tiempo total de ejecución es de 5 minutos. Columna: Phenomenex Gemini-NX 3 μ m C18, 30 x 2,00 mm. Cromatogramas basados en la detección UV a 254 nm. Los espectros de masas se lograron utilizando la EM en modo positivo. Los valores de desplazamiento químico de RMN de protones se midieron en la escala delta a 400 MHz usando un Bruker AV400. Se han usado las abreviaturas siguientes: s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartetE; m, multiplete; br, ancho. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hz. A menos que se indique lo contrario, se realizó cromatografía en columna (mediante procedimiento ultrarrápido) sobre sílice Merck Kieselgel (Art. 9385). Los datos de espectroscopia de masas (EM) se recogieron utilizando un instrumento Waters Micromass LCT acoplado a un módulo de separación de HPLC Waters 2795. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó sobre placas de aluminio de gel de sílice (Merck 60, F254). Todos los demás productos químicos y disolventes se adquirieron EN Sigma-Aldrich o Fisher Scientific y se usaron tal como se suministraron sin purificación adicional.

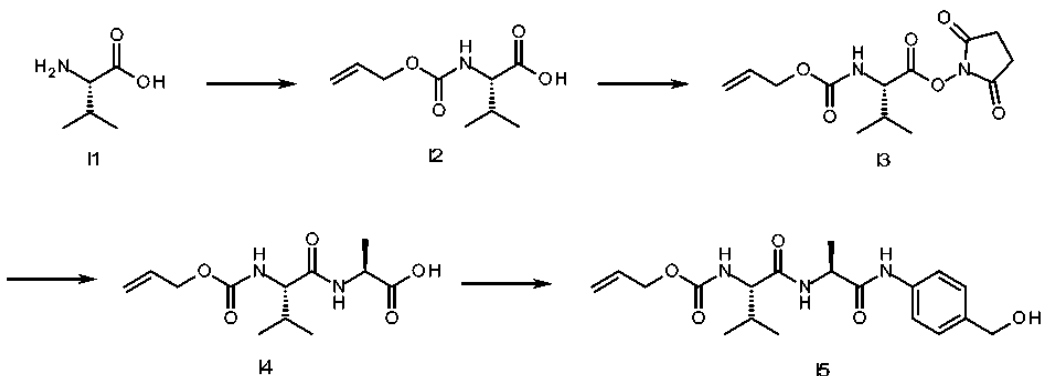
Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se facilitan en g/100 ml. Los puntos de fusión se midieron usando un aparato de punto de fusión digital (electrotérmico). Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro de IR Spectrum 1000 FT de Perkin-Elmer. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN de Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se informan con respecto a TEM ($\delta = 0,0$ ppm) y las señales se designan s (singlete), d (doblete), t (triplete), dt (triplete doble), dd (doblete de dobletes), ddd (doblete doble de dobletes) o m (multiplete), con las constantes de acoplamiento dadas en hercios (Hz). Se recogieron datos de espectroscopia de masas (EM) usando un instrumento Micromass ZQ de Waters acoplado a una HPLC 2695 de Waters con una PDA 2996 de Waters. Los parámetros de Micromass ZQ de Waters usados fueron: capilar (kV), 3,38; cono (V), 35; extractor (V), 3,0; temperatura de la fuente (°C), 100; temperatura de desolvatación (°C), 200; velocidad de flujo del cono (l/h), 50; velocidad de flujo de desolvatación (l/h), 250. Los datos de espectroscopia de masas de alta resolución (HR-EM) se registraron en un Micromass QTOF Global de Waters en modo W positivo usando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas de metal para introducir las muestras en el instrumento. Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de aluminio de gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄), y la cromatografía ultrarrápida utilizó gel de sílice (Merck 60, 230-400 de malla ASTM). Excepto por el HOBt (NovaBiochem) y los reactivos soportados sobre sólido (Argonaut), todos los otros productos químicos y disolventes se compraron de Sigma-Aldrich y se usaron como se suministraron sin más purificación. Se prepararon disolventes anhidros mediante destilación bajo una atmósfera de nitrógeno seca en presencia de un agente secante apropiado, y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4A o alambre de sodio. Éter de petróleo se refiere a la fracción que hierve a 40-60 °C.

Condiciones de EM/CL generales: La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico 0,1 %) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composición inicial 5 % de B durante 1,0 min, a continuación 5 % de B a 95 % de B durante 2,5 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min al 95 % de B, y a continuación volvió a 5 % de B en 0,1 minutos y se mantuvo allí durante 0,9 min. El tiempo de ejecución total del gradiente es igual a 5 min. Velocidad de flujo 3,0 ml/min, se fraccionaron 400 μ l mediante una pieza en T de volumen muerto cero que pasa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de longitud de onda: 220 a 400 nm. Tipo de función: matriz de diodos (535 barridos). Columna: Phenomenex[®] Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm

Ejemplo 9

(i) Intermedios clave

(a)

*(a-i) Ácido (S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanoico (12)*

5 Se añadió gota a gota clorofornato de alilo (36,2 ml, 340,59 mmol, 1,2 eq) a una solución agitada de L-valina (**11**) (33,25 g, 283,82 mmol, 1,0 eq) y carbonato de potasio (59,27 g, 425,74 mmol, 1,5 eq) en agua (650 ml) y THF (650 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, después el disolvente se concentró a presión reducida y la solución restante se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml). La porción acuosa se acidificó a pH 2 con HCl conc. y se extrajo con DCM (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto en forma de un aceite incoloro (57,1 g, rendimiento supuesto del 100 %). CL/EM (1,966 min (ES⁺)), m/z: 202,1 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,57 (s a, 1H), 7,43 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 5,96-5,86 (m, 1H) 3,4 Hz), 5,18 (ddd, 1H, J = 10,4, 2,9, 1,6 Hz), 4,48 (dt, 2H, J = 5,3, 1,5 Hz), 3,85 (dd, 1H, J = 8,6, 6,0 Hz) 2,03 (oct, 1H, J = 6,6 Hz), 0,89 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 0,87 (d, 3H, J = 6,5 Hz).

(a-ii) (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-il-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanoato (13)

15 A una solución agitada del ácido protegido **12** (60,6 g, 301,16 mmol, 1,0 eq) y N-hidroxisuccinimida (34,66 g, 301,16 mmol, 1,0 eq) en THF seco (800 ml) se añadió dicitclohexilcarbodiimida (62,14 g, 301,16 mmol, 1 eq). La reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a continuación, el sólido se lavó con THF y el filtrado combinado se concentró a presión reducida. El residuo se volvió a disolver en DCM y se dejó reposar a 0 °C durante 30 minutos. La suspensión se filtró y se lavó con DCM frío. La concentración del filtrado a presión reducida proporcionó el producto como un aceite incoloro viscoso (84,7 g, rendimiento supuesto del 100 %) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL/EM (2,124 min (ES⁺)), m/z: 321,0 [M + Na]⁺ RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,0 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 5,97-5,87 (m, 1H), 5,30 (ddd, 1H, J = 17,2, 3,0, 1,7 Hz) Ddd, 1H, J = 10,4, 2,7, 1,4 Hz), 4,52 (dt, 2H, J = 5,3, 1,4 Hz), 4,32 (dd, 1H, J = 8,3, 6,6 Hz), 2,81 (m, 4H) (Oct, 1H, J = 6,7 Hz), 1,00 (d, 6H, J = 6,8 Hz).

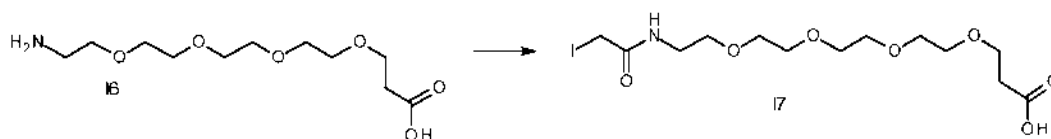
(a-iii) ácido (S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido) propanoico (14)

30 Se añadió una solución de éster de succinimida **13** (12,99 g, 43,55 mmol, 1,0 eq) en THF (50 ml) a una solución de L-alanina (4,07 g, 45,73 mmol, 1,05 eq) y NaHCO₃ (4,02 g, 47,90 mmol, 1,1 eq) en THF (100 ml) y H₂O (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas cuando se eliminó el THF a presión reducida. El pH se ajustó a 3-4 con ácido cítrico para precipitar una goma blanca. Después de la extracción con acetato de etilo (6 x 150 ml), los extractos orgánicos combinados se lavaron con H₂O (200 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La trituration con éter dietílico proporcionó el producto como un polvo blanco que se recogió por filtración y se lavó con éter dietílico (5,78 g, 49 %). CL/EM (1,925 min (ES⁺)), m/z: 273,1 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,47 (s ancho, 1H), 8,17 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 7,16 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 5,95-5,85 (m, 1H), 5,29 (dd, 1H, J = 17,2, 1,7 Hz), 5,17 (dd, 1H, J = 10,4, 1,5 Hz), 4,46 (m, 2H), 4,18 (quin, 1H, J = 7,2 Hz) (Dd, 1H, J = 9,0, 7,1 Hz), 1,95 (oct, 1H, J = 6,8 Hz), 1,26 (d, 3H, J = 7,3 Hz), 0,88 (d, 3H, J = 6,8 Hz) (D, 3H, J = 6,8 Hz).

(a-iv) (S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil fenilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-ilcarbamato) de alilo (15)

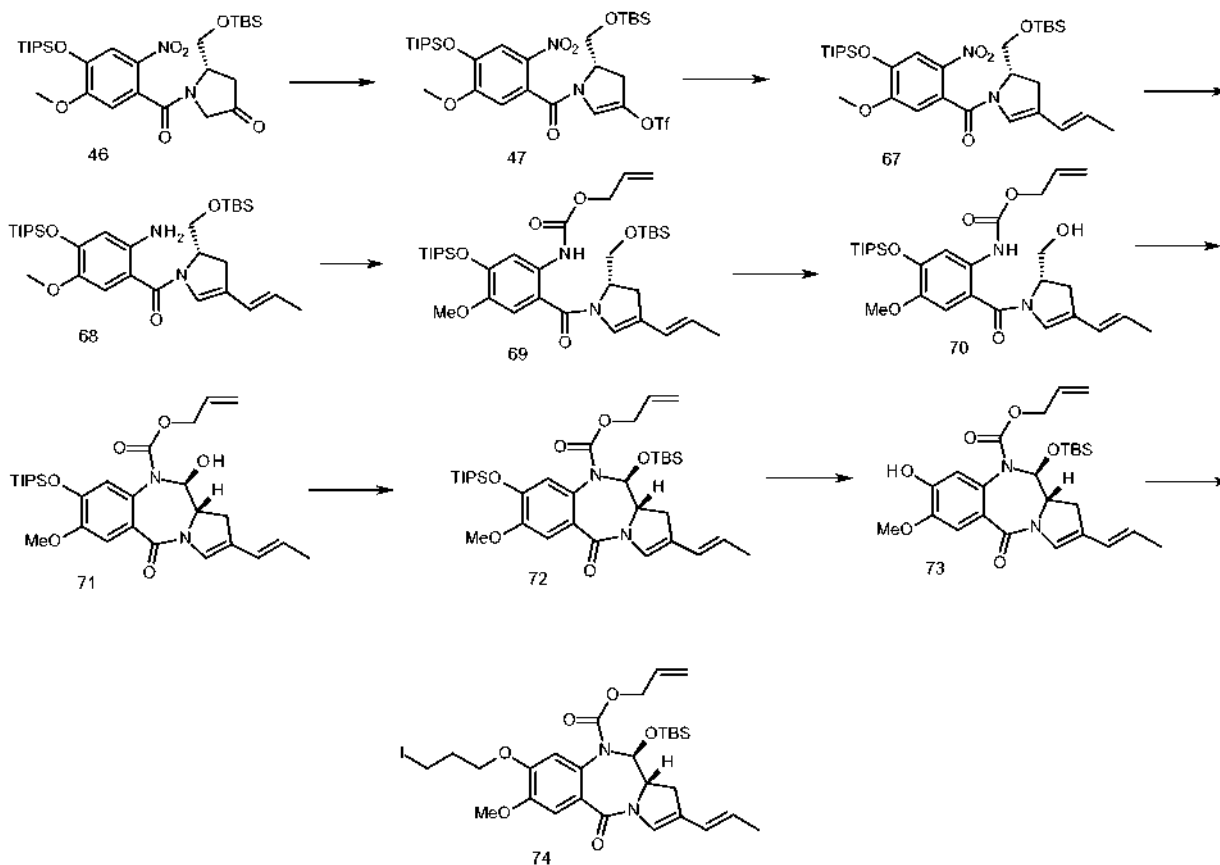
45 Se añadió EEDQ (5,71 g, 22,29 mmol, 1,05 eq) a una solución de alcohol *p*-aminobencílico (2,74 g, 22,29 mmol, 1,05 eq) y ácido **14** (5,78 g, 21,23 mmol, 1 eq) en THF seco) y se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. La mezcla de reacción se concentró luego a presión reducida y el sólido marrón resultante se trituró con éter dietílico y se filtró con lavado posterior con un exceso de éter dietílico para dar el producto en forma de un sólido blancuzco (7,1 g, 88 %). CL/EM (1,980 min (ES⁺)), m/z: 378,0 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,89 (br s, 1H), 8,13 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 7,52 (d, 2H, J = 8,5 Hz) 5,23 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 5,91 (m, 1H), 5,30 (m, 1H), 5,17 (m, 1H), 4,46 (m, 2H), 5,09 (t, 1H, J = 5,6 Hz (M, 3H), 3,89 (dd, 1H, J = 8,6, 6,8 Hz), 1,97 (m, 1H), 1,30 (d, 3H, J = 7,1 Hz), 0,88 (D, 3H, J = 6,8 Hz), 0,83 (d, 3H, J = 6,7 Hz).

(b)

Ácido 1-yodo-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaoctadecan-18-oico (**17**)

- 5 Se añadió una solución de anhídrido yodoacético (0,250 g, 0,706 mmol, 1,1 eq) en DCM seco (1 ml) a amino-PEG (4)-ácido **16** (0,170 g, 0,642 mmol, 1,0 eq) en DCM (1 ml). La mezcla se agitó en oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se lavó con HCl 0,1 M, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, MeOH al 3 % y ácido fórmico al 0,1 % en cloroformo hasta MeOH al 10 % y ácido fórmico al 0,1 % en cloroformo) para dar el producto en forma de un aceite de color naranja (0,118 g, 42 %). CL/EM (1,623 min (ES⁺)), m/z: 433, 98 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,069 (s, 1H), 7,22 (s a, 1H), 3,79 (t, 2H, J = 5,8 Hz), 3,74 (s, 2H), 3,50-3,46 (m, 2H), 2,62 (t, 2H, J = 5,8 Hz).

- 15 (ii) (terc-butildimetilsililoxi)-8-(3-yodopropoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo [e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (11s, 11As)-alilo (**74**)



- 20 (a) (S)-5-((terc-butildimetilsililoxi) metil)-1-(5-metoxi-2-nitro-4-(trisiopropilsililoxi) benzoil)-4,5-dihidro-1H-pirrol-3-il trifluorometanosulfonato (**47**)

- 25 Se añadió gota a gota anhídrido tríflico (28,4 g, 100,0 mmol, 3,0 eq), durante 25 minutos, a una solución agitada enérgicamente de la cetona **46** (19,5 g, 30,0 mmol, 1,0 eq) en DCM (550 ml) que contenía 2,6-Lutidina (14,4 g, 130,0 mmol, 4,0 eq) a 50 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 horas cuando CL/EM indicó una reacción completa. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (100 ml), bicarbonato sódico saturado (150 ml), salmuera (50 ml), y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, n-hexano/EtOAc 90/10 v/v) para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo pálido (19,5 g, 82 %). CL/EM (4,391 min (ES⁺)), m/z: 713,25 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,68 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,02 (t, 1H, J = 1,9 Hz), 4,75 (m, 1H) (S, 3H), 3,15 (ddd, 1H, J = 16,2, 10,3, 2,3 Hz), 2,96 (ddd, 1H, J = 16,2, 4,0, 1,6 Hz), 1,28-1,21 (m, 3H), 18H, J = 7,2 Hz), 0,88 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s,

3H).

(b) (S, E)-(2-(*terc-butildimetilsiloxi*) metil)-4-(*prop-1-enil*)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il) (5 metoxi-2-nitro-4-(*triisopropilsiloxi*) fenil) metanona (**67**)

5 Se añadió tetraquis (trifenilfosfina) paladio (0) (0,41 g, 0,35 mmol, 0,03 eq) a una mezcla del triflato **47** (8,4 g, 11,8 mmol, 1,0 eq), ácido E-1-propeno-1-ilborónico G, 16,5 mmol, 1,4 eq) y fosfato de potasio (5,0 g, 23,6 mmol, 2,0 eq) en dioxano seco (60 ml) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 25 °C durante 120 minutos cuando CL/EM indicó una reacción completa. Se añadieron acetato de etilo (120 ml) y agua (120 ml), se eliminó la fase orgánica, se lavó con salmuera (20 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, n/hexano/EtOAc 95/5 v/v hasta n/hexano/EtOAc 90/10 v/v) para proporcionar el producto en forma de una espuma amarilla (4,96 g, 70 %. CL/EM (4,477 min (ES+)), m/z: 605,0 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 5,93 (d, 1H, J = 15,4 Hz), 5,67 (s, 1H) (M, 1H), 1,72 (dd, 3H, J = 6,8, 1,0 Hz), 1,30-1,22 (m, 3H), 2,86 (m, 1H) 1,07 (d, 18H, J = 7,2 Hz), 0,87 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H).

15 (c) (S, E)-(2-(*terc-butildimetilsiloxi*) metil)-4-(*prop-1-enil*)-2,3-(2-amino-5-metoxi-4-(*triisopropilsiloxi*) fenil)-dihidro-1H-pirrol-1-il) metanona (**68**)

20 Se añadió polvo de cinc (22,0 g, 0,33 mol, 37 eq) en porciones durante 20 minutos a una solución del propenilo intermedio **67** (5,5 g, 9,1 mmol, 1,0 eq) en ácido fórmico al 5 % v/v/etanol 55 ml), utilizando un baño de hielo para mantener la temperatura entre 25 y 30 °C. Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho corto de celite®. El celite® se lavó con acetato de etilo (65 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con agua (35 ml), bicarbonato de sodio saturado (35 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, n-hexano/EtOAc 90/10 v/v) para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo pálido (3,6 g, 69,0 %). CL/EM (4,439 min (ES⁺)), m/z: 575,2 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,75 (m, 1H), 6,40 (s ancho, 1H), 6,28 (m, 1H), 6,11 (d, 1H, J = 15,4 Hz) 3,73 (s, 3H), 2,86 (dd, 1H, J = 15,7, 10,4 Hz), 4,67 (m, 1H), 4,36 (m, 2H), 3,93 (s a, 1H), 2,73 (dd, 1H, J = 15,9, 4,5 Hz), 1,80 (dd, 3H, J = 6,8, 1,3 Hz), 1,35-1,23 (m, 3H), 1,12 (d, 18H, J = 7,3 Hz) 0,89 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H).

30 (d) 2-(2-((*terc-butildimetilsiloxi*)metil)-4-(*prop-1-enil*)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(*triisopropilsiloxi*) fenilcarbamato de (S,E)-alilo (**69**)

35 Se añadió cloroformiato de alilo (0,83 g, 6,88 mmol, 1,1 eq) a una solución de la amina **68** (3,6 g, 6,26 mmol, 1,0 eq) en DCM seco (80 ml) que contenía piridina seca (1,09 g, 13,77 mmol, 2,2 eq) a -78 °C. El hielo seco se retiró y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de agitar durante 15 minutos más, la CL/EM indicó una reacción completa. La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 0,01 N (50 ml), bicarbonato sódico saturado (50 ml), salmuera (10 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un aceite amarillo pálido que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (4,12 g, rendimiento supuesto del 100 %). CL/EM (4,862 min (ES+)), m/z: 659,2 [M + H]⁺.

45 (e) 2-(2-(*hidroximetil*)-4-(*prop-1-enil*)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(*triisopropilsiloxi*) fenilcarbamato (**70**)

50 Se disolvió el intermedio **69** bruto (rendimiento supuesto del 100 %, 4,12 g, 6,25 mmol, 1,0 eq) en una mezcla de ácido acético (70 ml), metanol (10 ml), THF (10 ml) y agua (20 ml) y se dejó agitar a temperatura ambiente. Después de 6 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (500 ml) y se lavó sucesivamente con agua (2 x 500 ml), bicarbonato de sodio saturado (300 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 1/99 v/v de metanol/DCM hasta 5/95 v/v de metanol/DCM) para dar el producto como un aceite amarillo y se recuperó 1 g adicional de material de partida sin reaccionar. Este material se sometió a las mismas condiciones de reacción que anteriormente, pero se dejó en agitación durante 16 horas. Después de tratamiento y purificación, se aisló producto adicional (2,7 g, 79 %, 2 etapas) CL/EM (3,742 min (ES⁺)), m/z: 545,2 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,38 (m, 1H), 7,72 (m, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,37 (m, 1H), 6,10 (d, 1H, J = 15,8 Hz) (M, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,36 (ddd, 1H, J = 17,2, 3,1, 1,5 Hz), 5,25 (ddd, 1H, J = 10,4, 2,5, 1,3 Hz) (D, 2H, J = 5,7, 1,3 Hz), 3,84 (m, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,04 (dd, 1H, J = 16,7, 10,5 Hz), 2,40 (dd, 1H, J = 16,0, 4,5 Hz), 1,82 (dd, 3H, J = 6,8, 1,0 Hz), 1,36-1,26 (m, 3H), 1,14 (d, 18H, J = 7,3 Hz).

60 (f) 11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-*prop-1-enil*)-8-(*triisopropilsiloxi*)-11,11a-dihidrobenzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10 (5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**71**)

65 Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido seco (1,16 g, 14,87 mmol, 3,0 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (0,94 g, 7,43 mmol, 1,5 eq) en DCM (25 ml) a -78 °C en una atmósfera de nitrógeno. Manteniendo la temperatura a -78 °C, después de 10 minutos se añadió gota a gota una solución del alcohol primario **70** (2,7 g, 4,96 mmol, 1,0 eq) en DCM (20 ml). Después de otros 15 minutos, se añadió trietilamina seca (2,5 g, 24,78 mmol, 5,0 eq) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con HCl 0,1 N frío

(50 ml), hidrogenocarbonato sódico saturado (50 ml) y salmuera (10 ml) y la capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el producto como un aceite amarillo que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (2,68 g, se supuso un rendimiento del 100 %). CL/EM (3,548 min (ES⁺)), m/z: 543,2 [M + H]⁺.

5

(g) *11-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo [e] pirrolo[1,2-a][1,4] diazepina-10 (5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (72)*

10

Se añadió terc-butildimetilsililfluorometano sulfonato (3,93 g, 14,87 mmol, 3,0 eq) a una solución de carbinolamina **71** (rendimiento supuesto del 100 %, 2,68 g, 4,96 mmol, 1,0 eq) y 2,6-lutidina (2,12 g, 19,83 mmol, 4,0 eq) en DCM seco (40 ml) a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante otros 60 minutos. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (10 ml), bicarbonato de sodio saturado (10 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, cloroformo hasta 2/98 v/v metanol/cloroformo) para dar el producto en forma de un aceite amarillo (2,0 g, 63 %, 2 etapas). CL/EM (4,748 min (ES⁺)), m/z: 657,2 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 7,19 (s, 1H), 6,86 (m, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,22 (d, 1H, J = 15,4 Hz) 5,88 (m, 1H), 4,58 (dd, 1H, J = 13,4, 5,4 Hz), 5,88 (m, 1H), 5,48 (m, 1H), 5,11 (d, 1H, J = 5,0 Hz), 3,36 (s, 1H), 3,00 (dd, 1H, J = 15,6, 11,0 Hz), 2,53 (m, 1H), 4,35 (dd, 1H, J = 13,2, 5,7 Hz) 1,81 (dd, 3H, J = 6,8, 0,9 Hz), 1,30-1,18 (m, 3H), 1,08 (d, 9H, J = 2,3 Hz), 1,06 (d, 9H, J = 2,3 Hz), 0,86, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,18 (s, 3H).

15

20

(h) *11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e] pirrolo[1,2-a][1,4] diazepina-10 (5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (73)*

25

Se añadió dihidrato de acetato de litio (0,31 g, 3,04 mmol, 1,0 eq) a una solución de la diazepina **72** (2,0 g, 3,04 mmol, 1,0 eq) en DMF húmeda (20 ml) a 25 °C y se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,1 M (50 ml, pH 3), agua (50 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, n-hexano/EtOAc 50/50 v/v hasta n-hexano/EtOAc 25/75 v/v) para proporcionar el producto como un sólido amarillo pálido (0,68 g, 45 %). CL/EM (3,352 min (ES⁺)), m/z: 501,1 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 7,02 (s, 1H), 6,66 (m, 1H), 6,53 (s, 1H), 6,03 (d, 1H, J = 15,5 Hz) (M, 1H), 4,97 (m, 2H), 4,39 (dd, 1H, J = 13,5, 4,2 Hz), 4,20 (dd, 1H, J = 8,9 Hz) 1H, J = 13,2, 5,7 Hz), 3,73 (s, 3H), 3,59 (m, 1H), 2,81 (dd, 1H, J = 16,1, 10,5 Hz), 2,35 (d, 1H, J = 15,7 Hz) 1,61 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 0,67 (s, 9H), 0,05 (s, 3H), 0,00 (s, 3H).

30

35

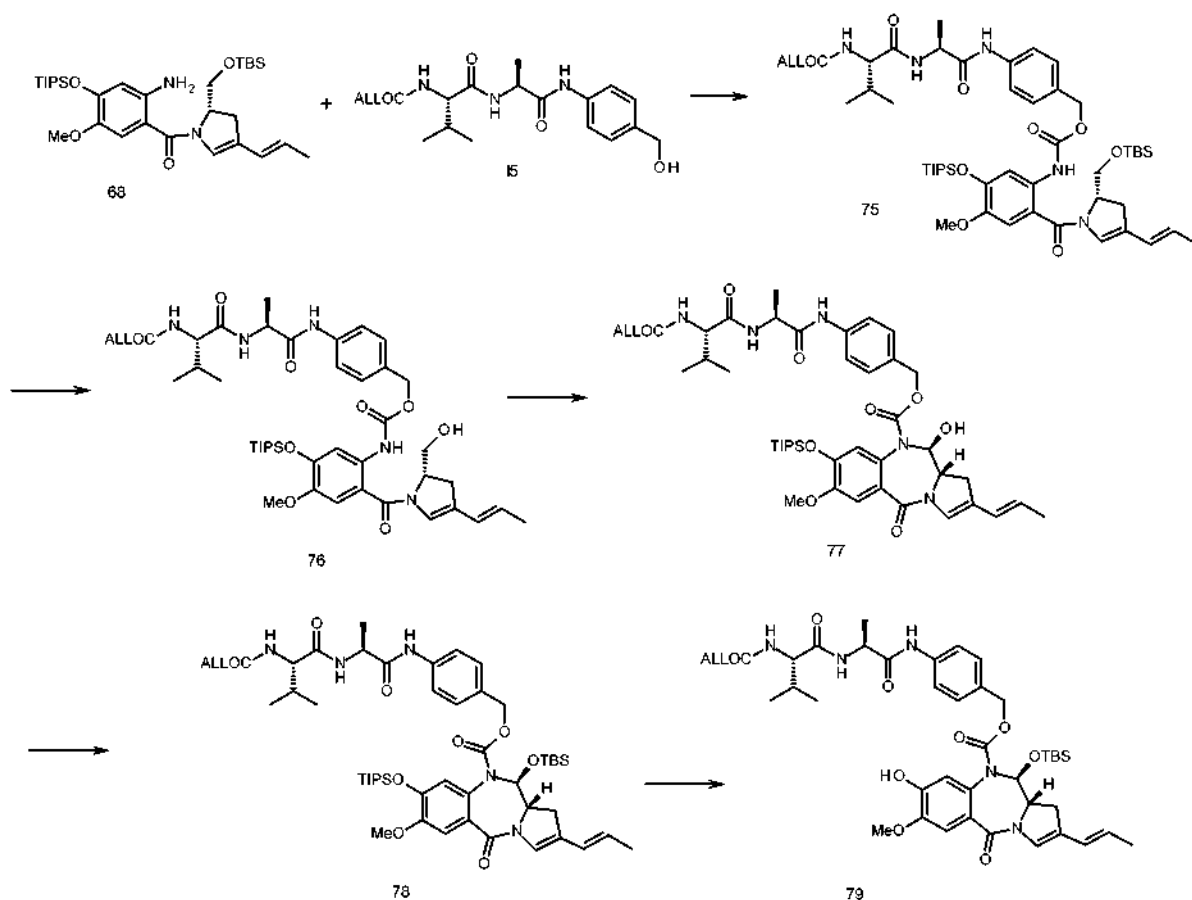
(i) *11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-(3-yodopropoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-(E)-prop-1-enil) 11a-dihidro-1 <i> H-benzo [e] pirrolo[1,2-a][1,4] diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (74)*

40

Se añadieron diyodopropano (0,295 g, 1,00 mmol, 5,0 eq) y carbonato de potasio (0,028 g, 0,20 mmol, 1,0 eq) a una solución del fenol **33** (0,100 g, 0,020 mmol, 1,0 eq) en acetona seca (5 ml). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 6 horas cuando CL/EM mostró una reacción completa. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, n-hexano/EtOAc 75/25 v/v hasta 50/50 v/v de n-hexano/EtOAc) para proporcionar el producto como un aceite incoloro (0,074 g, 56 %). CL/EM (3,853 min (ES⁺)), m/z: 669,0 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 7,26 (s, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,24 (d, 1H, J = 15,3 Hz) 4,97 (m, 1H), 5,13 (m, 1H), 5,12 (m, 1H), 5,22 (m, 1H) 3H), 3,81 (m, 1H), 3,40 (t, 2H, J = 6,7 Hz), 3,05 (dd, 1H, J = 16,3, 10,1 Hz) 1,84 (d, 3H, J = 6,6 Hz), 0,92 (s, 9H), 0,28 (s, 3H), 0,26 (s, 3H).

45

(iii) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-3-metilbutanamido)propanamido)bencill-11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10 (5H)-carboxilato de (11,S, 11As)-4-((S)-2((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (79)



(a) ((S)-1-(((S)-1-((4-(((2-((S)-2-((*tert*-butildimetilsilil) oxil) metil) 1-enil)-2,3-dihidro-1H-pir-rol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((*triisopropilsilil) oxil)fenil) carbamoil) oxil) Metil) fenil) amino)-1-oxopropan-2-il) amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il) carbamato de alilo (75)*

Se añadió trietilamina (0,256 ml, 1,84 mmol, 2,2 eq) a una solución agitada de la amina **68** (0,480 g, 0,835 mmol, 1,0 eq) y trifosgeno (0,089 g, 0,301 mmol, 0,36 eq) en THF seco (15 ml) a 5 °C (baño de hielo). El progreso de la reacción de isocianato se controló retirando periódicamente alícuotas de la mezcla de reacción y apagando con metanol y realizando análisis de LCMS. Una vez completada la reacción de isocianato, se añadió rápidamente una solución de Alloc-Val-Ala-PABOH **15** (0,473 g, 1,25 mmol, 1,5 eq) y trietilamina (0,174 ml, 1,25 mmol, 1,5 eq) en THF seco (10 mL) Inyección al isocianato recién preparado. La reacción se dejó agitar a 40 °C durante 4 horas seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, n-hexano/EtOAc 20/80 v/v hasta 50/50 v/v de n-hexano/EtOAc, luego 1/99 v/v de DCM/MeOH a 5/95 v/v de DCM/MeOH) para proporcionar el producto como un sólido amarillo (0,579 g, 71 %). CL/EM (4,468 min (ES⁺)), m/z: 978,55 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 8,63 (s a, 1H) J = 8,6 Hz), 6,76 (s, 1H), 6,59 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 6,36 (s a, 1H), 6,04 (d, 1H, J = 15,9 Hz), 5,55 (m, 1H), 5,33-5,21 (m, 3H), 5,10 (s, 2H), 4,66 (m, 2H), 4,57 (dd, 2H, J = 5,6, 1,0 Hz) 1H, J = 7,3, 6,8 Hz), 3,90 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,82 (dd, 1H, J = 15,4, 9,6 Hz) 1H), 1,78 (dd, 3H, J = 6,5, 0,8 Hz), 1,46 (d, 3H, J = 7,1 Hz), 1,29 (m, 3H), 1,11 (D, 3H, J = 6,8 Hz), 0,83 (s, 9H), 0,04 (s, 3H), 0,01 (d, (S, 3H).

(b) ((S)-1-(((S)-1-((4-(((2-((S)-2-(hidroximetil)-4-(*EE*)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((*triisopropilsilil)oxil)fenil) carbamoil) oxil)metil)fenil) amino)-1-oxopropan-2-il) amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il) carbamato de alilo (76)*

Se disolvió el éter silílico 75 (1,49 g, 1,52 mmol, 1,0 eq) en una mezcla 7: 1: 1: 2 de ácido acético/metanol/tetrahidrofurano/agua (14: 2: 2: 4 ml) y se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la reacción se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó secuencialmente con agua, bicarbonato sódico y luego salmuera. La fase orgánica se secó a continuación sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 100/0 y 99/1 a 92/8 v/v DCM/MeOH) para proporcionar el producto como un sólido naranja (1,2 g, 92 %). CL/EM (3,649 min (ES⁺)), m/z: 865,44 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 8,44 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,69 (s a, 1H), 7,53 (d, 2H, J = 8,7 Hz) 6,36 (m an, 1H), 6,05 (d, 1H, J = 14,9 Hz), 5,90 (m, 1H), 5,56 (m, 1H) (M, 1H), 5,30 (m, 1H), 5,12 (m, 1H), 5,10 (d, 2H, J = 3,1 Hz), 4,73 J = 16,3, 10,2 Hz), 2,38 (dd, 1H, J = 16,6, 3H), 3,79 (m, 2H), 3,76 (s, 3H) 1,1 (d, 3H, J = 6,8, 0,9 Hz), 1,46 (d, 3H, J = 7,1 Hz), 1,29 (m, 3H), 1,11 (d,

18H, J = 7,4 Hz), 0,97 (d, 3H, J = 6,7 Hz), 0,92 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

(c) 11-hidroxi-7-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo [e] pirrolo[1,2-a][1,4] diazepina-10 (5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido) propanamido)bencilo (**77**)

5 Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido seco (0,180 g, 2,3 mmol, 3,0 eq) a una solución de cloruro de oxalilo (0,147 g, 1,1 mmol, 1,5 eq) en DCM (10 ml) a -78 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Manteniendo la temperatura a -78 °C, después de 20 minutos, se añadió gota a gota una solución del alcohol primario **76** (0,666 g, 0,77 mmol, 1,0 eq) en DCM (10 ml). Después de otros 15 minutos, se añadió trietilamina seca (0,390 g, 3,85 mmol, 5,0 eq) y la mezcla de
10 reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con HCl 0,1 N frío (10 ml), hidrogenocarbonato sódico saturado (10 ml) y salmuera (5 ml). La capa orgánica se secó luego sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó después por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, n/hexano/EtOAc 50/50 v/v hasta n/hexano/EtOAc 25/75 v/v) para proporcionar el producto como un sólido blanco (0,356 g). CL/EM (3,487 min (ES⁺)), m/z: 862,2 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 8,34 (br s, 1H), 7,47 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 7,17 (s, 1H), 7,14 (d, 2H, J = 7,5 Hz) 1H), 6,62 (d, 1H, J = 14,4 Hz), 5,80 (m, 1H), 5,40 (m, 1H),
15 5,53 (m, 1H), 5,32 (m, 1H), 5,21 (d, 2H, J = 9,6 Hz), 5,06 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 4,90, 3,38 (m, 1H), 3,05 (dd, 1H, J = 16,0, 10,3 Hz), 2,76 (m, 1H) 1H), 1,80 (dd, 3H, J = 6,7, 0,8 Hz), 1,44 (d, 3H, J = 7,1 Hz), 1,16 (m, 3H), 1,01 (d, 18H, J) = 6,6 Hz), 0,96 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,92 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

20 (d) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4] diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**78**)

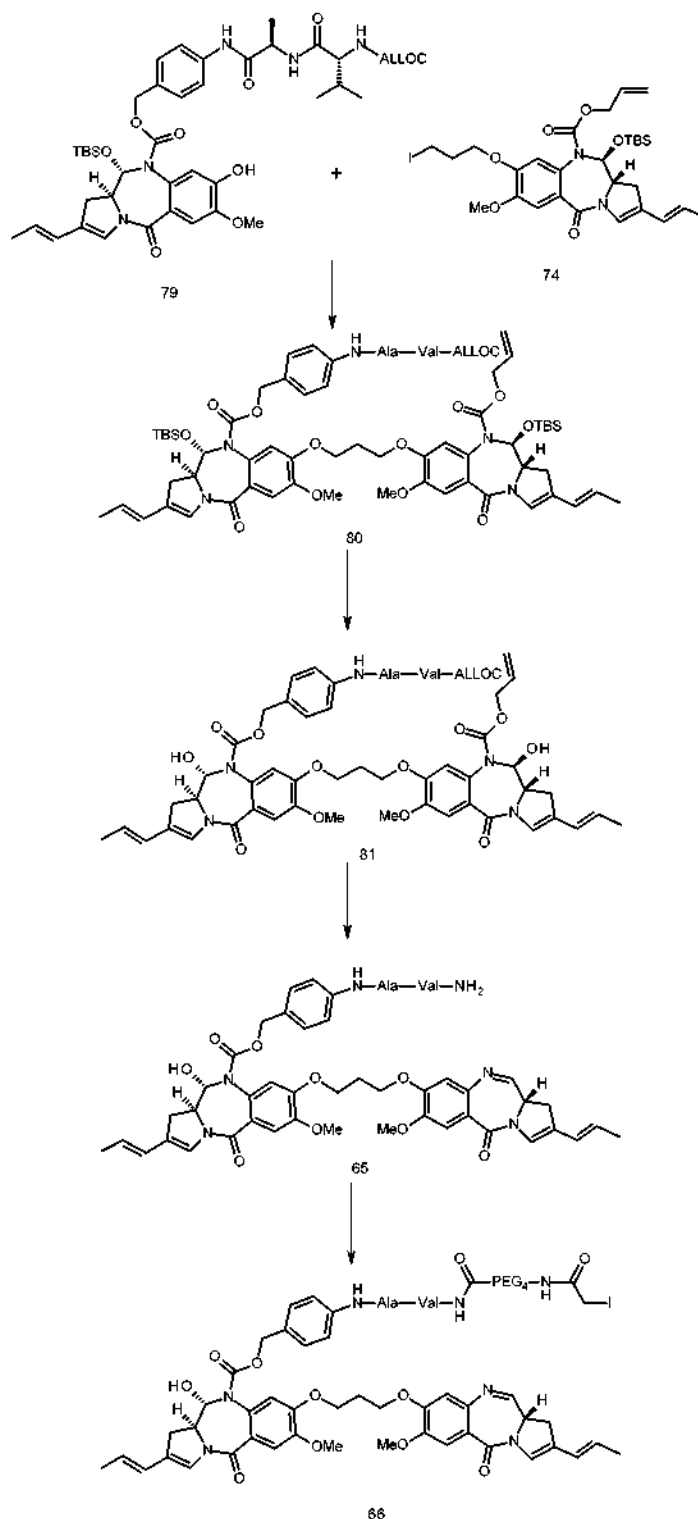
25 Se añadió terc-butildimetilsilil trifluorometano sulfonato (0,46 g, 1,74 mmol, 3,0 eq) a una solución de alcohol secundario **77** (0,5 g, 0,58 mmol, 1,0 eq) y 2,6-lutidina (0,25 g, 2,32 mmol, 4,0 eq) en DCM seco (10 ml) a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante otros 120 minutos. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (10 ml), bicarbonato sódico saturado (10 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, n-hexano/EtOAc 50/50 v/v) para proporcionar el producto en
30 forma de un sólido blanco (0,320 g, 57 %). CL/EM (4,415 min (ES⁺)), m/z: 976,52 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 8,31 (br s, 1H), 7,48 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,21 (s, 1H), 7,14 (d, 2H, J = 8,3 Hz) (D, 1H, J = 7,3 Hz), 6,25 (d, 1H, J = 14,6 Hz), 5,93 (m, 1H), 5,85 (d, 1H, J 5,5 (m, 1H), 5,24 (m, 2H), 5,15 (d, 1H, J = 12,5 Hz), 4,86 (d, 1H, J = 12,2 Hz) 4,62 (m, 3H), 4,01 (m, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 2,20 (m, 1H) 1,84 (dd, 3H, J = 6,6, 0,7 Hz), 1,48 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,20 (m, 3H), 1,05 (d, 9H, J = 2,9 Hz), J = 2,9 Hz), 0,99 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,95 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,88 (s, 9H), 0,27 (s, 3H)).

(e) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido) propanamido) bencilo (**79**)

40 Se añadió acetato de litio dihidratado (0,010 g, 0,10 mmol, 1,0 eq) a una solución del éter de sililo **78** (0,100 g, 0,10 mmol, 1,0 eq) en DMF húmeda (2 ml) a 25 °C durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (20 ml) y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,1 M (20 ml, pH 3), agua (20 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre MgSO₄, presión. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 5/95 v/v de metanol/DCM) para proporcionar el producto en forma de un aceite amarillo pálido (0,070 g, 83 %). CL/EM (3,362 min (ES⁺)), m/z: 820,2 [M + H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 8,39 (s, 1H), 7,48 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 7,25 (s, 1H), 7,12 (d, 2H, J = 8,1 Hz) 1H), 6,67 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 6,24 (d, 1H, J = 15,2 Hz), 6,03 (s, 1H), 5,92 (m, 1H), 5,84 (M, 1H), 5,26 (m, 2H), 5,18 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 4,80 (d, 1H, J = 8,9 Hz) J = 12,4 Hz), 4,66-4,60 (m, 3H), 4,02 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,81 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,57 (m, 1H) 1,84 (dd, 3H, J = 6,8, 0,8 Hz), 1,48 (d, 3H, J = 7,1 Hz), 1,00 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,95 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,87 (s, 9H), 0,26 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(iv) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]1pirrolo[1,2-a]1[1,4]diazepin-8-iloxi) propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-Dihidro-1H-benzo [e]1pirrolo[1,2-a]1 [1,4] diazepina-10 (5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-4-((20S, 23S)-1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3, 19,22-triazatetracosanamido) bencilo (**66, D**)

55



(a) ((11S, 11aS)-alil-8-(3-((11S, 11aS)-10-((4-((R)-2-(R)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamida)enciloxi)carbonil)-11-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-11-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4] diazepin-10 (5H)-carboxilato (**80**))

Se añadió carbonato de potasio (0,030 g, 0,21 mmol, 1,0 eq) a una solución del fenol **79** (0,175 g, 0,21 mmol, 1,0 eq) y el ligador yodo **74** (0,214 g, 0,32 mmol, 1,5 eq) en acetona MI). La mezcla de reacción se calentó bajo una atmósfera de nitrógeno a 75 °C en un matraz sellado durante 17 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, metanol/DCM 2/98 v/v a 5/95 v/v de metanol/DCM) para dar el producto como un sólido amarillo pálido (0,100 g, 35 %). CL/EM (4,293 min (ES⁺)),

m/z: 1359,13 [M]⁺.

(b) 8-(3-((11S, 11aS)-10-((4-((R)-2-(R)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamida) benciloxi) carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo [e] -pirrolo[1,2-a][1,4] diazepin-8-iloxi) propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1--11,11a-dihidro-1H-benzo [e] pirrolo[1,2-a][1,4] diazepina-10 (5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-alilo (**81**)

Se añadió fluoruro de tetra-n-butilamonio (1 M, 0,22 ml, 0,22 mmol, 2,0 eq) a una solución de éter silílico **80** (0,150 g, 0,11 mmol, 1,0 eq.) En THF seco (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, después de lo cual CL/EM indicó reacción completa. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (10 ml) y se lavó secuencialmente con agua (5 ml) y salmuera (5 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un sólido amarillo. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6/94 v/v de metanol/DCM hasta 10/90 v/v de metanol/DCM) proporcionó el producto como un sólido amarillo pálido (0,090 g, 73 %). CL/EM (2,947 min (ES⁺)), m/z: 1154,0 [M + Na]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃ δ 8,39 (br s, 1H), 7,39 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 7,18 (d, 2H, J = 10,6 Hz), 7,10 (m, 3H) 1H), 6,55 (s, 1H), 6,22 (dd, 2H, J = 15,3, 6,6 Hz), 5,85 (m, 2H), 5,74 (m, 3H) (M, 2H), 4,41 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 3,85 (m, 11H), 5,52 (m, 2H), 5,22, 3,06 (m, 2H), 2,76 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 2,08 (m, 1H), 1,79 (d, 6H, J = 6,4 Hz), 1,40 (d, 3H, J = 6,1 Hz), 0,90 (m, 6H).

(c) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4] diazepin-8-iloxi) propoxi)-5-oxo-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo [e] pirrolo[1,2-a][1,4] diazepina-10 (5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-4-((R)-2-((R)-2-amino-3-metilbutanamido) propanamido) bencilo (**65**)

Se añadió tetraquis (trifenilfosfeno) paladio (0) (0,005 g, 0,005 mmol, 0,06 eq) a una solución de la bis-carbinolamina **81** (0,090 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) y pirrolidina (16 µl, 0,20 mmol, 2,5 eq) En DCM seco (5 ml). Después de 20 minutos, la mezcla de reacción se diluyó con DCM (10 ml) y se lavó secuencialmente con cloruro de amonio saturado (5 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida para dejar el crudo Producto como un sólido amarillo pálido que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (0,075 g, rendimiento supuesto del 100 %). CL/EM (2,060 min (ES⁺)), m/z: 947,2 [M + H]⁺.

(d) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e] pirrolo[1,2-a][1,4] diazepin-8-iloxi)propoxi)-5-oxo-2-(E)-propenil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4] diazepina-10(5H)-carboxilato de (11S, 11aS)-4-((20S, 23S)-1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxa-6,9,12,15-tetraoxa-3, 19,22-triazatetracosanamido) bencilo (**66, D**)

Se añadió EDCI (0,015 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) a una solución de la amina **65** (rendimiento supuesto del 100 % 0,075 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) y yodoacetamida-PEG4-ácido **17** (0,034 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) En diclorometano seco (5 ml) y la reacción se agitó en la oscuridad. Después de 50 minutos, se añadió una cantidad adicional de yodoacetamida-PEG4-ácido **17** (0,007 g, 0,016 mmol, 0,2 eq) junto con una cantidad adicional de EDCI (0,003 g, 0,016 mmol, 0,2 eq). Después de un total de 2,5 horas, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (15 ml) y se lavó secuencialmente con agua (10 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, cloroformo 100 % a 90:10 v/v cloroformo: metanol). Las fracciones puras se combinaron para proporcionar el producto (0,0254 g, 23 %, 2 etapas). Las fracciones brutas se recogieron y purificaron mediante TLC preparativa (gel de sílice, Cloroformo: metanol 90:10 v/v) para proporcionar un segundo lote de producto (0,0036 g, 3 %, 2 etapas). CL/EM (2,689 min (ES⁺)), m/z: 681,0 1/2 [M + 2H]⁺.

Ejemplo 10: Actividad de compuestos liberados

Ensayo de K562

Se mantuvieron células de leucemia mieloide crónica humana K562 en medio RPM1 1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal y glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5 % de CO₂ y se incubaron con una dosis especificada de fármaco durante 1 hora o 96 horas a 37 °C en la oscuridad. La incubación se terminó por centrifugación (5 min, 300 g) y las células se lavaron una vez con medio sin fármaco. Tras el tratamiento con el fármaco apropiado, las células se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pocillos (10⁴ células por pocillo, 8 pocillos por muestra). A continuación, las placas se mantuvieron en la oscuridad a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5 % de CO₂. El ensayo se basa en la capacidad de las células viables para reducir una sal de tetrazolio soluble amarilla, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Aldrich-Sigma), a un precipitado de formazano púrpura insoluble. Tras la incubación de las placas durante 4 días (para permitir que las células de control aumenten en número aproximadamente 10 veces), se añadieron 20 µl de solución de MTT (5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato) a cada pocillo y las placas se incubaron adicionalmente durante 5 h. A continuación, las placas se centrifugaron durante 5 min a 300 g y se pipeteó volumen del medio del sedimento de células dejando 10-20 µl por pocillo. Se añadió DMSO (200 µl) a cada pocillo y las muestras se agitaron para garantizar la mezcla completa. A continuación, la densidad óptica se leyó a una longitud de onda de 550 nm sobre un lector de placas de ELISA Titertek Multiscan, y se construyó una curva de dosis-respuesta. Para cada curva, se leyó un valor de Cl₅₀ como la dosis requerida para reducir la densidad óptica final al

50 % del valor de control.

El compuesto ReIC tiene una CI_{50} de 0,1 pM en este ensayo.

5 El compuesto ReIE tiene una CI_{50} de 0,425 pM en este ensayo.

Ejemplo 11: Formación de conjugados

Procedimiento general de conjugación de anticuerpos

10 Se diluyen anticuerpos a 1-5 mg/ml en un tampón de reducción (ejemplos: solución salina tamponada con fosfato PBS, tampón histidina, tampón borato de sodio, tampón Tris). Se añade una solución recientemente preparada de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina) para reducir selectivamente los puentes de disulfuro de cisteína. La cantidad de TCEP es proporcional al nivel objetivo de reducción, dentro de 1 a 4 equivalentes molares por anticuerpo, que generan 2 a 8 tioles reactivos. Después de la reducción durante varias horas a 37 °C, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y el exceso de fármaco-conector (**A, B, C, D, E**) se añade como una solución de DMSO diluida (contenido de DMSO final de hasta el 10 % en volumen/volumen de mezcla de reacción). La mezcla se agitó suavemente a tanto 4 °C como a temperatura ambiente durante el tiempo apropiado, generalmente 1-3 horas para. El exceso de tioles reactivos puede hacerse reaccionar con un 'reactivo de encapuchado de tiol' como N-etilmaleimida (NEM) al final de la conjugación. Los conjugados de anticuerpo-fármaco se concentran usando filtros de concentración centrífuga con un corte de peso molecular de 10 kDa o superior, a continuación se purifican por filtración de flujo tangencial (TFF) o cromatografía de líquidos rápida de proteínas (FPLC). Los de conjugados de anticuerpo-fármaco correspondientes pueden determinarse por análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de líquidos de resolución ultra-alta (UHPLC) para evaluar la relación de fármaco por anticuerpo (DAR) usando cromatografía de fase inversa (RP) o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), acoplada a detección UV-visible, de fluorescencia o por espectrómetro de masas; el nivel de agregados y la pureza de los monómeros puede analizarse por HPLC o UHPLC usando cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a detección UV-visible, de fluorescencia o por espectrómetro de masas. La concentración de conjugado final se determina por una combinación de ensayo espectroscópico (absorbancia a 280, 214 y 330 nm) y bioquímico (ensayo con ácido bicinconínico BCA; Smith, P.K. y col. (1985) Anal. Biochem. 150 (1): 76-85; usando un anticuerpo IgG de concentración conocida como referencia). Los conjugados de anticuerpo-fármaco se esterilizan generalmente por filtración usando filtros de 0,2 µm bajo condiciones asépticas, y se guardan a +4 °C, -20 °C o -80 °C.

Determinación de DAR

35 Se redujo el anticuerpo o ADC (aproximadamente 35 µg en 35 µl) mediante la adición de 10 µl de tampón de borato (100 mM, pH 8,4) y 5 µl de DTT (0,5 M en agua) y se calentó a 37 °C durante 15 minutos. La muestra se diluyó con 1 volumen de acetonitrilo: agua: ácido fórmico (49 %: 49 %: 2 % v/v), y se inyectó en un Widedpore 3,6 µ XB-C18 150 x 2,1 mm (P/N 00F-4482-AN) a 80 °C en un sistema UPLC (Shimadzu Nexera) con un caudal de 1 ml/min equilibrado en tampón A al 75 % (agua, ácido trifluoroacético (0,1 % v/v) (TFA), 25 % de tampón B (acetonitrilo: agua: TFA 90 %: 10 %: 0,1 % v/v) El material unido se eluyó usando un gradiente de 25 % a 55 % de tampón B en 10 minutos. Los picos de absorción de UV a 214 nm Se identificaron los siguientes picos para cada ADC o anticuerpo: cadena ligera de anticuerpo nativo (L0), cadena pesada de anticuerpo nativo (H0), y cada una de estas cadenas con agregadores de fármaco añadidos (marcados L1 para cadena ligera con un fármaco y H1, H2, H3 para la cadena pesada con 1,2 o 3 adyuvantes ligadores unidos.) El cromatograma UV a 330 nm se utilizó para la identificación de fragmentos que contenían fármacos conectores (es decir, L1, H1, H2, H3).

Se calculó una relación molar PBD/proteína para las cadenas ligeras y las cadenas pesadas:

$$\frac{\text{Fármaco}}{\text{Proteína}} \text{ relación en la cadena ligera} = \frac{\% \text{ área a } 214 \text{ nm para L1}}{\% \text{ área a } 214 \text{ nm para L0 y L1}}$$

$$\frac{\text{Fármaco}}{\text{Proteína}} \text{ relación en la cadena pesada} = \frac{\sum_{n=1}^3 n \times (\% \text{ área a } 214 \text{ nm para Hn})}{\sum_{n=0}^3 \% \text{ área a } 214 \text{ nm para Hn}}$$

50

La DAR final se calcula como:

$$DAR = 2 \times \left(\frac{\text{Fármaco}}{\text{Proteína}} \text{-relación en la cadena ligera} + \frac{\text{Fármaco}}{\text{Proteína}} \text{-relación en la cadena pesada} \right)$$

La medición de DAR se lleva a cabo a 214 nm porque minimiza la interferencia de la absorbancia del conector de fármaco.

5

Generación de ADC

El anticuerpo A (que comprende un dominio variable que es la SEQ ID NO 1 emparejada con la SEQ ID NO: 2) se conjugó con el conector de fármaco A en dos experimentos para dar Conj A-A1 y Conj A-A2 y se midió el DAR como 3,51 (véase el cuadro siguiente) y 2,52, respectivamente.

10

El anticuerpo A (que comprende un dominio variable que es la SEQ ID NO 1 emparejada con la SEQ ID NO: 2) se conjugó con el conector de fármaco B para dar Conj A-B, y se midió el DAR como 2,87.

15 El anticuerpo A (que comprende un dominio variable que es la SEQ ID NO 1 emparejada con la SEQ ID NO: 2) se conjugó con el conector de fármaco D para dar Conj A-D, y se midió el DAR como 2,19 (véase la tabla siguiente).

20 El anticuerpo A (que comprende un dominio variable que es la SEQ ID NO 1 emparejada con la SEQ ID NO: 2) se conjugó con el fármaco E en dos experimentos para dar Conj A-E1 y Conj A-E2 y se midió el DAR como 2,24 (véase el cuadro siguiente) y 2,7, respectivamente.

Her y Trastuzumab son anticuerpos anti-Her2 que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia según SEC ID N°. 1 y un dominio VL que tiene la secuencia según SEQ ID NO 2.

25 Como se ha descrito anteriormente, los ADC dirigidos a Her2 se generaron conjugando anticuerpos Her2 con el conector de fármaco A, E, D o B. Los ADC resultantes se enumeran en la tabla siguiente, junto con el DAR medido.

ADC	DAR	Concentración [mg/ml]	Rendimiento [%]
Her2-A	3,51	1,05	73
Her2-E	2,24	1,02	71
Her2-D	2,19	0,67	56
Her2-B	1,58	2,2	37

Ejemplo 12: Citotoxicidad in vitro de los ADC

30

Cultivo de células

BT-474 y MDA-MB-468 procedieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo. El medio de cultivo celular fue RPMI 1640 suplementado con L-glutamina y FBS al 10 %. Las células se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂, en una incubadora humidificada.

35

Ensayo de citotoxicidad

Se determinó la concentración y viabilidad de cultivos de células suspendidas (hasta 1 × 10⁶/ml) mezclando 1: 1 con azul tripán y contando células claras (vivas)/azules (muertas) con un hemocitómetro. La suspensión de células se diluyó hasta la densidad de siembra requerida (generalmente 10⁵/ml) y se dispensó en placas de fondo plano de 96 pocillos. Para el ensayo de azul de Alamar, se dispensaron 100 µl/pocillo en placas de pocillo negro. Para el ensayo MTS, se dispensaron 50 µl/pocillo en placas de pocillo claro. Se preparó una solución madre (1 ml) de ADC (20 µg/ml) por dilución de ADC estéril en filtro en medio de cultivo celular. Se preparó un conjunto de diluciones de 8 x 10 veces de ADC de reserva en una placa de 24 pocillos mediante transferencia en serie de 100 µl sobre 900 µl de medio de cultivo celular. Cada dilución de ADC (100 µl/pocillo para el azul Alamar, 50 µl/pocillo para MTS) se dispensó en 4 pocillos de replicación de la placa de 96 pocillos, que contenían suspensión celular. Los pocillos de control recibieron el mismo volumen de medio de cultivo solamente. Después de la incubación durante 4 días, la viabilidad celular se midió mediante ensayo de azul de Alamar o MTS.

40

45 Se dispensó AlamarBlue® (Invitrogen, número de catálogo DAL1025) (20 µl por pocillo) en cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C en el incubador de gas CO₂. La fluorescencia del pozo se midió a la excitación 570 nm, emisión 585 nm. La supervivencia celular (%) se calculó a partir de la relación de la fluorescencia media en los 4 pocillos tratados con ADC en comparación con la fluorescencia media en los 4 pocillos de control (100 %).

50

55

Se dispensó MTS (Promega, número de catálogo G5421) (20 µl por pocillo) en cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C en la incubadora con gas de CO₂. La absorbancia se midió a 490 nm. La supervivencia celular (%) se calculó a partir de la absorbancia media en los 4 pocillos tratados con ADC en comparación con la absorbancia media en los 4 pocillos de control (100 %). Se generaron curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos medios de 3 experimentos repetidos y se determinó la CE50 ajustando los datos a una curva dosis-respuesta sigmoideal con pendiente variable utilizando Prism (GraphPad, San Diego, CA).

Citotoxicidad in vitro

La eficacia de los ADC de los ADC Her anteriores se analizó contra células Her2 (+) BT-474. Como un control Her2-negativo, se utilizaron células MDA-MB-468.

La figura 1 muestra la eficacia *in vitro* de Her-A. Se incubaron diluciones en serie de 10 veces (µg/ml) de Her-A con células BT-474 o células MDA-MB-468SU-DHL-1. El ensayo Alamar Blue se realizó al final del período de incubación y se calculó la supervivencia celular. Los gráficos representan el promedio de tres experimentos repetidos.

Her-A mostró una citotoxicidad significativa contra las células BT-474 (Figura 1).

Her-A	BT474	MDAMB468
CE50 (µg/ml)	0.02683	1.314

La figura 2 muestra la eficacia *in vitro* de Her-E. Se incubaron diluciones en serie de 10 veces (µg/ml) de Her-E con células BT-474 o células MDA-MB-468SU-DHL-1. El ensayo Alamar Blue se realizó al final del período de incubación y se calculó la supervivencia celular. Los gráficos representan el promedio de tres experimentos repetidos.

Her-E mostró una citotoxicidad significativa contra las células BT-474 (Figura 2).

Her-E	BT474	MDAMB468
EC50 (µg/mL)	0.06933	0.9941

La figura 3 muestra la eficacia *in vitro* de Her-D. Se incubaron diluciones en serie de 10 veces (µg/ml) de Her-D con células BT-474 o células MDA-MB-468SU-DHL-1. El ensayo con Alamar Blue se realizó al final del período de incubación y se calculó la supervivencia celular. Los gráficos representan el promedio de tres experimentos repetidos.

Her-D mostró citotoxicidad frente a las células BT-474 (Figura 3).

Her-D	BT474	MDAMB468
CE50 (µg/ml)	0.4302	0.6109

La figura 4 muestra la eficacia *in vitro* de Her-B. Se incubaron diluciones en serie de 10 veces (µg/ml) de Her-B con células BT-474 o células MDA-MB-468SU-DHL-1. El ensayo CON Alamar Blue se realizó al final del período de incubación y se calculó la supervivencia celular. Los gráficos representan el promedio de tres experimentos repetidos.

Her-B mostró citotoxicidad frente a las células BT-474 (Figura 4).

Her-B	BT474	MDAMB468
CE50 (µg/ml)	0.2234	1.065

Ejemplo 13 Actividad antitumoral *in vivo* de ADC

La línea celular derivada de cáncer de mama Her2 + (ve) BT-474 se usó para determinar el conector de fármaco PBD más potente para Her2 *in vivo*. El anticuerpo se conjugó con ligandos de cabeza de guerra A, E, D, o B y se ensayó en el modelo de xenoinjerto BT-474. Al mismo tiempo, para investigar cualquier actividad antitumoral potencial observada con Trastuzumab solo, el anticuerpo sin PBD se analizó en el mismo ensayo.

Diseño del estudio

Medicamentos y tratamiento:

N.º de grupo	Animales por grupo	ADC	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)
1	10	[solo vehículo]	-	-
2	10	Trastuzumab [sin PBD]	1,0	10
3	10	Her-A	0,3	10
4	10	Her-A	1,0	10
5	10	Her-E	0,3	10
6	10	Her-E	1,0	10
7	10	Her-D	0,3	10
8	10	Her-D	1,0	10
9	10	Her-B	1,0	10
10	10	Her-B	1,0	10

Procedimientos:

- 5
 - Establecer ratones CR hembra NCr nu/nu, de 8 años de edad con células tumorales I xl BT474-SPN en 0 % Matrigel s.c. en el flanco.
 - El volumen de inyección celular es de 0,1 ml/ratón.
 - Edad en la fecha de Inicio: 8 a 12 semanas,
 - Realizar un apareamiento a cuando los tumores alcancen un tamaño promedio de 100-150 mm³, y comience el tratamiento.
- 10
 - Peso corporal: cada día x 5, después dos veces a la semana hasta el final
 - Medición de la pinza: dos veces a la semana hasta el final
 - Informar inmediatamente cualquier reacción adversa o muerte.
 - Se sacrificará a cualquier animal individual con una sola observación de > 30 % de pérdida de peso corporal o tres medidas consecutivas de > 25 % de pérdida de peso corporal.
- 15
 - Cualquier grupo con dos mediciones de la pérdida media de peso corporal de > 20 % o > 10 % de mortalidad detendrá la dosificación. No se sacrifica al grupo y se permite la recuperación. En un grupo con > 20 % de pérdida de peso, los individuos que alcancen el criterio de pérdida de peso corporal individual serán sacrificados. Si la pérdida de peso corporal relacionada con el grupo de tratamiento se recupera dentro de un 10 % de los pesos originales, la dosificación puede reanudarse a una dosis más baja o un programa de dosificación menos frecuente. Las excepciones al porcentaje de recuperación de peso corporal sin tratamiento pueden permitirse caso por caso.
- 20
 - El criterio TGD. Los animales serán monitorizados individualmente. El criterio de valoración del experimento es un volumen tumoral de 2000 mm³ o 60 días, sea cual sea el que aparezca primero. Los que responden pueden ser seguidos más tiempo. Cuando se alcanza el criterio de valoración, se sacrificará a los animales.
- 25

Enfoque metodológico general

- 30 Para el cálculo del volumen tumoral medio del grupo se aplicó la siguiente regla: cuando un animal salió del estudio debido al tamaño del tumor, se incluyó el volumen tumoral final registrado para el animal con los datos utilizados para calcular el volumen medio en puntos de tiempo posteriores. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM). No se usaron valores de volúmenes de tumores para calcular los volúmenes de tumores medios de grupo cuando menos del 50 % de los animales en un grupo permanecieron en el estudio. Prism (GraphPad, San Diego, CA) se utilizó para presentaciones gráficas y análisis estadísticos.
- 35

Resultados

- 40 La Figura 5 muestra la selección del conector de fármaco para los ADC de Her en el modelo de xenoinjerto BT-474. Los ratones se dosificaron cuando el volumen medio del tumor por grupo experimental alcanzó 0,1 cm³ y se trataron con una sola dosis de los ADC a 0,3 y 1 mg/kg (para unión de ADC) vía IV en la vena de la cola. Los datos representan el volumen tumoral medio (+/-SEM) de diez ratones en cada grupo.

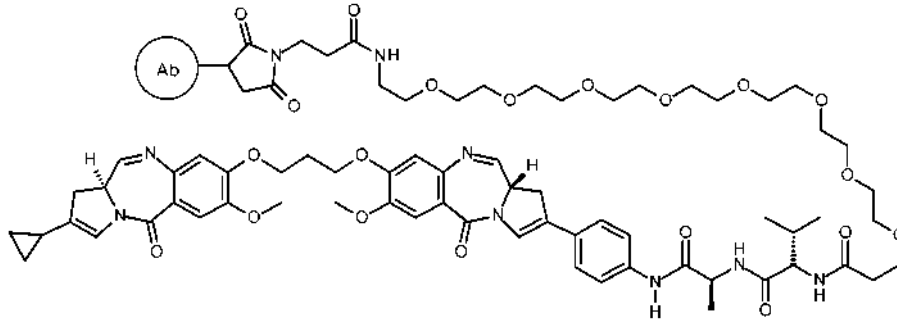
- 45 Her-A y Her-B exhibieron la actividad antitumoral más potente (Figura 5); Her-E y Her-D mostraron una actividad antitumoral fuerte, pero menos marcada. El trastuzumab sin PBD no mostró actividad antitumoral significativa en este ensayo.

Abreviaturas

Ac	acetilo
Acm	acetamidometilo
Alloc	aliloxicarbonilo
Boc	dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo
t-Bu	<i>terc</i> -butilo
Bzl	bencilo, en el que Bzl-OMe es metoxibencilo y Bzl-Me es metilbenceno
Cbz o Z	benciloxi-carbonilo, en el que Z-Cl y Z-Br son cloro-y bromobenciloxicarbonilo, respectivamente
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
Dnp	dinitrofenilo
DTT	ditiotreitolo
Fmoc	9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
imp	grupo protector de imina <i>N</i> -10: 3-(2-metoxietoxi)propanoato-Val-Ala-PAB
MC-OSu	maleimidocaproil-O- <i>N</i> -succinimida
Moc	metoxicarbonilo
MP	maleimidopropanamida
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo
PAB	para-aminobenciloxicarbonilo
PEG	etilenoxi
PNZ	carbamato de <i>p</i> -nitrobencilo
Psec	2-(fenilsulfonil)etoxicarbonilo
TBDMS	<i>terc</i> -butildimetilsililo
TBDPS	<i>terc</i> -butildifenilsililo
Teoc	2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo
Tos	tosilo
Troc	cloruro de 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo
Trt	tritilo
Xan	xantilo

REIVINDICACIONES

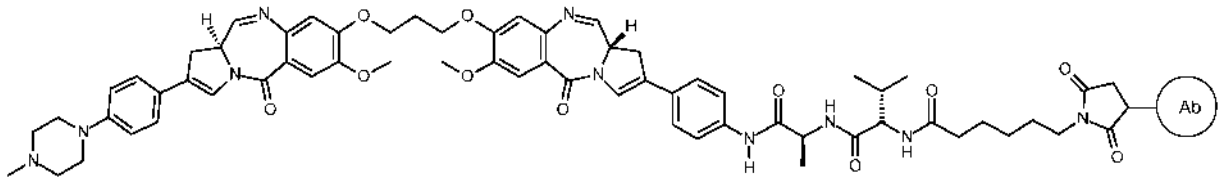
1. Un conjugado de fórmula ConjA:



5

ConjA

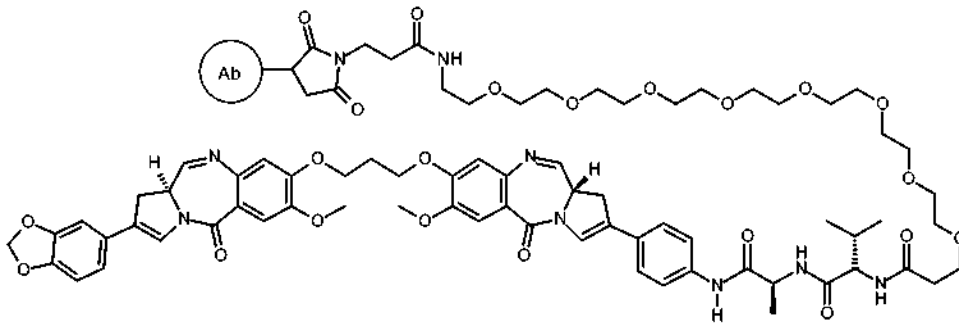
ConjB:



10

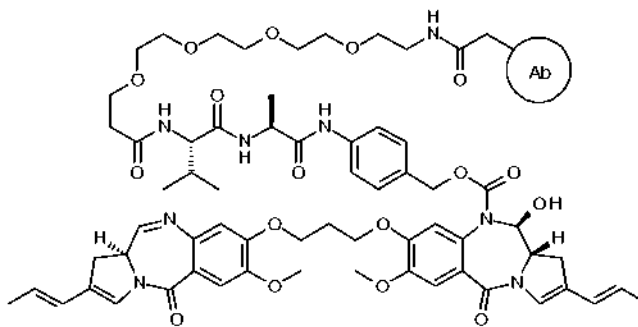
ConjB

ConjC:



15

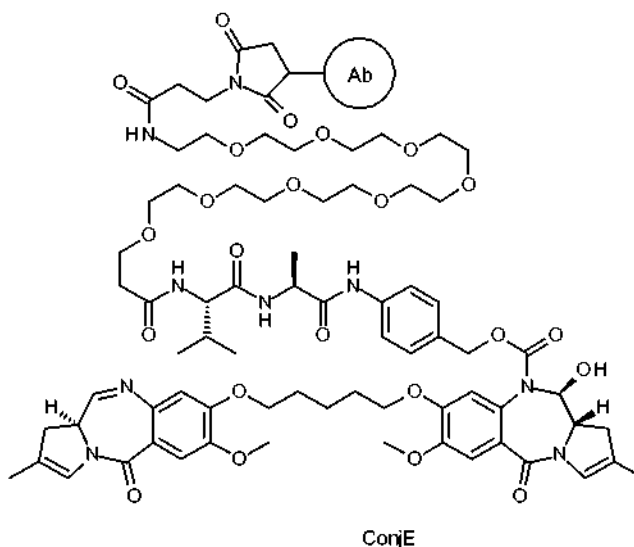
ConjD:



20

o ConjE:

ConjD



- 5 en las que Ab es un anticuerpo que se une a HER2, comprendiendo el anticuerpo un dominio VH que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO. 1; y
 8 en donde la carga de fármaco (p) de fármacos (D) al anticuerpo (Ab) es un número entero de 1 a aproximadamente 8.
- 10 2. El conjugado según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH emparejado con un dominio VL, teniendo los dominios VH y VL las secuencias de SEQ ID NO. 1 emparejadas con la SEQ ID NO. 2.
3. El conjugado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo intacto.
- 15 4. El conjugado según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 3 emparejada con una cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO.4.
5. El conjugado según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas que tienen la secuencia de SEQ ID NO. 3, cada una emparejada con una cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 4
- 20 6. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo está humanizado, desimmunizado o con la superficie acondicionada.
7. El conjugado según la reivindicación 1, en el que p es 1, 2, 3 o 4.
- 25 8. El conjugado según la reivindicación 1, que comprende una mezcla de los compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco, en donde la carga promedio de fármaco por anticuerpo en la mezcla de los compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.
9. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en terapia.
- 30 10. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto.
11. El conjugado según la reivindicación 10, en donde la enfermedad es cáncer.
- 35 12. El conjugado según la reivindicación 11, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello y carcinoma de glándulas salivales.
- 40 13. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 45 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico.

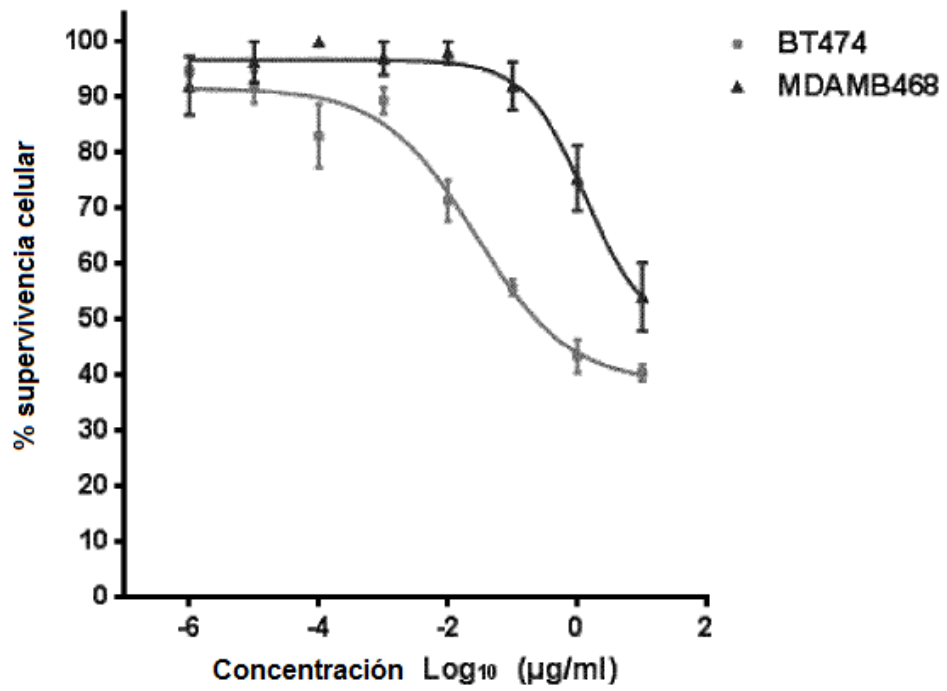


Figura 1

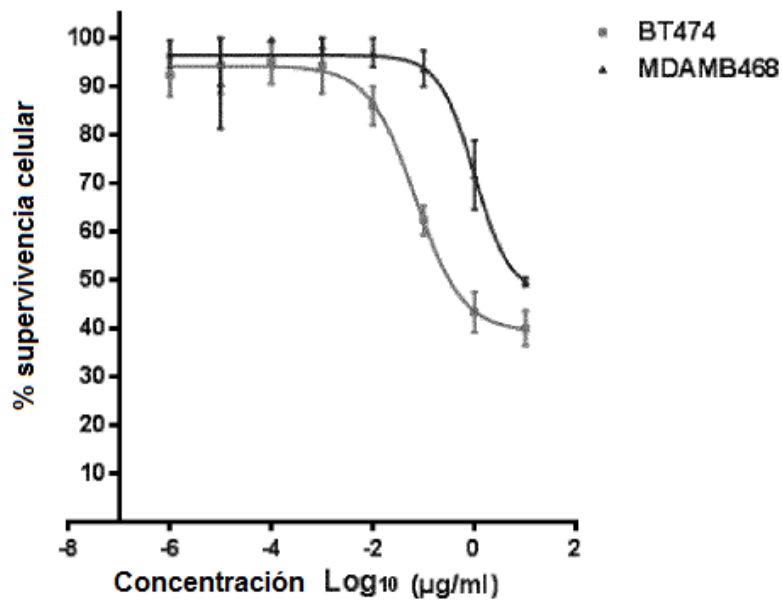


Figura 2

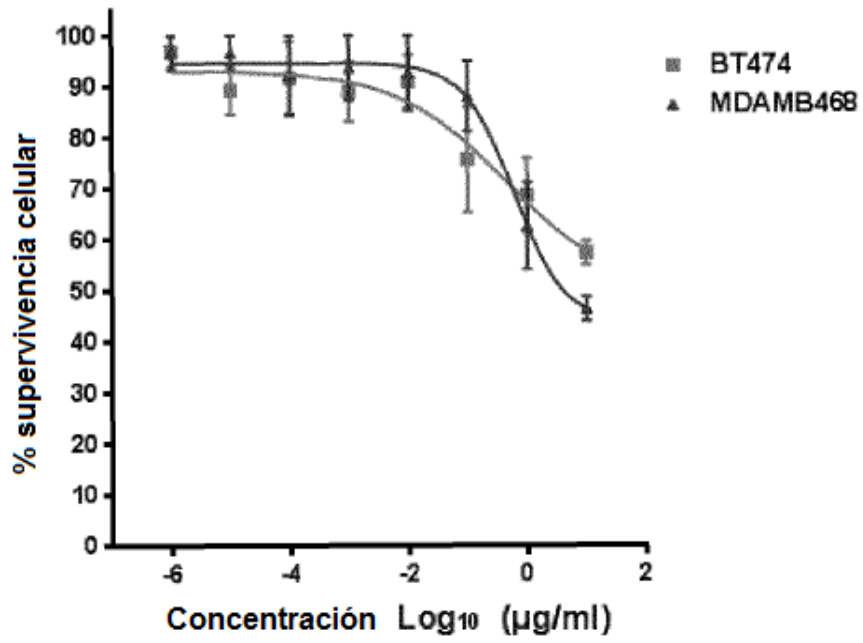


Figura 3

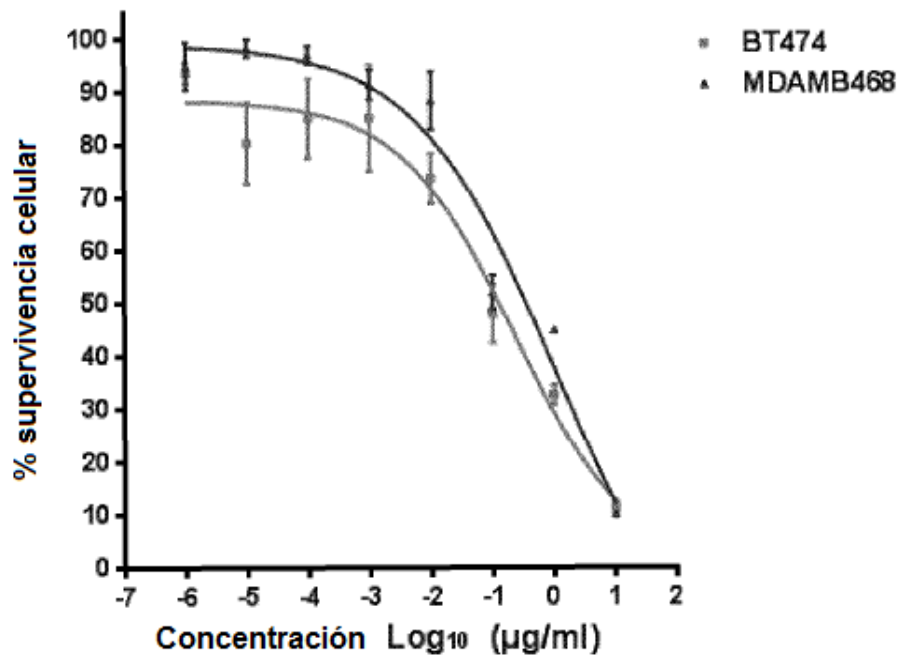


Figura 4

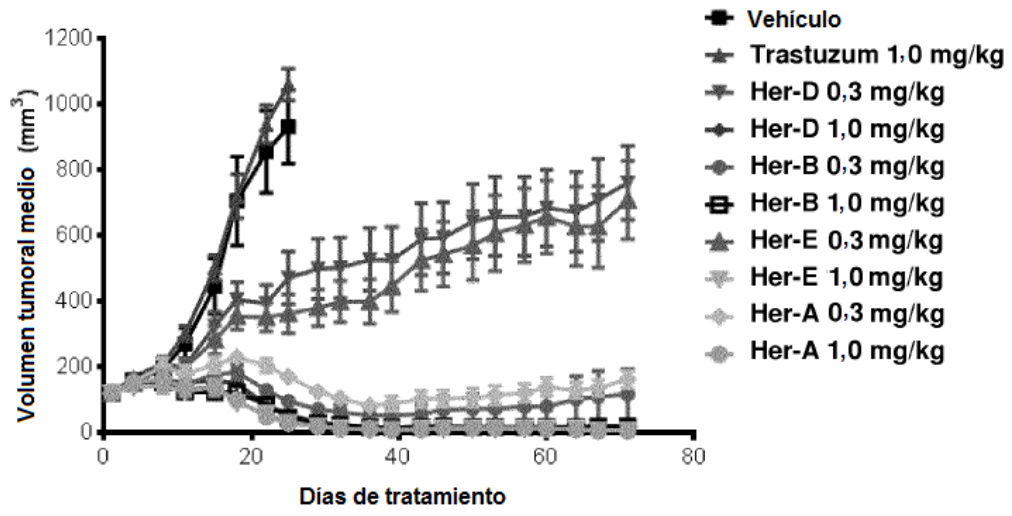


Figura 5